



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Tese de Doutorado

AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA DE MICROEMULSÕES DE
ZIDOVUDINA PARA USO TRANSDÉRMICO

André Luís Menezes Carvalho

RECIFE
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA DE MICROEMULSÕES DE
ZIDOVUDINA PARA USO TRANSDÉRMICO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, área de Produção e Controle de qualidade.

André Luís Menezes Carvalho

Orientador: Prof^o Dr. Davi Pereira de Santana

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Amélia Moreira Lira

RECIFE – PE
2012

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

C331a Carvalho, André Luis Menezes.
 Avaliação biofarmacotécnica de microemulsões de zidovudina para
 uso transdérmico / André Luis Menezes Carvalho. – Recife: O autor,
 2012.
 138 folhas : il. ; 30 cm.

 Orientador: Davi Pereira de Santana.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.
 Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

 1. Nanotecnologia. 2. HIV. 3. Zidovudina. 4. Adesivo Transdérmico. I.
 Santana, Davi Pereira de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2012-234)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA DE MICROEMULSÕES DE
ZIDOVUDINA PARA USO TRANSDÉRMICO

Recife, _____ de _____ de 2012.

EXAMINADOR (ES):

Examinador interno e presidente da Banca

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana_____.

Examinadores internos

Profa. Dra. Beate Saegesser Santos (UFPE)_____.

Profº. Dr. Rui de Oliveira Macêdo (UFPB)_____.

Examinadores externos

Profº. Dr. José Alexsandro da Silva (UEPB)_____.

Profa. Dra. Leila Bastos Leal (UFPE)_____.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice – Reitor

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalci José Brondani

Vice – Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antônio Rodolfo de Faria

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Nereide Stela Santos Magalhães

**Vice - Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas**

Ana Cristina Lima Leite

*Dedico este trabalho a minha avó, **Profa. Nair Menezes (in memoriam)** por ter
elegido a educação como meta primordial na vida de seus 13 (treze) filhos,
dezena de netos e bisnetos.*

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** por ter sido misericordioso no decorrer desta caminhada e pela sua presença sempre forte em todas as minhas escolhas, nos erros e principalmente nas vitórias.

Ao **orientador Prof. Dr. Davi Pereira de Santana** por ter fornecido as melhores oportunidades profissionais que tive na minha carreira até o presente momento. Agradeço a paciência e a sua disponibilidade para contribuir, aconselhar e apoiar, em especial, nos momentos de dificuldade.

A **co-orientadora Profa. Dra. Ana Amélia Moreira Lira** que desde a concepção do projeto sempre demonstrou compromisso e respeito com a pesquisa mesmo diante de tantas dificuldades. A sua presença foi imprescindível para realização desta pesquisa. Muito obrigado pela amizade e grande acolhimento nas viagens a Aracaju – SE.

A **UFPE** que desde 2002 me abriga como aluno de graduação e pós-graduação. A todos os docentes, em especial Miracy Muniz de Albuquerque, Nelly Caetano, Leila Bastos pela grande formação que tive na área de produção e controle, além do apoio profissional e a amizade.

Ao **Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG)** na pessoa da Profa. Dra. Rogéria Nunes e toda a sua equipe. As alunas da Profa. Ana Amélia (Tamara Nunes e Ellen Denise) que tanto me ajudaram na UFS.

Ao **Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico** da UEPB, na pessoal do Prof. Dr. José Alexsandro e a mestranda Jamily que me apoiaram nesta caminhada.

Ao **Biotech / UFPI** (Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia da UFPI), na pessoal do Prof. Dr. José Roberto e da Doutoranda Leiz Veras (muitas madrugadas em frente ao HPLC).

A **Farmácia Escola da UFPI** pelo apoio na realização de algumas etapas deste projeto. Agradecimento especial a Carlos Alberto e Ângela (funcionários) e aos meus ex - alunos de iniciação científica Terceiro-Neto, Clemilton, Ivana e Emison.

Ao **Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV / UFPI** por permitir a realização de análises espectrofotométricas.

A **minha família**, Maria Menezes (mãe), João Gabriel Menezes (irmão), Luiz Menezes (tio-pai), Conceição (tia) e todos os demais tios (as) e primo (as), pela torcida, admiração e orgulho que vocês sempre demonstraram mesmo eu estando ausente.

Á **Sandra da Silva Guimarães** pela paciência e torcida nesta caminhada. Muito obrigado pela dedicação e amor que transforma diariamente os meus problemas em solução.

A **Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade / UFPE** por todo apoio e torcida, em especial aos Farmacêuticos e ex - Farmacêuticos (Elisson, Karine, Greta, Eliane, Cris, André Santos, Homero, Cris), demais colaboradores e ex - colaboradores, como Nilson, Olívia, Michele, André Correa, Margarete Valdivino, Júlio César.

Ao **NUDFAC / CBIO**, meus amigos Luiz Sardon, Amanda, Januária, Danilo Bedor e Carlos Eduardo, Thayse por todos os auxílios de impressão até mesmo nas análises cromatográficas.

A todos do **NUDFAC / CP&D**: Giovana, Noely, Alice e alunos de iniciação.

A **UFPI** pelo apoio e torcida dos colegas docentes e principalmente dos discentes que são participantes do PAF – Programa de Atenção Farmacêutica, meus alunos de ICV e TCC.

Agradecimento especial a minha amiga **Silvia Queiroz de Farias** por ter sempre me acolhido em Recife. Muito obrigado pelo privilégio de sua amizade!

Aos grandes amigos que consegui nesta caminhada de 2002 a 2012 e que sempre me ajudaram seja através do compartilhamento de conhecimento científico ou com as palavras motivadoras: Cinthia Meireles (binha), Ana Flávia, Marigilson Pontes, Elisângela, Ivana, Júnior - Ceará, André Santos, Carlos Eduardo, Karine Melo, Júlio César, Talita Mota, Hilris, Ádley...

Ao CNPQ e a Fundação de Apoio a pesquisa do estado do Piauí – FAPEPI pelo auxílio financeiro.

*“Um passo à frente, e você não está mais
no mesmo lugar...”
(Chico Science)*

RESUMO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma manifestação causada pelo vírus HIV. A zidovudina (3 – azido – 3 – oxidimetilamina) – AZT foi o primeiro composto anti-hiv aprovado para uso clínico e utilizado para terapia antirretroviral. O ponto crucial do tratamento anti-hiv é a manutenção sistêmica do fármaco dentro de níveis terapêuticos. O AZT tem curto tempo de meia-vida, baixa biodisponibilidade em função do efeito de primeira passagem, por isso são necessárias altas doses para manutenção dos níveis terapêuticos. Com isso, a via transdérmica surge como alternativa para a passagem do fármaco através das camadas da pele até atingir a corrente sanguínea. Diversas estratégias têm sido investigadas para promover a penetração cutânea do AZT, em função de sua hidrofília, como a utilização de promotores físicos (iontoforese e fonoforese), promotores químicos (etanol, uréia e terpenos) e de sistemas microemulsionados / nanoparticulados. O objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação biofarmacotécnica de microemulsões (ME) de zidovudina a 2.5% em pele de cobra e orelha de porco, na ausência e presença de diferentes promotores químicos. Para isso, realizaram-se diversas técnicas de caracterização físico-química (características macroscópicas, pH, densidade, potencial zeta, SAXS, comportamento reológico, determinação do tamanho de partícula), estudos de estabilidade preliminar, permeação e retenção cutânea, FT-IR em pele de cobra e irritabilidade dérmica acumulada em camundongos. Além disso, foram desenvolvidos e validados 02 (dois) métodos analíticos, por espectrofotometria ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – UV) para avaliação do AZT em estudos de permeação e retenção cutânea. Consequentemente, obteve-se microemulsões e formulação de cristal líquido lamelar (LP), transparentes, isotrópicas com tamanho de partícula < 160 nm e biocompatível com a pele. A formulação que possuiu o melhor desempenho foi composta do terpeno 1,8 cineol como promotor de permeação cutânea, pois conseguiu alcançar de forma significativa o compartimento receptor da célula de FRANZ e poderá ser um veículo promissor para liberação transdérmica do AZT.

PALAVRAS CHAVES: transdérmico, zidovudina, microemulsão, HIV

ABSTRACT

Acquired immunodeficiency syndrome (SIDA) is a manifestation caused by HIV. Zidovudine (3 - azido - 3 - oxidimethylamine) - AZT was the first anti-HIV compound approved for clinical use and antiretroviral therapy. The crux of the anti-HIV treatment is to maintain the systemic drug within therapeutic levels. AZT has a short half-life and low bioavailability due to its first pass effect; therefore higher dosages are required to maintain the therapeutic levels. Thus, the transdermal route is an alternative for the passage of drug through the skin layers to reach the bloodstream. Several strategies have been investigated to promote AZT skin penetration due to its hydrophilicity, the use of physical promoters (iontophoresis and phonophoresis), chemical promoters (ethanol, urea and terpenes) and microemulsion systems/nanoparticle. The objective of this study was the biopharmaceutical evaluation of microemulsions (ME) of 2.5% zidovudine in snake skin and pig ear in the absence and presence of different chemical promoters. For this, there have been several physical-chemical techniques of characterization (macroscopic characteristics, pH, density, zeta potential, SAXS, rheology, particle size determination), preliminary stability studies, permeation and skin retention, FT-IR snake skin and accumulated dermal irritability in mice. Moreover, we developed and validated two (02) analytical methods, ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC - UV) for evaluation of AZT studies in skin permeation and retention. Consequently, there were microemulsions and formulation of lamellar liquid crystal (LP), transparent, with isotropic particle size <160 nm and biocompatible with the skin. The formulation that possessed the best performance was composed of terpene, 1,8 cineol as promoter of skin permeation, as managed to reach the receiver compartment of the cell FRANZ and may be a promising alternative for transdermal delivery of AZT.

KEYWORDS: transdermal, zidovudine, microemulsion, HIV

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estrutura química da zidovudina.....	29
Figura 2 – Ilustrações de microemulsão A/O, microemulsão O/A e estruturas bicontínuas.....	31
Figura 3 – Estruturas de cristal líquido lamelares (1), cúbicos (2) e hexagonais (3).....	33
Figura 4. Estrutura das camadas da pele (A) e detalhe especial do processo de disposição dos queratinócitos da epiderme (B).....	34
Figura 5. Disposição intercalada de envelopes lipídicos e proteicos do estrato córneo...	35
Figura 6. Representação da membrana do estrato córneo, ilustração de duas possíveis microrrotas de permeação (AUTON, 2005).....	37
Figura 7 - Mecanismo de permeação cutânea de diversos promotores com efeito na bicamada lipídica do estrato córneo.....	39
Figura 8 - Fotografia de uma pele de cobra de Jibóia (<i>Boa constrictor</i>) evidenciando duas regiões: (A) porção dorsal e (B) porção ventral.....	42
Figura 9 - Estrutura de uma célula de difusão tipo Franz.....	43

CAPÍTULO II – ARTIGO I

Figure. 1. Rheological behavior of microemulsion formulations obtained by the graphs (a) ME without AZT and LP without AZT and (b) LP with AZT and ME with AZT.....	55
Figure 2. SAXS analysis for the microemulsion formulations (ME and ME – AZT) and lamellar phase (LP and LP-AZT).....	57
Figure 3. AZT distribution in the pig ear skin layers after 24h (*corneum stratum) carried out in solution (control), microemulsion (ME) and lamellar liquid crystal (LP).....	58
Figure 4. Zidovudine permeation profile from two tested formulations (ME and LP) and the Buffer solution (n = 4).....	58
Figure 5. Photomicrograph showing the skin treated with Natrosol gel (control) (A), ME (B). Photo B shows slight increase in the epidermal thickness (C), and mild inflammatory infiltrate in the deep dermis (D).....	60
Figure 6. Average skin thickness (in μm) after applying the ME-AZT microemulsion and hidrogel (control) treatments in mice skin in studies on skin irritability.....	61

CAPÍTULO III – ARTIGO II

Figura 1 - Fórmula estrutural da zidovudina.....	69
Figura 2 - Espectros de SAXS de diferentes formulações microemulsionadas na presença de diferentes promotores químicos de permeação cutânea <i>in vitro</i>	79
Figura 3 - Gráficos do comportamento reológico da ME e com ME na presença de diferentes promotores de cutânea (uréia, etanol, cineol e geraniol).....	81
Figura 4 - Avaliação do teor (a) e densidade (b) de microemulsões de zidovudina com diferentes promotores químicos (antes e após ciclo gelo degelo).....	82
Figura 5 Espectros de FT-IR/ATR de diferentes microemulsões de zidovudina na ausência de promotores (ME) e na presença de etanol 1 e 5% (ME-ET1 / ME-ET5 – (A)), de ureia 1 e 5% (ME-UR1/ME-UR-2 – (B)), de cineol 1 e 5% (ME-CIN1 / ME-CIN5 – (C)) e geraniol 1% (ME-GE1 – (D)) no intervalo de banda de 2800 – 3000 cm ⁻¹	83
Figura 6 Perfil de permeação cutânea <i>in vitro</i> em pele de cobra (<i>Boa constrictor</i>) com quatro replicatas em cada ponto do ensaio (n = 4).....	85
Gráfico 7. Perfil de permeação cutânea <i>in vitro</i> de diferentes formulações microemulsionado em pele de orelha de porco na presença e ausência de diferentes promotores de permeação cutânea , com quatro replicatas (n=4).....	86
Gráfico 8. Distribuição do azt veiculado em diferentes microemulsões no estrato córneo (SC), epiderme e derme (E + D) e meio receptor da célula de franz, 24 horas após o ensaio de permeação cutânea <i>in vitro</i> , através da técnica de tape stripping com quatro replicatas (n=4).....	87

CAPÍTULO IV – ARTIGO III

Figure 1. Overlay of the spectra obtained between 180 and 360 nm solution of AZT and AZT-free placebo formulation.....	100
Figure 2. <i>In vitro</i> release profile of AZT-ME (Micro - AZT) and ME (Micro-placebo). Each point represents the mean ± SD of 4 determinations.....	102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 01. Principais fármacos utilizados na terapia HAART.....	27
---	----

CAPÍTULO II – ARTIGO I

Table 1 Formulations composition selected for this study.....	50
---	----

Table 2: Data on the physical and chemical characteristics of formulations with absence or presence of zidovudine.....	54
--	----

Table 3 - Parameters of transdermal permeation of zidovudine in the pig skin obtained from different formulations.....	59
--	----

CAPÍTULO III – ARTIGO II

Tabela 1. Composição quali/quantitativa de microemulsões obtidas com promotores de permeação cutânea (etanol, uréia, 1,8 cineol e geraniol).....	72
--	----

Tabela 2. Características físico-química de microemulsões com os diferentes promotores químicos.....	77
--	----

Tabela 3 Parâmetro de permeação cutânea para as diferentes microemulsões em orelha de porco após 24 horas de ensaio de permeação cutânea, com os diferentes promotores de permeação cutânea, com quatro replicata (n=4).....	88
--	----

CAPÍTULO IV – ARTIGO III

Table1. Absorbance results for AZT solutions in ethanol at each concentration and their respective standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV).....	99
---	----

Table 2. Results for repeatability and reproducibility.....	101
---	-----

Table 3. Results for accuracy.....	101
------------------------------------	-----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - porcentagem

µg – micrograma

µL – microlitro

ANOVA – análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARV – Antirretroviral

AZT - Zidovudina

CLAE – Cromatografia de alta eficiência a líquido

CLAE – UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta

cm – centímetro

CV – coeficiente de variação

DP – Desvio padrão

FDA – Food and Drug Administration

FT – IR – Infravermelho com transformada de Fourier

g – grama

h – hora

HAART – Tratamento antirretroviral de alta eficiência

HIV – Vírus da Imunodeficiência adquirida

L – litro

mg – miligrama

min – minuto

mL - mililitro

mm – milímetro

°C - graus Celsius

pH – potencial hidrogeniônico

QSP – quantidade suficiente para

RE – Resolução

RPM – rotações por minuto

SAXS – espalhamento de raio – X a baixo ângulo

UV – ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURA.....	13
1 Introdução.....	18
2 Objetivos.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2Objetivos específicos.....	23
3. Capítulo I – Revisão da literatura.....	24
3.1 A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)	25
3.1.1. A Terapia antirretroviral e a zidovudina.....	25
3.1.2 A Zidovudina.....	29
3.2 Nanotecnologia: carreadores de fármacos.....	30
3.2.1. Microemulsões.....	31
3.2.2 Cristal líquido (CL)	32
3.3 A Via transdérmica e a penetração cutânea de fármacos.	33
3.3.1 Rotas de permeação cutânea de compostos.....	36
3.3.2 Promotores de permeação cutânea.....	38
3.4 Ensaios de Permeação cutânea <i>in vitro</i>	40
3.4.1 Membranas utilizadas em ensaios de permeação cutânea.	41
3.4.2 Célula de difusão e aspectos relevantes nos ensaios de permeação cutânea.....	43
3.4.3 Parâmetros de permeação cutânea.....	43
4. Capítulo II – Artigo I - 4 Evaluation of microemulsion and lamellar liquid crystalline systems for transdermal Zidovudine delivery.....	45
4.1 Introdução	48
4.2 Materiais e Métodos.....	49
4.2.1 Material.....	49
4.2.2 Preparation of the microemulsion (ME) and lamellar liquid crystal (LP).....	50
4.2.2.1 - Preparation of formulations.....	50
4.2.3 Physicochemical characterization.....	50
4.2.3.1 SAX.....	51
4.2.4 Skin permeation and retention tests.....	51

4.2.4.1 Skin Preparation.....	51
4.2.4.2 <i>In vitro</i> Skin Permeation and Retention studies.....	51
4.2.4.3 Analysis of Data Obtained in Skin Permeation Experiments.....	52
4.2.5. Analytical Method.....	53
4.2.5.1 - High performance liquid chromatography (HPLC).....	53
4.2.6 Dermal Irritation Test.....	53
4.3 Results and discussion.....	54
4.3.1. Physical and chemical characterization of formulations.....	54
4.3.2. <i>In vitro</i> evaluation of Skin Permeation and Retention.....	57
4.3.3 Evaluation of Skin Irritation.....	59
4.4 Conclusion.....	61
4.5 Acknowledgements.....	61
4.6 References.....	62
5 CAPÍTULO III – Artigo II - Liberação transdérmica de microemulsões de zidovudina: efeito de diferentes promotores em pele de cobra (<i>Boa constrictor</i>) e orelha de porco.....	65
5.1 Introdução.....	69
5.2. Materiais e Métodos.....	71
5.2.1 Materiais.....	71
5.2.2 Obtenção das formulações.....	71
5.2.3 Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta (ζ) pela técnica de espalhamento de luz.....	72
5.2.4 Espalhamento de raio x de baixo ângulo (SAXS)	73
5.2.5 Estudo reológico das microemulsões.....	73
5.2.6 Avaliação da estabilidade preliminar (resistência à centrifugação e ciclo gelo-degelo).....	73
5.2.7 Ensaios de permeação e retenção cutânea.....	74
5.2.7.1 Preparo do estrato córneo da membrana de pele de cobra (<i>Boa constrictor</i>).....	74
5.2.7.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e ATR (FTIR-ATR) em amostras de pele de cobra tratadas com as diferentes formulações pesquisadas.....	74
5.2.7.3 Ensaios de Permeação cutânea <i>in vitro</i> em modelo de biomembrana alternativa (pele de <i>Boa constrictor</i>) e pele de orelha de porco.....	75

5.2.7.4 Condições analíticas – HPLC.....	76
5.2.7.5. Análise dos Dados Obtidos nos Experimentos de Permeação Cutânea.....	76
5.3.0 Resultados e Discussão.....	77
5.4 Conclusão.....	88
5.5 Referências Bibliográficas.....	88
 6 CAPÍTULO IV – Artigo III - Spectrophotometric determination of zidovudine – loaded microemulsion and application in assay of <i>in vitro</i> release kinetics.....	93
6.1. Introduction.....	96
6.2. Material and methods.....	97
6.2.1. Chemical and reagents.....	97
6.2.2. Preparation of microemulsions.....	97
6.2.3. The analytical method validation.....	97
6.2.3.1. Linearity, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD)	98
6.2.3.2. Specificity, Precision, Accuracy and Robustness.....	98
6.2.4. Method application for zidovudine quantification in samples derived from <i>in vitro</i> release kinetics.....	98
6.3. Results and Discussion.....	99
6.3.1. Method validation.....	99
6.3.1.1. Linearity, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD).....	99
6.3.1.2. Specificity, Precision, Accuracy and Robustness.....	100
6.3.1.3 Method application for AZT measurement on <i>in vitro</i> release kinetics.....	102
6.4. Conclusion.....	103
6.5. Acknowledgement.....	103
6.6 References.....	103
7 CONCLUSÃO.....	106
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
9 APÊNDICE - Desenvolvimento e validação da Metodologia Analítica por HPLC para quantificação da zidovudina.	117
10 ANEXOS.....	128
 10.1 ANEXO A.....	129

Introdução

1.0 - INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é a manifestação clínica (manifestação de sinais, sintomas e/ou resultados laboratoriais que indiquem deficiência imunológica) da infecção pelo vírus HIV que leva, em média, oito anos para se manifestar. No Brasil, desde a identificação do primeiro caso de AIDS, em 1980, até junho de 2006, já foram identificados cerca de 430 mil casos da doença. O país acumulou cerca de 180 mil óbitos devido à aids até dezembro de 2005, sendo as taxas de mortalidade crescentes até meados da década de 90, estabilizando em cerca de 11 mil óbitos anuais desde 1998. Após a introdução da política de acesso universal ao tratamento anti-retroviral (ARV), que combina drogas com diferentes formas de ação, tratamento antirretroviral de alta eficiência (HAART), observou-se uma importante queda na mortalidade (BRASIL, 2007).

A Zidovudina, AZT (3 - azido – 3 – oxidimetilamina) foi o primeiro composto anti-hiv aprovado para uso clínico e utilizado para terapia antirretroviral, sozinho ou combinado. Durante a terapia antiretroviral, existe um ponto crucial que é a manutenção sistêmica do fármaco dentro de níveis terapêuticos no decorrer do tratamento. Além disso, o fármaco, após a administração oral, tem curto tempo de meia – vida (01 hora), baixa biodisponibilidade em função do efeito de primeira passagem e geralmente são necessárias altas doses (200mg a cada 4 horas) para manutenção dos níveis terapêuticos. O pico de concentração plasmática é de 1,2 µg /mL em 0,8h (SUWANPIDOKKUL, N *et al.*, 2004; PANCHAGNULA & SUNIL, 2004, 2005).

Entretanto, para evitar os efeitos colaterais e reduzir a toxicidade dose-dependente após a administração oral da zidovudina, surge a necessidade de administração do fármaco por uma via alternativa a oral. Uma rota alternativa é a via transdérmica de administração de fármaco, pois é indicada nos casos de baixa biodisponibilidade, após administração oral, e considerável efeito de primeira passagem no fígado. O que possibilita manutenção de níveis terapêuticos adequados, menos complicações e maior

adesão dos pacientes ao tratamento, pois não necessita de sucessivas doses deste medicamento durante tratamento diário. Além disso, esta via é interessante para o transporte de fármacos lipofílicos ou hidrofílicos (SILVA, 2010).

O transporte do AZT pela pele é um grande desafio, pois é uma molécula hidrofílica e tem dificuldade de ultrapassar a barreira do estrato córneo naturalmente. Com isso, diversas estratégias tem sido investigadas para promover a penetração cutânea do fármaco, como o uso de iontoforese (LEE, J.H *et al.*, 1998), de promotores químicos, como: I - mentol, 1,8 cineol, álcool etílico, propilenoglicol e misturas de solventes com álcool / miristato de isopropila, ácido fático e terpenos, a utilização de carreadores microemulsionados e nanopartículas (CHAGNULA, R & SUNIL, T.K.N, 2003, 2005, RAULT *et al.*, 2010, MAINARDE *et al.*, 2010).

As microemulsões são dispersões isotrópicas, transparentes, termodinamicamente estáveis, usualmente formadas por misturas de quatro componentes, água, óleo, tensoativo e co-tensoativo. Apresentam grande potencial como sistemas de liberação e de direcionamento de fármacos devido as suas propriedades de solubilizar compostos hidrofílicos em meio lipofílico ou lipofílicos em meio aquoso e anfifílicos na interface óleo/água. Em razão de sua alta proporção de substâncias tensoativas, as microemulsões podem interagir com o estrato córneo desestruturando a bicamada lipídica do mesmo, a permeabilidade cutânea é aumentada e a penetração de substâncias, que normalmente não passariam através dessa barreira (por exemplo, a zidovudina), ficaria bastante facilitada (OLIVEIRA, A.G *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2004; KE, 2005; DJORDEVIC, 2004;; CANDAU, 1999; TAHA, 2002; SINTOV, 2004; ESCRIBANO, 2003; MENDONÇA, 2003, DAMASCENO *et al.*, 2011).

Frente ao exposto, este trabalho propõe a preparação e avaliação de diferentes microemulsões para liberação transdérmica de zidovudina, como alternativa no tratamento anti-hiv, através de uma posologia mais racional do medicamento. Evitando, assim, as repetidas doses de administração por via oral e consequentemente facilitar a adesão ao tratamento medicamentoso e melhoria da qualidade de vida dos pacientes portadores do vírus hiv.

Esta tese está organizada na forma de capítulos. O capítulo I (Revisão de literatura sobre os temas mais relevantes discutidos na tese), capítulo II (*Artigo I – Avaliação de microemulsão e cristal líquido lamelar para liberação transdérmica da zidovudina*), capítulo III (*Artigo II - Liberação transdérmica de microemulsões de zidovudina: efeito de diferentes promotores em pele de cobra (*Boa constrictor*) e orelha de porco*), Capítulo IV (*Artigo III – Determinação espectrofotométrica de zidovudina carregada em microemulsão e aplicação em cinética de liberação *in vitro**) e um Apêndice A (método analítico por CLAE/UV para quantificação de zidovudina em estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* que foram usados nos estudos com pele de cobra e orelha de porco).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVOS GERAIS

- O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar preparações microemulsionadas de zidovudina, além de avaliar o desempenho da retenção e permeação cutânea *in vitro* para liberação transdérmica.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Incorporar AZT em sistemas microemulsionados previamente desenvolvidos;
- Caracterizar as propriedades físicas e químicas das microemulsões na ausência e presença de promotores químicos e do AZT;
- Investigar a influência de diferentes promotores químicos na estabilidade preliminar do sistema microemulsionado;
- Investigar o efeito de diferentes promotores químicos na estrutura física de modelo alternativo de biomembrana de pele de cobra (*Boa constrictor*);
- Desenvolver e validar métodos analíticos de quantificação da zidovudina no sistema microemulsionado por espectrofotometria ultravioleta (UV) e por CLAE-UV.
- Desenvolver método de extração para recuperação do fármaco na pele (orelha de porco);
- Avaliar *in vivo* a irritabilidade dérmica acumulada em camundongos de microemulsão de AZT.
- Avaliar e estudar os parâmetros de permeação e retenção cutânea dos diferentes carreadores coloidais, utilizando células de difusão tipo Franz, em diferentes modelos de membranas biológicas (pele de cobra e orelha de porco).

Capítulo I

Revisão da

Literatura

CAPÍTULO I

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é a manifestação clínica (manifestação de sinais, sintomas e/ou resultados laboratoriais que indiquem deficiência imunológica) da infecção pelo vírus HIV que leva, em média, oito anos para se manifestar. Mais de 6800 pessoas se tornam infectadas com o HIV e mais de 5700 pessoas morrem de AIDS por ano, principalmente pelo acesso inadequado à prevenção e tratamento. Intervenções como aconselhamento educacional e terapia com fármacos antirretrovirais têm contribuído para transformar a infecção por HIV de fatal a uma doença infecciosa crônica controlável, embora as estatísticas ainda mostrem que o número de infecções continua inaceitavelmente alto. Atualmente são conhecidos os vírus HIV tipos 1 e 2. Devido às características epidemiológicas da AIDS estudos sugerem uma etiologia infecciosa, transmitida por via sexual, vertical e parenteral (UNAIDS, 2008; BRASIL, 2010).

No Brasil, desde a identificação do primeiro caso de AIDS, em 1980, até junho de 2006, já foram identificados cerca de 430 mil casos da doença. O país acumulou cerca de 180 mil óbitos devido à AIDS até dezembro de 2005, sendo as taxas de mortalidade crescentes até meados da década de 90, estabilizando em cerca de 10 mil óbitos anuais desde 1998. Após a introdução da política de acesso universal ao tratamento antirretroviral (TARV), que combina drogas com diferentes formas de ação da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), observou-se uma importante queda na mortalidade (UNAIDS, 2008).

3.1.1. A Terapia antirretroviral e a zidovudina

Em 1986 surgiu o primeiro antirretroviral, a Zidovudina (AZT) e gradativamente se foi conhecendo mais sobre a situação epidemiológica e as medidas preventivas necessárias contra a infecção pelo HIV. O ano de 1996

apresentou um marco, pois nesse período foi proposto o tratamento com associação de drogas antirretrovirais, inibidoras de duas enzimas essenciais para a multiplicação viral efetiva no organismo, a transcriptase reversa e a protease (GIR *et al.*, 2005).

Essa evolução do tratamento antirretroviral teve início em 1994 quando foi adotado o padrão terapêutico com terapia dupla, substituindo a monoterapia utilizada desde o início com a zidovudina (AZT). O tratamento antirretroviral consolidou-se, então, a partir de 1996, quando foi adotada a terapia tríplice, através da introdução dos inibidores da protease (BONOLO *et al.*, 2007). Essa terapia também é conhecida como terapia antirretroviral altamente efetiva ou terapia antirretroviral (TARV) e desde sua introdução a taxa de falha virológica tem diminuído significativamente, aumentando o número de indivíduos com carga viral indetectável e em recuperação imunológica (SILVEIRA, 2003).

A TARV prolonga a vida e impede a progressão da doença causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A farmacoterapia da infecção pelo HIV constitui uma área em rápida expansão. Em 2004, havia 20 agentes antirretrovirais disponíveis nos EUA. Como o padrão mínimo para o tratamento dessa infecção consiste em combinações de três fármacos, os agentes atualmente disponíveis, conforme tabela 1, permitem a elaboração de pelo menos 1.140 esquemas possíveis (BRUNTON *et al.*, 2006; BRASIL, 2010). Com isso, a TARV aumenta os níveis de linfócitos T CD4, em média de 90 células/mm³, chegando a 753 células/mm³, quando o início do tratamento é precoce, e declínio rápido da carga viral em níveis inferiores a 500 cópias/mL, após seis meses de tratamento, em 72% dos casos (PIERI & LAURENTI, 2012).

A ação dos inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa (ITRNN) é baseada na indução da alteração da configuração tridimensional da enzima transcriptase reversa, o que reduz acentuadamente a atividade da enzima, atuando, dessa forma, como inibidores não-competitivos. Os compostos dessa classe não necessitam sofrer fosforilação intracelular como no caso dos inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INTR) para

serem ativados (BRUNTON *et al.*, 2006). Já os inibidores da protease (IP) agem impedindo a maturação viral através da inibição da protease viral, a qual é responsável pela clivagem proteica que dá origem às proteínas do core e do envelope, ou seja, as partículas formadas que sofreram ação dos IPs serão imaturas e sem potencial de infectar novas células.

As outras classes de medicamentos mais recentes para o tratamento dos pacientes com HIV/AIDS são os inibidores de fusão (IF) e os inibidores de integrase. O raltegravir (RAL) é um novo fármaco que pertence à classe dos inibidores de integrase, enzima que é responsável pela integração do DNA pró-viral ao DNA da célula humana, impedindo através dessa inibição a replicação viral. Essa nova classe de fármacos representa uma classe promissora para o tratamento do HIV/AIDS, sendo importante para o tratamento de pacientes com vírus multirresistentes (TERÇARIOLI & ALKMIM, 2010; BRITO, 2011).

A enfuvirtida (T20) é um fármaco que é administrado por via subcutânea e é o representante dos fármacos IF. Esse medicamento foi desenvolvido no intuito de reverter à situação de falha terapêutica, pois a ação dos IF se dá através da interferência na entrada do HIV nas células linfocitárias por inibirem a fusão das membranas viral e celular (TORRES & MIRANDA, 2010). É um medicamento indicado exclusivamente para terapia de resgate, como seu mecanismo de ação é distinto dos demais fármacos, não há resistência viral cruzada com os outros antirretrovirais disponíveis (BRASIL, 2008; SOUZA *et al.*, 2010; BRITO, 2011).

Tabela 01. Principais fármacos utilizados na terapia HAART

Classes e Drogas	Siglas	Ano de aprovação pela FDA
Inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INTR)		
Zidovudina	ZDV	1987
Didanosina	ddl	1991
Zalcitabina	ddC	1992

Estavudina	d4T	1994
Lamivudina	3TC	1995
Abacavir	ABC	1998
Tenofovir	TDF	2001
Emcitribina	FTC	2004
Inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa (INNTR)		
Nevirapina	NVP	1996
Delevirdina	DLV	1997
Efavirenz	EFV	1998
Etravirine	ETV	2008
Inibidores da protease (IP)		
Saquinavir	SQV	1995
Ritonavir	RTV	1995
Indinavir	IDV	1996
Nelfinavir	NFV	1997
Amprenavir	AVP	1999
Lopinavir	LPV	2000
Atazanavir	ATV	2003
Fosamprenavir	FSV	2003
Tipranavir	TPV	2005
Darunavir	DRV	2006
Inibidores da integrase (II)		
Raltegravir	RAL	2007
Inibidores de fusão (IF)		
Enfuvirtida	ENF	2003
Inibidores de entrada (IE)		
Maraviroc	MRV	2007

Fonte: Adaptado de PERNO *et al.*, 2011.

Em 2012, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou a utilização do medicamento Truvada® (emtricitabina / tenofovir disoproxil fumarato), o primeiro fármaco aprovado para reduzir o risco de infecção pelo HIV em indivíduos não infectados, que estão em alto risco de infecção pelo HIV e podem se envolver em atividade sexual com HIV, através de parceiros

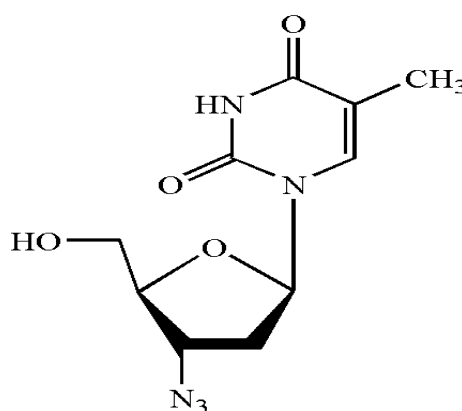
infectados. O Truvada®, tomado diariamente, será utilizado para a profilaxia pré-exposição (PrEP) em combinação com a prática de sexo seguro para reduzir o risco de infecção adquirida sexualmente em adultos de alto risco (FDA, 2012).

Entretanto, apesar da politerapia recomendada pelo Ministério da Saúde, o AZT ainda é bastante utilizado, especialmente, em acidentes ocupacionais com pacientes soropositivos, na profilaxia de contato sexual não consentido, na transmissão vertical e na administração pediátrica de progenitoras portadoras do vírus. Entretanto, a terapêutica por vias convencionais traz consigo dificuldades na adesão ao tratamento medicamentoso, em função da grande quantidade de comprimidos ingeridos diariamente e de reações adversas inerentes à via de administração (PADOIN *et al.*, 2012.)

3.1.2 O AZT

A zidovudina é também conhecida como Retrovir, AZT, ZDV ou 3'-azido-3'- desoxitimidina. O AZT é um análogo da timidina que possui um grupamento 3'- azido em lugar de 3'-hidroxila. Possui fórmula molecular $C_{10}H_{13}N_5O_4$ e peso molecular 267,24, é solúvel em etanol e levemente solúvel em água. O AZT é um sólido cristalino solúvel em água na proporção de 20 mg.mL^{-1} . Sua estrutura química está representada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química da zidovudina



O AZT foi o primeiro antirretroviral para o tratamento da infecção por HIV. Foi bastante utilizado como monoterapia e na atualidade é utilizado em

combinação com outros medicamentos antirretrovirais. Após administração oral, é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e alcança pico de concentração plasmática em torno de 01 hora. A biodisponibilidade oral é 65%, devido ao efeito de primeira passagem e pelo tempo de meia – vida que é de aproximadamente 1 hora (SILVA, 2006).

Consequentemente, a manutenção de níveis terapêuticos é associada a repetidas administrações do medicamento (200mg / 4horas), as quais frequentemente alcançam níveis plasmáticos tóxicos, causando uma série de efeitos adversos graves tais como granulocitopenia e anemia (MAINARDES, 2007). Esses efeitos são dose - dependente e uma redução da dose total administrada reduziria a severidade desta toxicidade (MANDA & TENJARLA, 1996).

Entretanto, o AZT é uma molécula hidrofílica e tem dificuldade de ultrapassar a barreira do estrato córneo. Com isso diversas estratégias tem sido investigadas para promover a penetração cutânea do fármaco, como o uso de iontoforese (OH *et al.*, 1998) e de promotores químicos, como: l - menthol, 1,8 cineol , álcool etílico, propilenoglicol e misturas de solventes com álcool / miristato de isopropila, ácido fatílico e terpenos (PANCHAGNULA; NARISHETTY, 2004, 2005).

O fluxo iontoforético de uma solução de AZT aumentou de 5 – 40 vezes o fluxo obtido por difusão passiva da mesma solução (OH *et al.*, 1998). A veiculação do AZT em veículo de etanol / miristato de isopropila (30/70) contendo 10% de N – metil – 2 - pirrolidona resultou em fluxo *in vitro* de 215µg / cm² / h, o que é superior ao fluxo ideal “predito” (208µg/cm²/h) necessário para manter os níveis plasmáticos em humanos (SUANPIDOKKUL *et al.*, 2004). Diversos carreadores têm sido desenvolvidos como estratégias para viabilizar a utilização de fármacos hidrofílicos pela via transdérmica.

3.2 Nanotecnologia: carreadores de fármacos

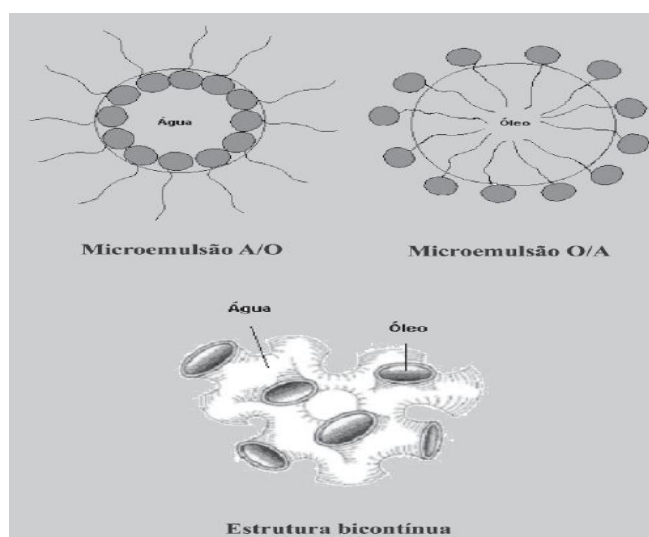
Diversos sistemas nanotecnológicos têm sido desenvolvidos para veicular fármaco pela via cutânea com o objetivo de atuar localmente nas camadas da pele ou atingir a corrente sanguínea e servir como nova rota de fármacos alternativa as vias de administração convencionais. Dentre este,

destacam-se lipossomas, nanopartículas lipídica sólida, nanoesferas, micropartículas, além dos sistemas nanoemulsionados / microemulsionados e cristais líquidos que serão discutidos neste trabalho de tese (SILVA *et al.*, 2010).

3.2.1. Microemulsões

Microemulsões (ME) podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água. Muitos fatores podem influenciar na formação da ME, como o equilíbrio hidrófilo-lipófilo dos tensoativos, tipos de óleo, técnica de emulsificação, temperatura e etc. A orientação para sistema O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo e do óleo, da relação entre as proporções de tensoativo / co-tensoativo e entre a proporção água / óleo (FORMARIZ *et al.*, 2005, SILVA, 2009b ; SILVA, 2009a).

Figura 2 – Ilustrações de microemulsão A/O, microemulsão O/A e estruturas bicontínuas.



Fonte : adaptado de Formariz (2005).

As microemulsões diferem das emulsões comuns não só por serem transparentes, mas essencialmente pela estabilidade termodinâmica. A utilização de co-tensoativos em microemulsões não é obrigatória, e sistemas microemulsionados formados na sua ausência têm sido descritos na literatura (LAWRENCE & REES, 2000; AULTON, 2005;). Dados da literatura sugerem que microemulsões A/O possam ser usadas para aumentar significativamente a absorção de moléculas hidrossolúveis (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

As microemulsões apresentam grande potencial como sistemas de liberação e de direcionamento de fármacos devido as suas propriedades de solubilizar drogas hidrofílicas em meio lipofílico ou drogas lipofílicas em meio aquoso, e anfifílicas na interface óleo/água. Em razão de sua alta proporção de substâncias tensoativas, as nanoemulsões podem interagir com o estrato córneo desestruturando a bicamada lipídica do mesmo, a permeabilidade cutânea é aumentada e a penetração de substâncias, que normalmente não passariam através dessa barreira (por exemplo, a zidovudina), ficaria bastante facilitada (PAOLINO, 2002; TROTA, 2003; ESCRIBANO, 2003; DJORDEVIC, 2004; SINTOV, 2004; KE, 2005; FORMARIZ *et al.*, 2005; RAULT *et al.*, 2010).

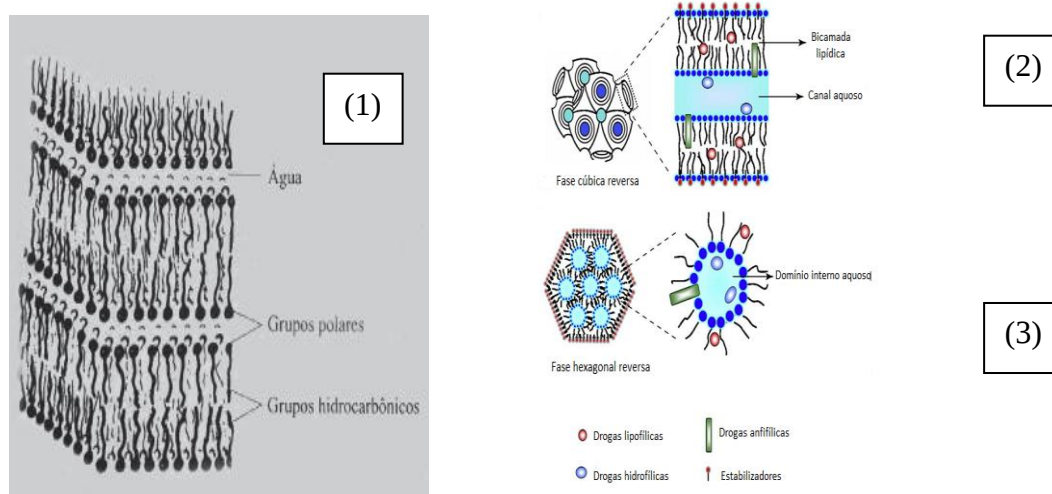
3.2.2 Cristal líquido (CL)

Os cristais líquidos designa um estado em que a matéria pode se apresentar, intermediário entre o estado sólido cristalino e o estado líquido isotrópico. São constituídos de moléculas anfifílicas e solventes e são classificados como: *termotrópicos* (variações da temperatura podem acarretar em transições – ou transformações – de fase no material e os *liotrópicos* (são misturas de moléculas anfifílicas e solventes que, em determinadas condições de temperatura, pressão e concentrações relativas dos diferentes componentes, apresentam a formação de superestruturas – agregados moleculares – que se organizam no espaço, exibindo algum grau de ordem (BECHTOLD, 2005; GUO *et al.*, 2010).

Atualmente, os cristais líquidos liotrópicos, como mesofases lamelares, cúbicas e hexagonais tem suscitado o interesse como sistema de liberação controlada de fármacos. Os cristais termotrópicos são menos estáveis, portanto pouco utilizado como carreadores terapêuticos. A figura 3 demonstra estrutura dos cristais líquidos liotrópicos.

Na fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bi ou tridimensionais. Fases cúbicas liotrópicas, por sua vez, apresentam estruturas mais complicadas de serem visualizadas, geralmente de simetria cúbica, apesar das fases romboédricas e tetragonais também serem detectadas em alguns sistemas. A fase lamelar é formada por camadas paralelas de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma rede uni ou bidimensional (LOPES, 2005; SAULNIER *et al.*, 2008).

Figura 3 – Estruturas de cristal líquido lamelares (1), cúbicos (2) e hexagonais (3).



FONTE (Adaptado de FORMARIZ *et al.*, 2005; GUO *et al.*, 2010).

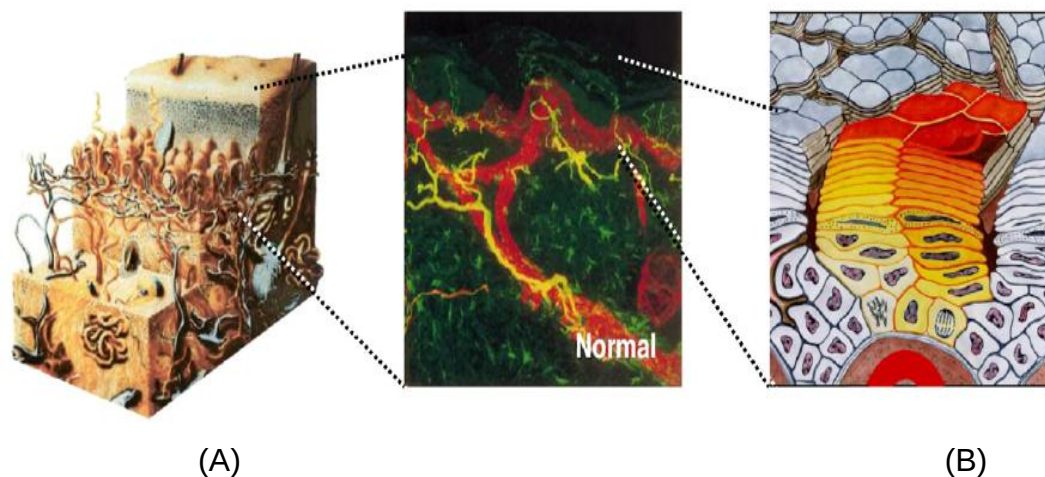
A caracterização dos sistemas microemulsionados e cristais líquidos podem ser realizados através da determinação do potencial zeta, microscopia de luz polarizada, Espalhamento de raios - X de baixo ângulo (SAXS), determinação do comportamento reológico, microscopia de transmissão eletrônica (MET), análise térmica e etc (FORMARIZ *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

3.3 A Via transdérmica e a penetração cutânea de fármacos.

A pele constitui uma via potencial de administração de fármacos devido ao fácil acesso e à sua grande superfície. Representa um dos órgãos mais extensos do corpo, cobrindo uma superfície de aproximadamente $1,73\text{m}^2$ sendo banhada por $1/3$ do sangue, correspondendo a 5% da massa corporal. Está localizada na superfície corporal, separando órgãos vitais do meio exterior, protegendo o organismo de substâncias estranhas de natureza química, física e microbiológica e impedindo a saída de compostos fisiológicos como a água. Ela desempenha também um importante papel na manutenção da temperatura corporal e na regulação da pressão sanguínea (AULTON, 2005).

Possui alta resistência, fator essencial para sua função de proteção e é constituída por três camadas, do exterior para o interior: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo ou hipoderme (Figura 4).

Figura 4. Estrutura das camadas da pele (A) e detalhe especial do processo de disposição dos queratinócitos da epiderme (B)



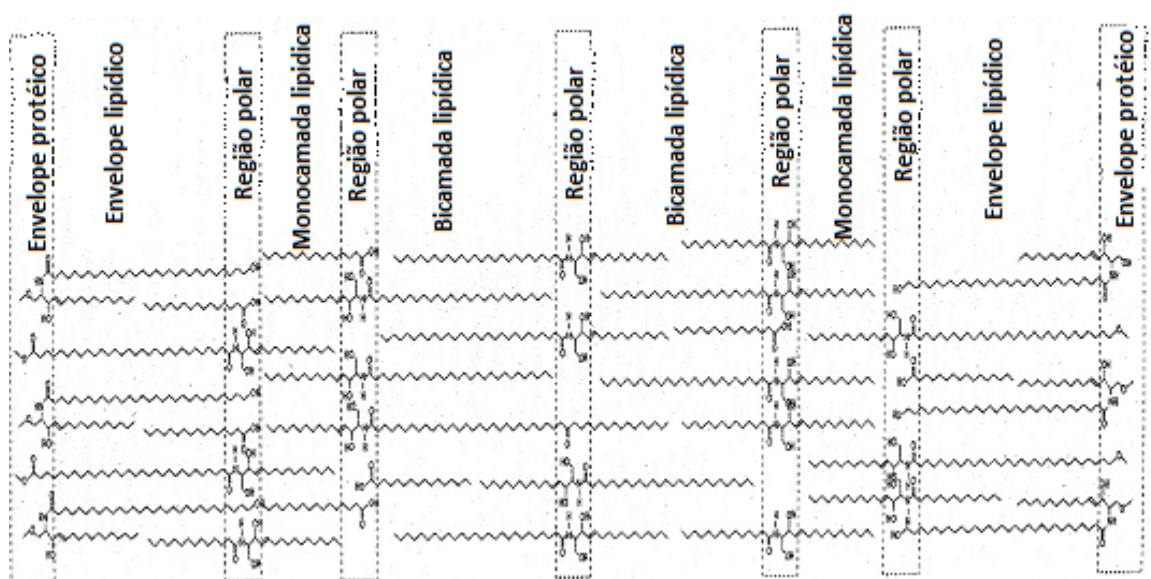
Fonte: adaptado de CEVC & VIERL (2010).

A epiderme é recoberta pela camada córnea e possui espessura entre 0,1 a 0,2 mm. Representa a principal barreira à penetração, não contém vasos sanguíneos e é formada basicamente por tecido epitelial estratificado, queratinizado ou não. Possui uma película de material emulsificado composto por complexo de sebo, suor e lâmina córnea descamativa, além de uma capa

gasosa chamada manto gasoso, constituída principalmente por vapores de água provenientes da volatilização corporal.

A epiderme é dividida em duas camadas: o estrato córneo e a epiderme viável. O estrato córneo constitui a camada mais superficial da pele e possui uma estrutura estratificada, hidrófila-lipófila, formada por células sem vitalidade chamadas corneócitos. Essas células achatadas de formato hexagonal são compostas por queratina e água envolvidas por um envelope proteico e bicamadas lipídicas sobrepostas, que incorporam água em sua estrutura, conforme figura 5. Por isso, este tecido é complexo e forma uma barreira para muitas substâncias (KAUSHIK *et al.*, 2010)

Figura 5. Disposição intercalada de envelopes lipídicos e proteicos do estrato córneo.



FONTE: adaptado de TASSOPOULOS (2006).

O estrato córneo desenvolve-se como uma membrana fina, resistente, relativamente impermeável que em geral funciona como o passo limitante da liberação transdérmica de fármacos. Toda a camada córnea, e não apenas regiões especializadas, propicia uma resistência difusional. A membrana impede que os fármacos a atravessem prontamente, mas quase todas as moléculas de baixa massa molecular a penetram em algum nível.

A epiderme viável é subdividida em quatro partes: estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato germinativo. Contém queratinócitos em vários estágios de diferenciação, melanócitos, células de Langerhans (importante no reconhecimento de antígenos e resposta imune) e células de Merkel (envolvidas na percepção sensorial).

A derme, segunda camada da pele, possui espessura entre 2 a 4 mm, sendo constituída de uma matriz de proteínas fibrosas imersas num tecido coloidal amorfo. Apresenta-se rica em capilares sanguíneos, canais linfáticos e terminações nervosas, além de conter os segmentos inferiores das glândulas sebáceas e folículos pilosos. A elasticidade da derme é atribuída às fibras proteicas presentes, incluindo colágeno (tipo I e III) e elastina.

A derme contém também fibroblastos, macrófagos, mastócitos e leucócitos. Ela executa assim, papel de sustentação e de nutrição e divide-se em duas partes: derme papilar ou tecido conjuntivo frouxo e derme reticular ou tecido conjuntivo denso (MOSER *et al.*, 2001). A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo e contém células adiposas que fabricam e estocam lipídeos, sendo responsável pelo isolamento térmico e proteção mecânica (AULTON, 2005).

A pele contém ainda, dois tipos de órgãos anexos: as glândulas sudoríparas, constituídas por um longo tubo que penetra na hipoderme, e o aparelho pilossebáceo, constituído por uma depressão cutânea (o folículo piloso ou FP), no qual o pêlo insere-se, e por uma bainha que o circunda, por onde escoar o sebo secretado pela glândula sebácea, preenchendo os espaços livres da bainha.

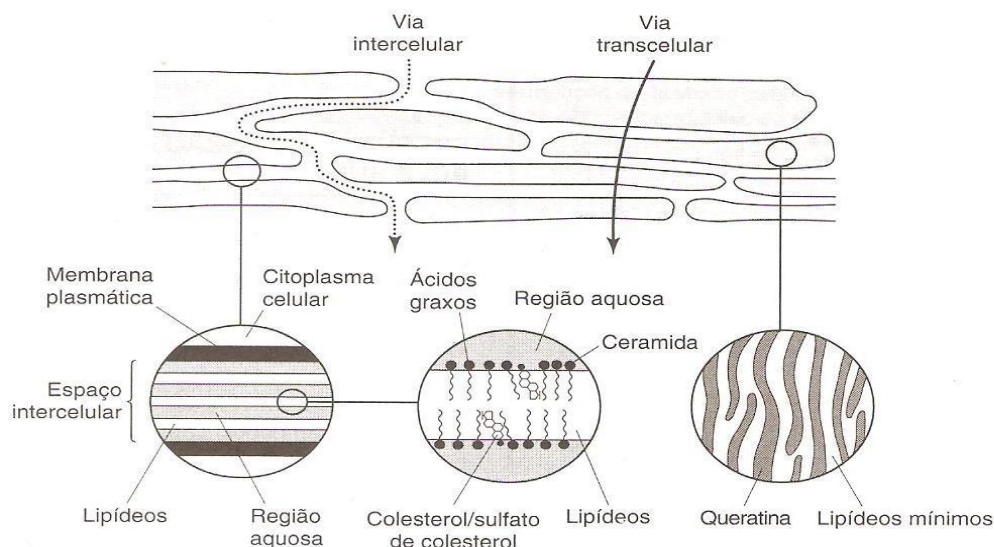
3.3.1 Rotas de permeação cutânea de compostos

De uma forma geral, a permeação das camadas que formam a pele ocorre por difusão passiva através de três vias: a via transepidérmica, que compreende a penetração transcelular (através das células), a penetração intercelular (entre as células), e a via apêndice (através dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas) (Figura 6). Contudo, a via apêndice possui área superficial bastante pequena, correspondendo a aproximadamente 0,1% da

superfície da pele e, segundo alguns autores, contribui, de forma insignificante para a penetração das substâncias na pele (SUHONEN *et al.*, 1999).

As bicamadas lipídicas da via intercelular são consideradas como o caminho principal para a permeação de moléculas na pele e, em geral, a difusão é passiva, governada por leis físico-químicas, nas quais o transporte ativo não exerce qualquer papel.

Figura 6. Representação da membrana do estrato córneo, ilustração de duas possíveis microrrotas de permeação (AUTON, 2005).



Fonte: AUTON, 2005.

Na via intercelular, a distância difusional percorrida pelas moléculas é muito maior que a espessura do estrato córneo (10-20 μ m) e tem sido estimada em aproximadamente 500 μ m. Além disso, esse espaço intercelular contém lipídios estruturados, por isso o fármaco tem que atravessar uma variedade de domínios hidrofílicos e lipofílicos antes de alcançar a epiderme viável (HADGRAFT, 2004). Por outro lado, na via intracelular, as moléculas atravessam diretamente o estrato córneo e a barreira limitante é a bicamada lipídica que também deve ser atravessada.

A via apêndice possui área superficial bastante pequena, correspondendo a aproximadamente 0,1% da superfície da pele e, segundo alguns autores, contribui, de forma insignificante para a penetração das

substâncias na pele. Contudo, ela sido utilizada para o transporte rápido de várias moléculas, incluindo principalmente algumas macromoléculas e íons, já que os apêndices oferecem poros criando um desvio à barreira do estrato córneo (SUHONEN *et al.*, 1999, BARRY, 2004). Desta forma, as três vias não são utilizadas isoladamente e, a maioria das moléculas, atravessam o estrato córneo utilizando uma combinação delas.

Então, embora a pele constitua uma barreira muito eficaz, ela pode ser atravessada por pequenas quantidades de substâncias capazes de penetrar nas camadas córneas e, em alguns casos, chegar a uma absorção sistêmica. Nesse processo, o estrato córneo constitui a principal barreira, enquanto a epiderme e a derme se comportam como um gel aquoso, apresentando assim, efeito reservatório.

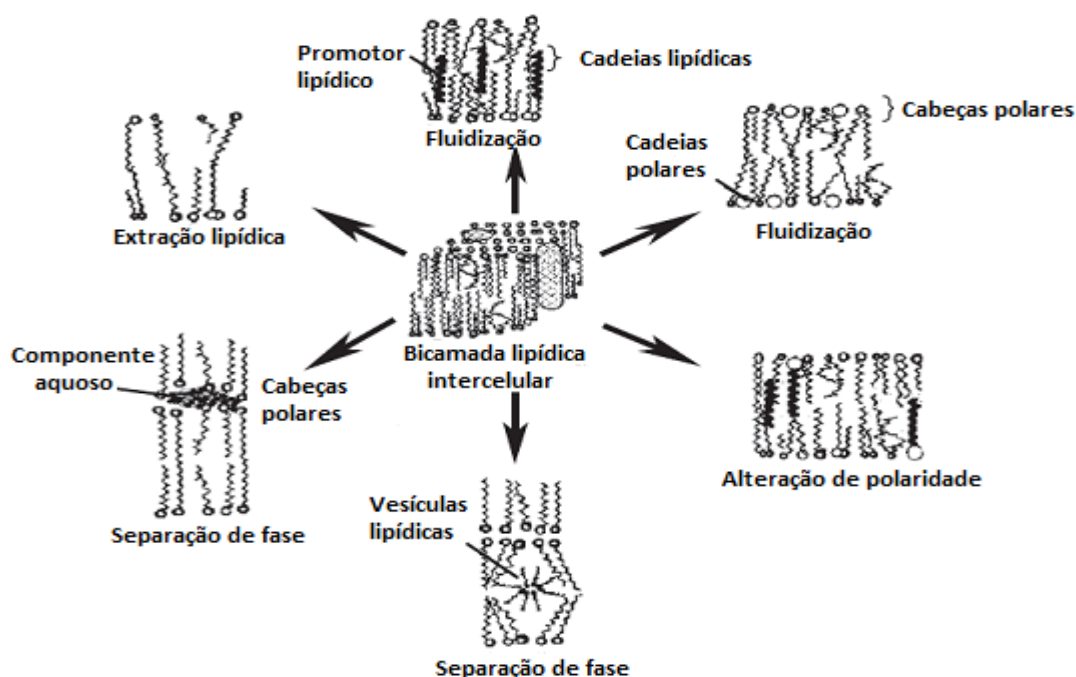
As doses diárias passíveis de absorção pela pele são bastante baixas, o que requer a administração de fármacos de grande potência para obtenção do efeito desejado. Além disso, um bom fármaco para administração cutânea deve possuir baixa massa molecular, boa solubilidade em água e em óleo e não deve ser irritante ou sensibilizante cutâneo. Contudo, várias estratégias para promoção da permeação cutânea estão disponíveis, tais como a utilização de promotores químicos e sistemas de liberação. Por isso, é importante conhecer exatamente o grau de permeação, pois para determinados princípios ativos, uma baixa permeação pode resultar em ineficácia terapêutica enquanto uma permeação maior pode provocar intoxicações (BONNABRY,1999).

3.3.2 Promotores de permeação cutânea

Conforme LEONARDO & CHORILLI (2008), as estratégias para potencializar a passagem do fármaco nas camadas da pele são através de método físicos, como iontoforese e fonoforese ou através de substâncias químicas, como terpenos, ureia, etanol, solventes, tensoativos e etc. Os promotores químicos são substâncias presentes nas formulações com o objetivo de aumentar o fluxo de penetração cutânea de fármacos (AQIL *et al.*, 2007). Entretanto, estes componentes não podem interferir de forma negativa

na estabilidade da preparação, com outros componentes da forma farmacêutica, nas características sensoriais, além de possuir baixa capacidade de causar irritação cutânea após aplicações sucessivas. Os principais mecanismos estão descritos na ilustração abaixo (Figura 7):

Figura 7 - Mecanismo de permeação cutânea de diversos promotores com efeito na bicamada lipídica do estrato córneo.



FONTE: adaptado de BARRY, 2004.

Durante a fase de desenvolvimento de produtos dermatológicos é adequado empregar procedimentos de liberação *in vitro* para selecionar excipientes para as formulações que possam proporcionar uma atividade terapêutica adequada. Pode-se considerar que os estudos de liberação medicamentosa proporcionam dados valiosos sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste em liberar os fármacos que estão sendo carregados (CARVALHO, 2007; LIRA *et al.*, 2008).

O Etanol ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH}$) é um promotor de permeação química utilizado em preparações transdérmicas, sendo encontrado em sistemas adesivos ou com a função de co - solvente com a água para assegurar as

condições *sink* durante estudos de permeação cutânea *in vitro*. Este promotor já foi utilizado para aumentar o fluxo de permeação de diversos fármacos. A permeação de etanol no stratum corneum pode alterar as propriedades de solubilidade do tecido com uma consequente melhoria para particionamento do fármaco através da membrana, aumento da atividade termodinâmica do fármaco na formulação e promover a extração de frações de lipídeos em concentrações mais elevadas na formulação, conforme a Figura 7 (Williams & Barry, 2004).

Além do etanol, diversos óleos essenciais, terpenos e terpenóides, também, são usados como promotores de permeação cutânea, como por exemplo: óleo de eucalipto, ylang-ylang, chenopodium, d-limoneno, 1,8 – cineol, carvona, geraniol. São promotores de permeação com baixa toxicidade e irritabilidade. Estes agentes se particionam e interagem com os constituintes do estrato córneo e induzem temporariamente e reversivelmente a permeabilidade na pele (KANG *et al.*, 2007; NOKHODCHI *et al.*, 2007).

A uréia além de ser usada como agente hidratante da pele, CONFORME também pode ser empregada como promotora de absorção cutânea, pois aumenta a penetração de outras substâncias ativas incorporadas na mesma formulação. Sabe-se também que a absorção da uréia na pele humana normal e danificada é de $9,5 \pm 2,3\%$ e $67,9 \pm 5,6\%$, respectivamente, e que a uréia pode atravessar facilmente a barreira placentária. Assim, segundo o FDA, a concentração de uréia nas formulações de produtos cosméticos hidratantes não deve ultrapassar 10 % uréia.

3.5 Ensaio de Permeação cutânea *in vitro*

Os estudos de permeabilidade cutânea *in vitro* são realizados através de câmaras de difusão que mimetizam a aplicação de medicamentos na via cutânea. Estes ensaios são importantes para verificar o desempenho de formulações nas diversas camadas da pele, com isso investigar a capacidade do fármaco de atingir sítios de ação local ou alcançar a grande circulação sanguínea. Diversos pontos são importantes devem ser levados em consideração para a realização adequada destes experimentos. Dentre eles, o

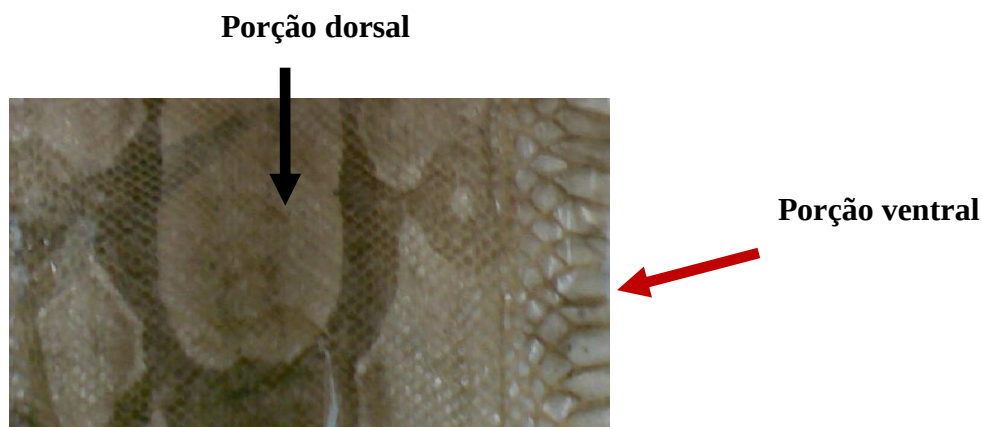
tipo de membrana, a solução receptora, o método de quantificação do fármaco e os parâmetros de permeação cutânea (LIRA *et al.*, 2008; PRAÇA, 2010).

3.4.1 Membranas utilizadas em ensaios de permeação cutânea *in vitro*.

A membrana utilizada em experimentos de permeação cutânea *in vitro* possui a função de interface entre a formulação (compartimento doador) e a solução receptora (compartimento receptor). Esta membrana simula a via cutânea como rota de utilização de fármacos. Os principais tipos de membranas são as seguintes: artificiais (acetatoftalato de celulose, nitrato de celulose, polissulfona e silicone) ou naturais (pele humana, pele de rato, pele de cobra, pele de orelha porco, pele de macaco (*Rhesus*). Quando são utilizadas membranas sintéticas / artificiais estes ensaios possuem o objetivo de avaliar a liberação do fármaco da forma farmacêutica ou do sistema de liberação, portanto é denominada de cinética de liberação *in vitro* e objetivam avaliar parâmetros cinéticos que possam caracterizar o sistema que está sendo avaliado (LEONARDI & CHORILLI, 2008; STORPIRTIS *et al.*, 2009)

A pele de cobra é utilizada quando se investiga a alteração biofísica de formulações ou promotores de permeação cutânea. Ela é composta uma camada de beta - queratina mais externa, uma camada de alfa-queratina intracelular e uma camada lipídica intercelular, que formam uma camada intermediária. Existe, ainda, uma terceira e última camada de alfa - queratina mais interna. A camada intermediária é subdividida em três subcamadas de estrutura multilamelar. Considerando a composição, disposição lipídica e o fluxo de evaporação de água, o estrato córneo humano e a pele de cobra apresentam similaridades importantes que credenciam a pele deste animal como modelo alternativo de estrato córneo, conforme figura 8. (BABY *et al.*, 2008).

Figura 8 - Fotografia de uma pele de cobra de Jibóia (*Boa constrictor*) evidenciando duas regiões: (A) porção dorsal e (B) porção ventral.



FONTE: Arquivo pessoal

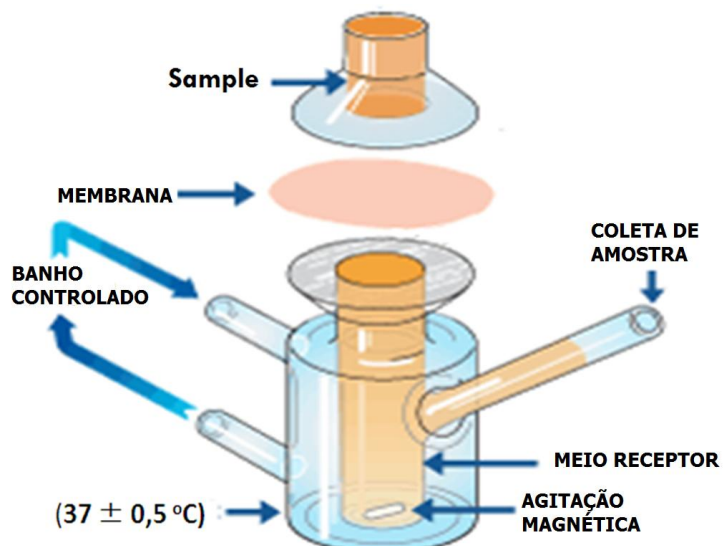
A pele de diversas espécies de cobra (*Crotalus durissus* e *Boa constrictor*) é utilizada na investigação de substâncias hidratantes, efeito de tensoativos e a investigação do mecanismo de permeação cutânea *in vitro*. Associada a ensaio de permeação com esta pele, diversas técnicas biofísicas têm sido utilizadas para elucidação de alterações nos estratos lipídicos e proteínas presentes nestas membranas, dentre elas: Infravermelho com transformada de Fourier – FTIR, análise térmica (DSC, DTA) e espectroscopia RAMAN (NUNES *et al.*, 2005; BABY *et al.*, 2006; BABY *et al.*, 2008).

A elucidação do mecanismo de promotores cutâneos poderá utilizar FT-IR como ferramenta para investigar as alterações na membrana do estrato córneo. Estudo espectroscópico vibracionais tem sido utilizado para o conhecimento de alterações em biomoléculas após mínimas perturbações nas membranas biológicas. Os lípidos e as proteínas possuem vários grupos químicos funcionais que permitem o controle da interação de componentes associados com o sistema de membrana. Modos vibracionais refletidos, em geral, no grupo químico funcional promove alongamento e flexão movimentos das ligações. Além disso, ligações de hidrogênio e outras interações entre proteínas, lipídeos, outros componentes da membrana podem ser observados como efeito a ampliação, mudanças de frequência de pico e de divisão de recursos espectrais (LEE & CHAMPMAN, 1986; SCHULTZ & LEVIN, 2011).

3.4.2 Célula de difusão e aspectos relevantes de ensaios de permeação cutânea *in vitro*.

A célula de difusão é composta da seguinte estrutura: Compartimento receptor (local onde é inserida a amostra da preparação), compartimento receptor (revestida com banho com temperatura controlada, meio receptor e coletor de amostra), conforme figura 9. Alguns detalhes devem ser considerados na realização destes ensaios, como: a escolha adequada da membrana. Vários pontos são importantes a serem considerados para avaliação *in vitro*, como a temperatura de $37 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a solubilidade do fármaco no meio receptor (manutenção das condições “sink”), intervalo das coletas de amostra, método de quantificação adequado, agitação contínua e etc.

Figura 9 - Estrutura de uma célula de difusão tipo Franz



FONTE: Adaptado de Silva (2009).

3.4.3 Parâmetros de permeação cutânea

Os parâmetros de permeação cutânea avaliados, em geral, nestes experimentos são os seguintes: quantidade liberada ao final do experimento

(Q_{final}); fluxo de liberação na porção linear do perfil ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), tempo de latência (lag time), coeficiente de permeabilidade (K_p) e o modelo cinético (ordem zero, modelo de Higuchi e primeira ordem). Todos estes parâmetros são obtidos do perfil de permeação cutânea que relaciona o tempo de experimento e a concentração permeada no meio receptor da câmara de difusão, na porção linear do perfil após a obtenção do estado de equilíbrio (*steady state*).

Capítulo II

Antigo I - Evaluation of microemulsion and lamellar liquid crystalline systems for transdermal Zidovudine delivery – a ser submetido a *Colloids and Surface B*

Evaluation of microemulsion and lamellar liquid crystalline systems for transdermal Zidovudine delivery

A. L. M. Carvalho^{1*}, J. A. Silva², A. A. M. Lira³, T. M . F. Conceição³, R. S. Nunes³, R. L. C. Albuquerque Junior⁴, V. H. V. Sarmiento, D. P. Santana¹

¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético, Departamento de Ciências Farmacêuticas (NUDFAC) – UFPE, Av Professor Moraes Rêgo s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Campus Universitário, Rua Juvêncio Arruda s/n, Bodocongó , CEP 58100-001, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

³Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico, Departamento de Fisiologia - UFS, Cidade Universitária Profº Aloísio de Campos, Av Marechal Rondon s/n, Jardim Rosa Elze, 49.100.000, São Cristóvão, SE, Brasil.

⁴Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural, Instituto de Tecnologia e Pesquisa - UNIT, Av Murilo Dantas, 300, Farolândia, 49032-490, Aracaju, SE, Brasil.

⁵Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química – UFS, Campus Alberto Carvalho, Av. Vereador Olímpio Grande s/n, 49.500 – 000, Itabaiana, SE, Brasil.

*Corresponding author: Tel: +55 86 32155953 / 33026590; fax: +55 86 3215595233026591. E-mail address: aluismenezes@yahoo.com.br (A. L. M .Carvalho).

ABSTRACT

This work aimed the investigating of colloidal carrier systems containing AZT for transdermal administration. Microemulsion (ME) and lamellar liquid crystal systems (LP) were obtained and selected from pseudoternary diagrams previously developed. These systems are characterized by determining the droplet size, zeta potential, pH, rheological behavior and light scattering at small angle (SAXS). *In vitro* permeation study (using pig ear skin) and *in vivo* skin irritation (using mice) were performed. As a result of the physic and - chemical characterization of both colloidal carrier systems, we observed the increase in the diameter of the droplets after the AZT addition; however, they remained stable, homogeneous and isotropic. In the permeation study, the amount of permeated drug was higher for ME compared to the control and LP, obtaining enhanced permeation effect on the order of approximately 2-fold $P < 0.05$. The microscopic examination suggested few histological changes in the skin of animals treated with ME compared to the control group (hydrogel). Thus, ME proved to be adequate with promising effects, being able to promote the drug permeation without causing apparent skin irritation. On the other hand, LP functioned as a drug reservoir reducing its partitioning into the skin, thereby reducing its permeation.

Keywords: microemulsion, lamellar liquid crystal, transdermal administration, zidovudine, antiretroviral therapy.

4.1 INTRODUCTION

The Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is the clinical symptoms and/or laboratory results that indicate immune deficiency caused by infection with the Human Immunodeficiency Virus (HIV), which takes on average eight years to manifest [1]. Several classes of drugs have been developed to inhibit the viral replication, such as protease inhibitors, nucleoside reverse transcriptase inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Besides these, most recently the fusion inhibitors that inhibit the HIV virus fusion in lymphocytic cells for inhibiting fusion of viral and cellular membranes [2,3]

However, many retroviral agents (ARV) have relatively short half-life that results in frequent dosages and drug fluctuations in the plasmatic levels. Furthermore, the long-term use of antiretroviral medications is required, since the agents currently used are unable to completely remove the HIV virus [3].

Zidovudine (3-azido - 3 - oxidimetilamine) (AZT) was the first anti-HIV compound approved for clinical use and it is currently widely used for antiretroviral therapy. However, during therapy, there is a crucial point: the systemic drug maintenance under the therapeutic levels during the treatment in order to ensure its effectiveness and safety, once side effects such as myelosuppression, macrocytic anemia, neutropenia and thrombocytopenia are usually associated with this molecule. Other rare effects, but important, include myopathy, hepatomegaly with steatosis and lactic acidosis, in addition to anaphylaxis [3]. Furthermore, the drug has short half-life (01 hours) and low bioavailability due to the first-pass effect after oral administration and higher doses are often required to maintain the therapeutic levels [4, 5,6] . Therefore, the need for optimization of therapy or drug administration through an alternative via to the oral administration arises to avoid such effects after oral administration of zidovudine.

Among the alternatives, the transdermal route is indicated in cases of low bioavailability after oral administration and considerable first-pass effect in the liver, allowing the maintenance of therapeutic levels, fewer complications

and greater patient compliance to the treatment. In addition, transdermal route can be an alternative administration to children. However, AZT is a hydrophilic molecule with difficulty in overcoming the *corneum stratum* barrier. Thus, strategies have been investigated for promoting the skin drug penetration such as the use of iontophoresis [7] and chemical promoters, such as: l-menthol, 1,8 cineol, ethyl alcohol, propylene glycol and mixtures of solvents with alcohol / isopropyl myristate, fatty acid and terpenes [5,6]. These alternatives do not use organized systems and have low skin irritation potential, since they have been associated with high ethanol concentrations or irritation promoters [8].

Several studies suggest that the colloidal carriers, such as microemulsions (ME) and Lamellar Liquid Crystals, have potential to increase the skin penetration of hydrophilic or lipophilic drugs compared to conventional vehicles [9,10,11]. Microemulsions and lamellar phase systems are used for dermal or transdermal release of hydrophilic drugs, once due to their nature it would not have easily to penetrate the skin passively without the aid of physical or chemical promoters. This penetration can be attributed basically to two different mechanisms: 1) the high surfactant concentration gradients promoted by their solubilizing power without, however, increasing the vehicle affinity by the drug and 2) the potential skin penetration promoter of individual constituents [12,13].

Therefore, this paper aims to compare the different colloidal carriers (microemulsion and lamellar liquid crystal) containing AZT for transdermal application of the standard hydrophilic drug (AZT). The promoting effect of these systems and skin irritation *in vivo* were also investigated.

4.2 MATERIAL AND METHODS

4.2.1 Material

The zidovudine used (Northeast® batch DY070040, 97.8% content) was donated by the Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco (Brazil - LAFEPE); Miristrato isopropyl was acquired from Henrifarma (Brazil); PEG-8 capric / caprylic glyceride (Labrasol®) and polyglyceryl 6-dioleate (Oleic Plurol®) used in the preparation of microemulsions were donated by Selecthimie / Gattefossé

(France); all solvents used in HPLC quantification were HPLC grade. Other solvents and reagents were of analytical grade and obtained from national suppliers.

4.2.2 Preparation of the microemulsion (ME) and lamellar liquid crystal (LP)

4.2.2.1 - Preparation of formulations

Formulations were obtained by mixing specific proportions of surfactant/co-surfactant (Labrosol® and oleic plurol®), the oil phase (miristrato isopropyl) and the aqueous phase under magnetic stirring at room temperature, proportions are described in Table 1. The formulations are derived from pseudoternary diagrams previously developed by our research group and published in Silva *et al.* (2009) [12].

TABLE 1 Formulations composition selected for this study.

Components	ME (%)	ME- AZT (%)	LP (%)	LP - AZT (%)
Labrasol®	30.0	30.0	35.3	35.3
Plurol Oleique®	10.0	10.0	17.6	17.6
Isopropyl Myristate	10.0	10.0	5.9	5.9
Zidovudine	0,0	2.5	0,0	2,5
Water	50.0	47.5	41.2	38.7

The incorporation of zidovudine (2.5%) was performed after forming the ME and LP. Each formulation remained in equilibrium for 48 hours for further characterization. Formulations with and without drug were evaluated throughout this work.

4.2.3 Physicochemical characterization

The formulations were evaluated visually after preparation. The pH of formulations was evaluated using a digital potentiometer with glass electrode and Analion AM 608 temperature sensor previously calibrated with buffer solution at pH 4.0 and 7.0 and 25 °C.

The isotropic systems without dilutions were submitted for determining the size / distribution of droplet size using techniques of dynamic light scattering with the equipment Zetasizer Nano ZS system (Malvern, UK). The samples were placed in a quartz cell of 1 cm of optical path and measurements were taken at room temperature (25 °C). Measurements were performed in the presence and absence of drug, with three (03) authentic repetitions. The determination of the zeta potential was performed by analysis of dispersion in the same equipment.

The rheological behavior of the formulations was evaluated using a rheometer HAAKE brand, model RS1, software Rheowin 3.5 and plate Palca PP-35Ti geometry, gap 0.2 mm, shear rate of 0-200 and 200-0, time 300 s at 25 °C.

4.2.3.1 SAXS

The scattering of X-rays at small angle (SAXS) was carried out at the D11-A SAXS measurements station of the Síncontron Light National Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil), equipped with an asymmetrically CUT and bent Si (111) monochromator (at room temperature). The scattering intensity $I(q)$ was expressed in arbitrary units and the parasite scattering (scattering of particles in the system without sample) was subtracted from the total intensity [14].

4.2.4 Skin permeation and retention tests

4.2.4.1 Skin Preparation

The pig ear skin was used as model in the *in vitro* permeation / retention studies. Thus, the outer ear skin and cartilage from animals recently sacrificed at local slaughterhouse was removed with the aid of a scalpel and tweezers, followed by removal of excess fatty tissue in the skin. The skin sections were frozen for up to one month prior use in the assay.

4.2.4.2 In vitro Skin Permeation and Retention studies

The *in vitro* permeation experiments ($n = 4$) with dorsal skins of pig's ears were performed using modified Franz diffusion cells.

The pig ear skin was placed in the diffusion cell with the dermis directed to the receptor solution: buffer phosphate isotonic at pH: 7.4 (0.2 M). About 400 μL of test formulation or AZT in buffer phosphate (control) was placed over the entire skin area, avoiding the formation of bubbles between the preparation and skin. The experiments were conducted at 37°C and the receptor solution was under constant stirring at 300 rpm using a magnetic stirrer [13]. After pre-determined times of 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours, aliquots of the receptor solution were collected for zidovudine quantification.

At the end of permeation experiment, the skins were removed from the diffusion cell for studying the coetaneous retention. The excess formulation in the skin was removed with distilled water and dried with paper towels. The skins were then fixed on a flat surface with *corneum stratum* (EC) facing up, stuck with pins and covered with "templates", leaving exposed only the permeation area. Successive adhesive tapes (15 tapes) were applied to complete removal of the *corneum stratum*.

Adhesive tapes containing EC were united and placed in extraction tubes containing 4.0 ml organic solvent at various proportions and stirred at mixer for 1 minute. They were then left for 30 minutes in ultrasound bath and filtered through a $0.45\ \mu\text{m}$ pore membranes (Millipore®) [15]. The determination of azt retained in EC was performed by high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection (HPLC - UV).

The remaining skin tissue was triturated and after addition of 4.0 mL of organic solvent was stirred in mixer for 1 minute, similar to that previously reported. Subsequently, it was subjected to ultrasound bath for 30 minutes for cell lyses (Lira et al., 2008). The mixture was then filtered through a $0.45\ \mu\text{m}$ pore membrane (Millipore®) and the antiretroviral concentration determined by HPLC - UV.

4.2.4.3 Analysis of Data Obtained in Skin Permeation Experiments

The flow values ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) were calculated from the angular coefficient of the line equation obtained by the linear portion of plot of permeated drug amount ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) per time. The ratio for promoting permeation (PR) was

obtained from the comparison of the total permeated amount of test formulation with the control.

4.2.5. Analytical Method

4.2.5.1 - High performance liquid chromatography (HPLC)

The analyses were performed by HPLC Perkin Elmer Series 200® device equipped with pump series 200 and UV / VIS (270 nm) detector, Series 200. The isocratic chromatographic separation was carried out at controlled room temperature (25°C) with a C18 column with 4.0 x 12.5 mm and 5 µm particle size. The mobile phase initially composed of methanol and water (30:70, v / v) being filtered, decarbonated and pumped at a rate of 1.3 ml / min. Under such conditions, the AZT retention time was 4.6 min. When AZT solutions were injected, the linearity was achieved over the concentration range from 0.5 to 50.00 µg/mL, with correlation coefficient (r) of 0.999. The coefficient of variation was less than 5%. These values are considered adequate for an analytical method.

4.2.6 Dermal Irritation Test

The skin irritation studies were conducted using female mice of approximately 30 g and aged 6-10 weeks, obtained from the vivarium of the ITP / UNIT / SE after approval by the local Ethics Committee. In the vivarium, animals were kept in individual cages. The environment was conditioned with air conditioning at 25 °C and exhaust fan connected to every 60 minutes. It was maintained the day / night cycle, food and water ad libitum, which were changed every three days. The sawdust was also changed every three days.

The mice had the dorsal region shaved and then animals were divided into two groups: Group I (control) and Group II (test). Animals in Group I (N = 05) received daily applications with Natrosol gel (hydrogel) for 4 consecutive days and the animals in Group II (N = 05) received daily applications with the test formulation for 4 consecutive days. 24 hours after the last administration, animals were euthanized and dorsum skin was removed and handled. Subsequently, histological sections were obtained, stained and analyzed under optical microscope, being evaluated the following parameters as characteristic

events of inflammatory reaction: swelling, thickening of the epidermis and migration of inflammatory cells in the tissue [16, 17].

For the average thickness of the epidermis of animals under study, cuts were focused on the optical microscope Olympus CX31 with a 100x magnification, and images were captured by digital camera (Olympus Imaging Corp. Digital Camera model no. C-7070 Wide Zoom) and transferred to the computer where readings were made using image analysis software image J version 1.4.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1. Physical and chemical characterization of formulations

Table 2 describes the results obtained in the physical and chemical characterization of the two formulations with and without drug. All formulations obtained with and without zidovudine remained clear, translucent and without the presence of sediments, with mean droplet diameter ranging from 128 to 132nm

There was increase in the mean droplets diameter after AZT addition, as shown in Table 2. The incorporation of certain drugs on ME carriers systems may have influence on the diameter and distribution of droplets. A significant increase in the droplet size and the dispersion index of dispersions previously obtained after extemporaneous incorporation of drug may be attributed to a probable interaction between the surfactant and the drug [18].

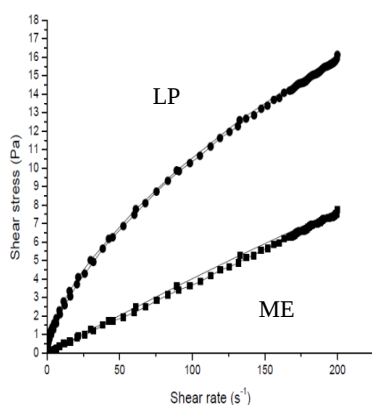
TABLE 2: Data on the physical and chemical characteristics of formulations with absence or presence of zidovudine

Tests	Without Drug		With Drug	
	ME	LP	ME	LP
Macroscopic aspects	Limpid	Limpid	Limpid	Limpid
pH	6.570 ± 0.13	6.780 ± 0.03	5.840 ± 0.12	5.900 ± 0.04

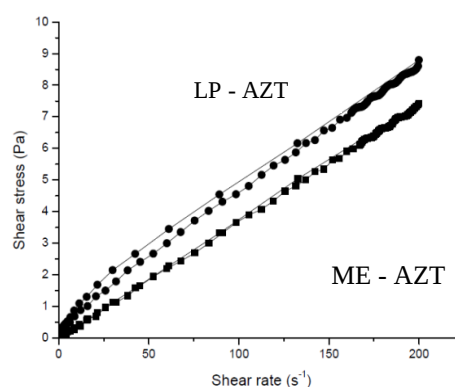
Zeta Potential (mV)	0.613 ± 0.07	-0.028 ± 0.01	0.562 ± 0.03	-0.245 ± 0.09
*IPD	0.388 ± 0.01	0.414 ± 0.04	0.360 ± 0.01	0.233 ± 0.01
Droplet size (nm)	94.82 ± 4.50	74.77 ± 6.22	132.33 ± 3.39	132.9 ± 1.71

*IPD – Polydispersity index.

Overall, the optimal pH of a formulation is standardized according to the pH stability of the active components used and the skin's biological tolerance to products (5.5 to 8.0) [15]. The formulations obtained in this study were consistent with the skin pH. However, pH decrease was observed after adding the drug as shown in Table 2, which may be associated with the AZT acid character. The zeta potential is a parameter is influenced in particular by the physical and chemical properties of surfactants present in the lamellar and microemulsion systems. In this study in particular, non-ionic surfactants are used and that the zeta potential is positioned around zero regardless of the drug presence at the different compositions evaluated [19]. The pH of formulations is related to the zeta potential value of, and according to the literature, the zeta potential tends to change with the pH [20]. Table 2 shows that the zeta potential obtained does not have values above those recommended and there was a slight pH influence on the zeta potential results obtained.



(a)



(b)

Fig. 1. Rheological behavior of microemulsion formulations obtained by the graphs (a) ME without AZT and LP without AZT and (b) LP with AZT and ME with AZT.

Figure 1 shows the rheological profile of the samples and the correlation between shear speed and shear rate. According to the plot (Fig.1.), the ME formulation does not present the thixotropy phenomenon, once there is no hysteresis area on the ascending and descending curves. Moreover, there is a linear relationship between the variables of shear, which is characteristic of materials with Newtonian flow. However, higher viscosity and a non-linear ratio of shear variable were observed in the LP formulation, being characterized as non-Newtonian and thixotropic system. This feature is typically found in liquid crystal.

The SAXS results are shown in Figure 2 suggesting that the LP formulation has lamellar structure, since the "q" ratio between the first and second peak is equal to 2. However, the presence of the drug provided a subtle disruption. The ME formulation showed broad and symmetrical peak characteristic of a microemulsion system. Its organization and internal structure remained unchanged after the AZT addition, where only a slight reduction in the "q" value was observed and seems to be related to the increased size of droplets in the presence of the drug. These data corroborate the rheology results found in this study.

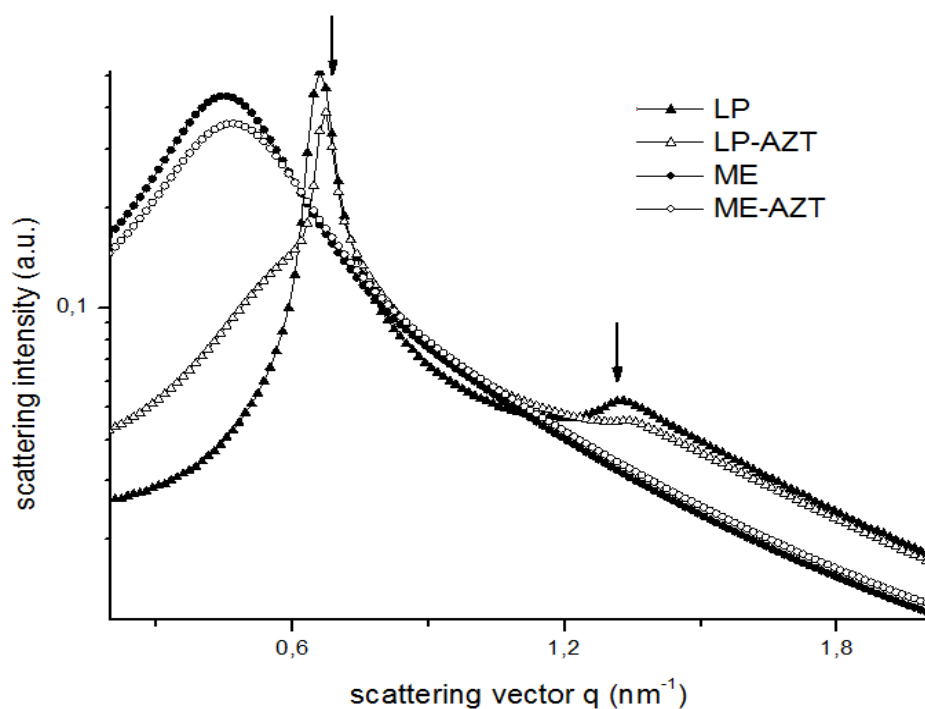


Fig. 2 SAXS analysis for the microemulsion formulations (ME and ME – AZT) and lamellar phase (LP and LP-AZT).

4.3.2. *In vitro* evaluation of Skin Permeation and Retention

Figure 3 shows the cumulative amount of zidovudine in the skin layers and receiver medium after the experiments for skin permeation. The amount of drug retained in the *corneum stratum* was higher in the control treatment. On the other hand, among the tested formulations, the drug amount in the receptor medium was much higher for the ME formulation.

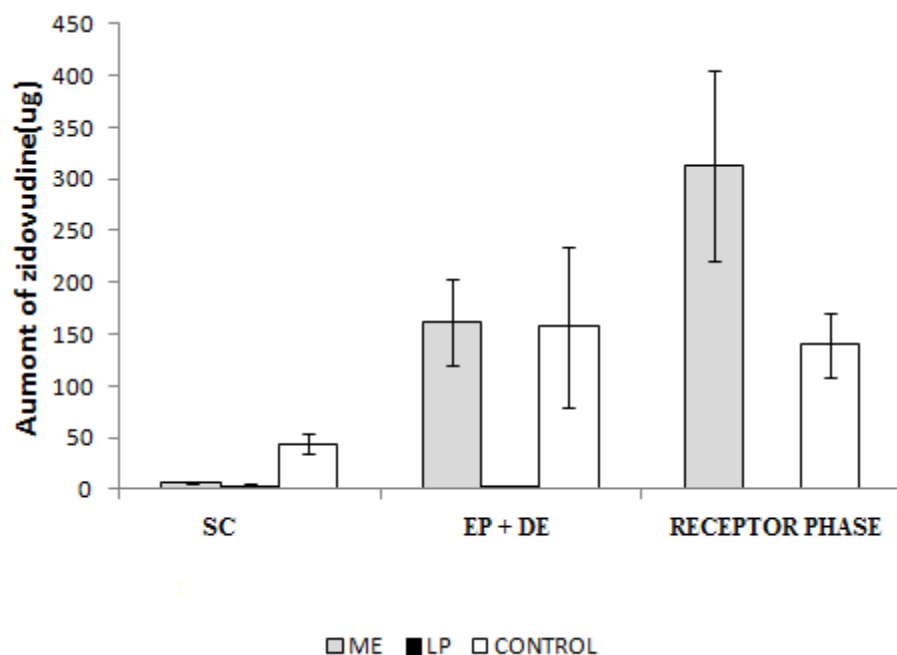


Fig 3. AZT distribution in the pig ear skin layers after 24h (*corneum stratum) carried out in solution (control), microemulsion (ME) and lamellar liquid crystal (LP). Legend: SC (corneum stratum), EP (epiderm) and DE (derm).

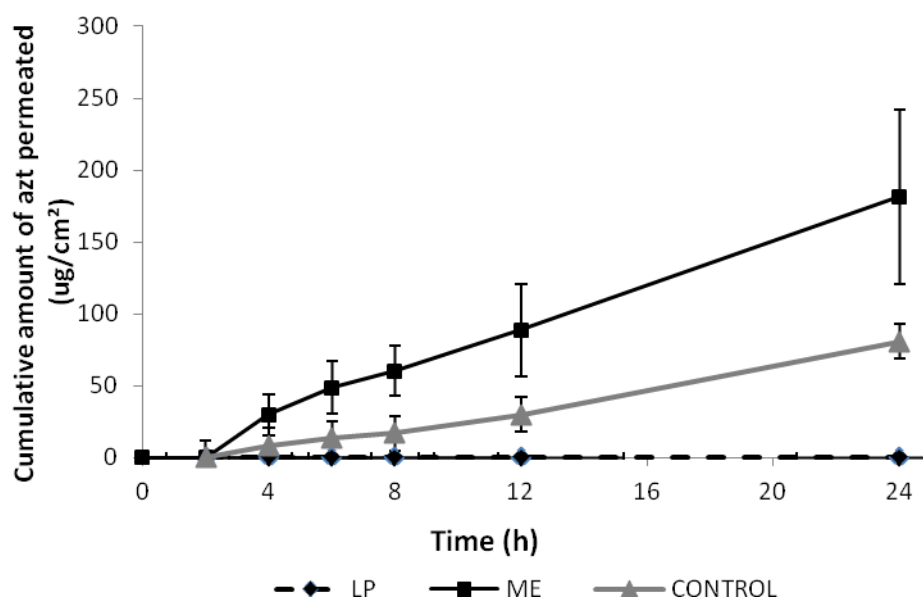


Fig 4. Zidovudine permeation profile from two tested formulations (ME and LP) and the Buffer solution (n = 4). Legend: SC (Corneum stratum), EP (Epiderm) and DE (Derm).

According to Figure 4 and Table 3, ME showed significant permeation enhancing effect (PR = 2.2). These results are in agreement with those in the literature, which suggests that due to their high proportion of surfactants, the microemulsions could interact with the *corneum stratum* skin breakdown in lipid bilayer. Thus, the skin permeability is then increased and the penetration of substances that usually do not pass through the barrier (eg, AZT), would be greatly facilitated [20- 26] However, different results were observed for the lamellar liquid crystal system, LP, which has higher concentration of surfactants than ME formulation. This could be explained by the higher viscosity and the relative organization of the LP crystalline formulation, whose lamellar structure probably results in slow drug release. The LP formulation functioned as a drug reservoir reducing its partitioning into the skin, thereby reducing its permeation. Other studies have shown similar results, whose lamellar phase functioned as a reservoir of selected drugs [26].

TABLE 3

Parameters of transdermal permeation of zidovudine in the pig skin obtained from different formulations.

Formulations	Flow _{ss} µg/Cm ² (SD)*	RP	Permeated amount (µg) (SD)
LP	-	-	-
ME	7.45(± 1.12)	2.24	312.98(±91.81)
Control	3.84 (±1.00)	1.00	139.59(±31.52)

*Values in parenthesis are standard deviation SD (n = 4).

Table 3 shows that the amount of permeated drug and flow were significantly higher for the ME formulation compared to control, thus promoting a 2 - fold effect on the skin permeation (P <0.05).

4.3.3 Evaluation of Skin Irritation

The microemulsion that promoted the transdermal AZT permeation (ME) was evaluated for skin irritation in mice. Figure 5 shows photomicrographs illustrating the skin tissue treated with daily applications of 200 μ L ME and hydrogel without drug (control) for 4 consecutive days [17].

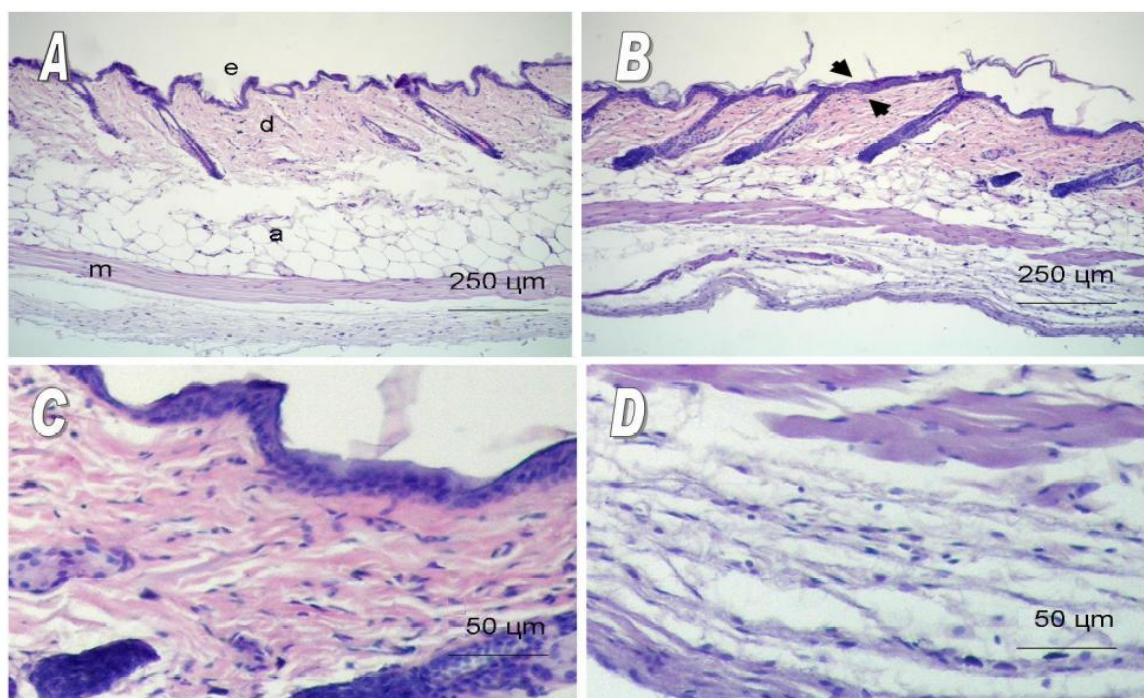


Fig 5. Photomicrograph showing the skin treated with Natrosol gel (control) (A), ME (B). Photo B shows slight increase in the epidermal thickness (C), and mild inflammatory infiltrate in the deep dermis (D).

Microscopic examination suggested few histological changes in the skin of animals treated with microemulsion compared to the group treated with placebo gel (control). All skin layers were identified after treatment with the tested microemulsion. There is predominance of spindle cells in mice treated with both placebo gel (control) and microemulsion. Furthermore, there was also the presence of few inflammatory cells in the dermis not representing an inflammatory process. Additionally, no swelling or irritation was detected at the macroscopic visualization throughout the experimental period.

There was increased thickness of the epidermis in animals treated with the microemulsion compared to the hydrogel treatment (control), as shown in Figure 4. However, this increase was only 1.4 times, not being very significant, whereas substances classified as irritating agent (e.g. 10% sodium lauryl

sulphate in aqueous solution) generally promote removal / shedding of corneum stratum after successive applications of standard surfactant concentrations.

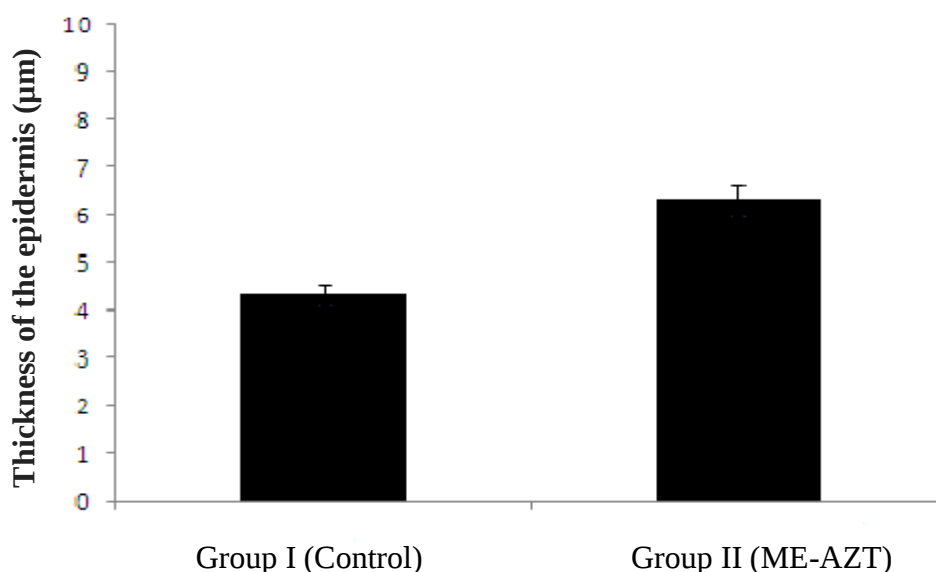


Fig 6. Average skin thickness (in μm) after applying the ME-AZT microemulsion and hidrogel (control) treatments in mice skin in studies on skin irritability.

These changes in the corneum stratum may be responsible for the microemulsion effect, through changes in the skin lipids.

4.4 CONCLUSION

According to the results obtained, there was significant AZT permeation enhancing the effect on the skin when the microemulsion system (Formulation ME) was used as vehicle. Furthermore, the selected microemulsion did not promote significant inflammatory response after 4 days of continuous exposure, showing its topic viability. Thus, it can be concluded that the microemulsion evaluated can be considered a promising system for transdermal release of zidovudine or drugs with similar physical and chemical characteristics. The liquid crystal lamellar systems evaluated retain the drug in the skin layers and prevent its use as AZT transdermal carrier.

4.5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq/MCT and CT- FVA for the financial support, the LAFEPE for the AZT donation and the Laboratório Nacional de Luz Síncroton – LNLS, Campinas - SP, Brazil, for the SAXS measurements.

4.6 REFERENCES

- [1] V. Amato - Neto, E. A. S. Medeiros, E.G. Kallas, J. L. S. Baldy, R. S. S. Medeiros. ***AIDS na prática médica***, Sanvier, São Paulo, 1996. p.153.
- [2] G. Aymard, M. Legrand, N. Trichereau, B. Diquet. **J. chromatogr. B, biomed. sci. appl.** 744(2000) 227-240.
- [3] J. Souza, S. Storpirtis, **Rev. Bras. Cienc. Farm.** 40 (2004) 9 - 19.
- [4] N. Suwaanpidokkul, P. Thongnopnua, K. Umprayan, **AAPS Pharmasci.** 5(2004) 82 – 89.
- [5] S. T. K. Narishetty, R. Pannchagnula, **J. Control Realease.** 95 (2004)367 – 379.
- [6] R. Pannchagnula, S. T. K. Narishetty, **J. Control Realease.** 102 (2005) 59 –70.
- [7] S. Y. Oh, S. Y Jeong, T.G. Park, J.H Lee, **J. Control Realease.** 98 (2004) 247- 436.
- [8] N. Suwanpidokkul, P. Thongnopnua, K. Umprayn, **AAPS Pharmasci.** 5 (2004) 01 – 08.
- [9] A. C. Sintov, L.Shapiro, **J. Control Realease.** 95(2004) 173-183. 2004.

- [10] M. B. Delgado - Charro, G. Iglesias - Vilas, J. Blanco - Méndez, M.A López - Quintela, J. P Marty, R. H. Guy, **Eur. J Pharm Biopharm.** 43 (1997) 37-42.
- [11] F. Dreher, P.Walde, P.Walther. E. Wehrli, **J. Control Realease.** 45 (1997) 131-140.
- [12] J. A. Silva, B. P. G. L. Damasceno, V. F. C. Borba, E. S. T. Egito, D. P. Santana, **Rev. Bras. Farm.** 90 (2009) 245 – 249.
- [13] A.A.M. Lira, E.A. Sester, A. L. M. Carvalho, R. R. Strattmann, M. M. Albuquerque, A. G. Wanderley, D. P. Santana, **AAPS Pharmasci.** 9 (2008) 163-168.
- [14] T. P. Formariz, L. A. Chiavacci, V. H. S. Sarmento, C. V. Santilli, E. S. T Egito, A.G. Oliveira, **Colloids Surf., B.** 60 (2007)28-35.
- [15] J. A. Silva, D. P. Santana, D. G. C. Bedor, V. F. C. Borba, A. A. M. Lira, E. S. T. Egito, **Quim. Nova.** 32 (2009)1389-1393.
- [16] N. Jibry, S. Murdan, **Eur. J Pharm Biopharm.** 58 (2004) 107 – 119.
- [17] C. H. Liu, F. Y. Chang, D. K. Hung, **Colloids Surf., B.** 82 (2010) 63 – 70.
- [18] K. Pestana, T.P. Formariz, C. M. Franzini; V.H.H. Sarmento, L. A. Chiavacci, M.V. Scarpa, E.S.T. Egito, A.C. Oliveira, **Colloids Surf., B.** 68 (2008) 253-259.
- [19] P. K. Ghosh, R. J. Majithiya, M. L. Umrethia, R. R. Murthy, **AAPS Pharmsci.** 7 (2006) 172 – 177.
- [20] T. Fronza, A. Campos, H. Teixeira, **Acta. Farm. Boanarense.** 23 (2004) 558-566.

- [21] D. Paolino, C. A. Ventura, S. Nistico, G. Puglisi, M. Fresta, **Int. J. Pharm.** 244 (2002) 21-31.
- [22] M. O. Taha, M. Al – Ghazawi, H. Abu – Amara, E. Khalil, **Eur. J Pharm Biopharm.** 15 (2002) 461-478.
- [23] M. Trota, E. Ugazio, E. Peira, C. Pulitano, **J. Control Release.** 86 (2003) 315-321.
- [24] E. Escribano, A. C. Calpena, J. Queralt, R. Obach, J. Doménech, **Eur. J Pharm Biopharm.** 19 (2003) 203-210.
- [25] A. G. Oliveira, M. V. Scarpa, M. A. Correa; L. F. R. Cera, T. P. Formariz , **Quim. Nova.** 27 (2004) 131-138.
- [26] G. A. Simon, H. I. Maibach, **Skin Pharmacol Appl.** 13(2000) 229-234.
- [27] FC Rosseti, Nanodispersões de cristal líquido como sistema de liberação de fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação *in vitro* e *in vivo* da permeação e retenção cutâneas. USP/RP, 2010.

Capítulo III

Antigo II - Liberação transdérmica de microemulsões de zidovudina: efeito de diferentes promotores em pele de cobra (*Boa constrictor*) e orelha de porco – a ser submetido a AAPS Pharmascitech.

5. Liberação transdérmica de microemulsões de zidovudina: efeito de diferentes promotores em pele de cobra (*Boa constrictor*) e orelha de porco.

Transdermal delivery of zidovudine - loaded microemulsion: effect of penetration enhancer in snake skin (*Boa constrictor*) and pig's ear

A. L. M. Carvalho^{1*}, J. A. Silva², A. A. M. Lira³, V. H. V. Sarmento⁴, L. V. Miura⁵, J. R. S. A⁵. Leite, D. P. Santana¹

¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético, Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE, Av. Professor Moraes Rêgo s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia - UEPB, Rua Juvêncio Arruda, s/n, Campus Universitário – Bodocongó, 58100-001, Campina Grande, PB, Brasil.

³Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Departamento de Fisiologia - UFS, Cidade Universitária Profº Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon s/n, Jardim Rosa Elze, 49.100.000, São Cristóvão, SE, Brasil.

⁴Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química – UFS, Campus Alberto Carvalho, Av. Vereador Olímpio Grande s/n, 49.500 – 000, Itabaiana, SE, Brasil.

⁵Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia (Biotec), Universidade Federal do Piauí (UFPI), campus Ministro Reis Velloso, Av. São Sebastião, 2819 - 64202-020 - Parnaíba, PI, Brasil.

*Corresponding author: Tel: +55 86 32155953 / 33026590; fax: +55 86 3215595233026591. E-mail address: aluismenezes@yahoo.com.br (A.L.M.Cavalho).

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da presença de diferentes promotores químicos de permeação cutânea (uréia, etanol, cineol 1,8 e geraniol) na estabilidade física, química e na permeação *in vitro* de microemulsões para liberação transdérmica de zidovudina (AZT). As microemulsões foram obtidas e selecionadas, a partir dos diagramas pseudoternários previamente desenvolvidos, as quais foram caracterizadas através da análise do tamanho das gotículas, potencial zeta, pH, comportamento reológico, espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS) e estabilidade preliminar (resistência a centrifugação e ciclo gelo-degelo). O efeito no estrato córneo foi avaliado por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em ATR (FT- IR) e a permeação cutânea em pele de cobra (*Boa constrictor*) e orelha de porco. As análises de quantificação foram realizadas por HPLC-UV a 266nm. Como resultado da caracterização físico-química das microemulsões, pôde-se observar que a presença dos promotores não alterou significativamente as características morfológicas e funcionais da microemulsão inicial (ME). Com a adição dos promotores todas as preparações diminuíram o diâmetro médio e mantiveram-se estáveis, isotrópicas e homogêneas. O 1,8 cineol aumentou significativamente à entrada de AZT nas camadas da pele, com provável mecanismo de extração de lipídeos evidenciada por FT-IR. No estudo de permeação cutânea *in vitro*, a quantidade de fármaco permeada foi significativamente maior para microemulsões acrescidas deste promotor em relação ao controle (ME), obtendo um efeito promotor de permeação na ordem de aproximadamente duas vezes ($p < 0,05$). Desta forma, a formulação que possui este terpeno mostrou ter estabilidade preliminar e capacidade de potencializar a permeação do fármaco, tornando-se, assim, um promissor carreador transdérmico para o AZT ou fármacos hidrofílicos com características semelhantes.

Palavras-chave: microemulsão, transdérmico, promotores de permeação, HIV.

ABSTRACT

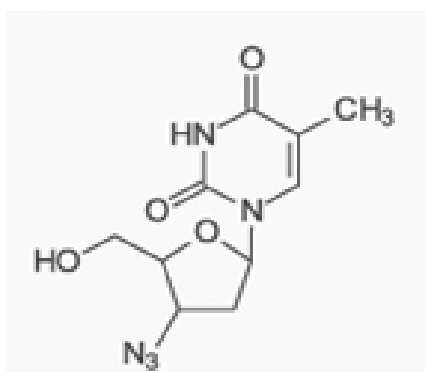
The objective of this study was to evaluate the influence of the different promoters of chemical skin permeation (urea, ethanol, 1.8 cineol and geraniol) in physical stability, chemical and *in vitro* permeation of microemulsions for transdermal delivery of zidovudine (AZT). The microemulsions were obtained and selected from pseudoternary diagrams previously developed, characterized by analyzing the droplet size, zeta potential, pH, rheology, low light scattering angle (SAXS) and primary stability (resistance to centrifugation and freeze-thaw cycle). The effect on the stratum corneum and permeation in the snake skin (*Boa constrictor*) and pig's ear were evaluated by Infrared Spectroscopy Fourier Transform (ATR FT-IR). The analyses were performed to quantify by HPLC-UV at 266 nm. As a result of physical-chemical characterization of microemulsions was observed that the presence of promoters did not significantly alter the morphological and functional characteristics of the initial microemulsion (ME). With the addition of promoters all preparations decreased the average diameter and remained stable, homogeneous and isotropic. The 1.8 cineole significantly increased the entry of AZT in the skin layers with the probable mechanism of lipids extraction as evidenced by the FT-IR. In the skin permeation study *in vitro*, the amount of permeated drug was significantly higher for increased microemulsions of this promoter in the control (EM) compared to control, obtaining a permeation enhanced effect on the order of approximately 2-fold ($P < 0.05$). Thus, the formulation has been shown to have this terpene primary stability and promising effects being able to enhance drug permeation, making it therefore a promising transdermal carrier for AZT or hydrophilic drugs with similar characteristics.

Keywords: microemulsion, transdermal permeation enhancers, HIV

5.1 INTRODUÇÃO

A Zidovudina, AZT (3'- azido -3'- dexotimidina), conforme figura 1, foi o primeiro composto anti-HIV aprovado para uso clínico e ainda amplamente utilizado na terapia antirretroviral, sozinho ou combinado com outros agentes anti-HIV. Durante a terapia antirretroviral existe um ponto crucial que é a manutenção sistêmica do fármaco dentro de níveis terapêuticos no decorrer do tratamento. Além disso, o fármaco, após a administração oral, possui curto tempo de meia – vida (01 hora), baixa biodisponibilidade em função do efeito de primeira passagem e geralmente são necessárias altas doses (200mg a cada 4 horas) e frequentes administrações para manutenção dos níveis terapêuticos. O pico de concentração plasmática é de 1,2 µg / mL em 0,8h (SUWANPIDOKKUL, *et al.*, 2004; PANCHAGNULA, 2005).

Figura 1 - Fórmula estrutural da zidovudina.



Fonte: (NASCIMENTO, 2004)

Para evitar os efeitos colaterais e reduzir a toxicidade dose-dependente após a administração oral da zidovudina, surge a necessidade de administração do fármaco por uma via alternativa a oral. A via transdérmica é uma rota alternativa de administração de fármaco indicada nos casos de baixa biodisponibilidade, após administração oral, e considerável efeito de primeira

passagem no fígado. A veiculação de fármacos por essa via possibilita manutenção de níveis terapêuticos adequados por um maior período de tempo, menos complicações, menor frequência de doses e maior adesão do paciente ao esquema terapêutico (SILVA *et al.*, 2010).

Entretanto, o AZT é uma molécula hidrofílica e tem dificuldade de ultrapassar a barreira do estrato córneo, com isso diversas estratégias têm sido investigadas para promover a penetração cutânea do fármaco, como o uso de iontoforese (OH, *et al.*, 1998) e de promotores químicos, como: l-menthol, 1,8 cineol, álcool etílico, propilenoglicol e misturas de solventes com álcool / miristato de isopropila, ácido fatídico e terpenos), sistemas microemulsionados e nanopartículas (PANCHAGNULA, 2005, MAINARDE *et al.*, 2010). Esses promotores são farmacologicamente inativos, mas podem permear ou interagir com constituintes do estrato córneo, quando incorporados numa formulação transdérmica e, deste modo, diminuir a resistência da pele e propiciar a difusão do fármaco em camadas mais profundas da pele (MARTINS & VEIGA, 2002).

As microemulsões são dispersões isotrópicas, transparentes, termodinamicamente estáveis, usualmente formadas por misturas de quatro componentes, água, óleo, tensoativo e co-tensoativo. Apresentam grande potencial como sistemas de liberação e de direcionamento de fármacos devido as suas propriedades de solubilizar compostos hidrofílicos em meio lipofílico, ou compostos lipofílicos em meio aquoso, e compostos anfifílicos na interface óleo/água. Em razão de sua alta proporção de substâncias tensoativas, as microemulsões podem interagir com o estrato córneo desestruturando a bicamada lipídica do mesmo, dessa forma, a permeabilidade cutânea é aumentada e a penetração de substâncias, que normalmente não passariam através dessa barreira (por exemplo, a zidovudina), ficaria bastante facilitada (MENDONÇA, 2003; DJORDEVIC, 2005; FORMARIZ *et al.*, 2005).

Além da utilização de sistemas microemulsionados, o uso de promotores de permeação tem sido utilizado com a finalidade de reduzir a resistência cutânea e aumentar o fluxo de penetração de moléculas através da pele. A ação dos promotores químicos (exemplo: álcool, ureia, terpenos, ácidos graxos) e promotores físicos (iontoforese e fonoforese) podem envolver interações nos grupos das cabeças polares dos lipídios e nas cadeias hidrofóbicas da bicamada. Resultando, assim, no incremento da fluidez da

membrana e a penetração de fármaco em uma barreira do estrato córneo (MARTINS & VEIGA, 2002; CHORILLI *et. al.*, 2011).

Frente a o exposto, este trabalho propõe a avaliação da permeação cutânea de microemulsões de zidovudina com potencial utilização transdérmica, acrescidas de promotores químicos sintéticos e naturais com o objetivo de aumentar de forma significativa à penetração cutânea de microemulsões de AZT. Com isso, evitar as repetidas doses de administração por via oral, facilitar a adesão ao tratamento medicamentoso e promover a melhoria da qualidade de vida dos pacientes portadores do vírus HIV.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

Foi utilizado o padrão de trabalho Zidovudina (Nordeste® lote DY070040 - Conteúdo 97,8%), miristato de isopropila - Henrifarma, lote 0606-195 (fase oleosa), Labrasol® - Gattefossé (PEG - 8 caprílico / cáprico glicerídeo), lote 104 250 (tensoativo); Plurol oleico ®-Gattefosse (poligliceril-6 dioleato) lote 101.555 (co - tensoativo) Etanol-Vetec, Trietanolamina, soluções tampão (NaOH/H₂KPO₄) de pH 7,4. Metanol grau HPLC (JT Baker, Philipsburg, PA, EUA), filtros de membrana de 0,25 µm, terpenos cineol 1-8 e geraniol (Sigma – Aldrich). A água foi purificado utilizando um sistema MilliQ® da Millipore (Millipore, São Paulo, Brasil). HPLC-UV (Shimadzu®), coluna cromatográfica Gemini® C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) com 12,5 x 4,0 mm e tamanho de partícula de 5µm, Todos os outros reagentes utilizados no estudo foram grau analítico.

5.2.2 Obtenção das formulações

A obtenção da formulação envolveu a elaboração de uma microemulsão, baseada em diagramas de fase desenvolvido previamente (SILVA, 2009A), contendo AZT como substância ativa. Composição quali / quantitativa (p/p) da microemulsão controle ME - Plurol 10%; Labrasol 30%; Miristato de Isopropila 10%; Água q.s.p. 100% . Nesta formulação foram incorporados O azt A 2,5 %

e os promotores químicos (etanol, uréia e 1,8 cineol) nas proporções de 1 e 5% (p/p) e geraniol a 1%. A incorporação dos promotores ocorreu na fase oleosa para os terpenos e na fase aquosa para as demais substâncias e posteriormente, após a formação da microemulsão, o fármaco foi adicionado, conforme tabela 1.

Tabela 1. Composição qualitativa / quantitativa de microemulsões obtidas com promotores de permeação cutânea (etanol, uréia, 1,8 cineol e geraniol).

Composição	ME (%)	ME-ET1 (%)	ME-ET5 (%)	ME-UR1 (%)	ME-UR5 (%)	ME-CIN1 (%)	ME-CIN5 (%)	ME-GER1 (%)
AZT	-	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Labrasol®	10	10	10	10	10	10	10	10
Plurol®	30	30	30	30	30	30	30	30
Miristato de isopropila®	10	10	10	10	10	10	10	10
Etanol	-	1	5		-	-	-	-
Uréia	-	-	-	1	5	-	-	-
Cineol 1,8	-	-	-	-	-	1	5	-
Geraniol 1	-	-	-	-	-	-	-	1
Agua	100	100	100	100	100	100	100	100
Mili Q q.s.p								

5.2.3 Determinação do tamanho de partícula e potencial zeta (ζ) pela técnica de espalhamento de luz

Os sistemas isotrópicos foram submetidos sem diluições a medidas de espalhamento dinâmico de luz utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano system ZS (Malvern-UK). As amostras foram colocadas em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medições foram feitas à temperatura ambiente (25°C). O equipamento possui um laser de He-Ne de 4 mW operando num comprimento de onda de 633 nm que realiza as medições não invasivas

por “backscatter optics” (NIBS). As medições foram feitas num ângulo de detecção de 173° e a posição da medição na cubeta é automaticamente determinada pelo software do equipamento. O equipamento realiza em média 15 determinações para cada análise. Neste mesmo equipamento foram realizadas as determinações do potencial zeta (ζ) e tamanho de partícula (nm). Foram realizadas medições com a presença e ausência dos promotores de permeação (ALMEIDA *et al.*, 2012).

5.2.4 Espalhamento de raio x de baixo ângulo (SAXS)

O espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foi realizada no D11-A estação de medições SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil), equipado com um CUT asymmetricly e Si dobrado (111) monocromador (à temperatura ambiente). A intensidade de espalhamento $I(q)$ foi expressa em unidades arbitrárias e a dispersão do parasita (dispersão de partículas no sistema sem amostra) foi subtraída da intensidade total. Foram realizadas medições nas microemulsões com a presença e ausência dos diferentes promotores de permeação incorporados (FORMARIZ *et al.*, 2007; CHORILLI *et al.*, 2011).

5.2.5 Estudo reológico das microemulsões

A viscosidade de um fluido pode ser definida como sendo a propriedade que o mesmo apresenta em oferecer uma maior ou menor resistência à deformação, quando sujeito a esforços de escorregamento (AULTON, 2005; CARVALHO, 2007). A viscosidade dos sistemas isotrópicos foi avaliada no Reômetro HAAKE, modelo RS1, registrado em um software Rheowin 3.5. A geometria utilizada foi placa-placa PP 35Ti, gap 0,2 mm e com taxa de cisalhamento 0-200 e 200-0, tempo 300 s a temperatura 25 graus. Foram feitas medições na presença e ausência dos diferentes promotores de permeação utilizados na pesquisa (CHORILLI *et al.*, 2011).

5.2.6 Avaliação da estabilidade preliminar (resistência à centrifugação e ciclo gelo-degelo)

As microemulsões contendo os promotores químicos de permeação cutânea foram acondicionadas em frascos de vidro com tampa. Todas as amostras foram submetidas, inicialmente, a centrifugação durante 30 minutos, a uma velocidade de 3200 r.p.m. Avaliou-se, também, a resistência das amostras a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento (Ciclos de 24 horas a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ e 24 horas a $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ - durante 12 dias: totalizando seis ciclos). As preparações foram analisadas no tempo inicial (T_0) antes do estresse térmico e no 12º dia após teste preliminar (T_{ciclo}) quanto às características organolépticas (aspecto, cor e odor), pH, densidade relativa, teor. A determinação do teor do fármaco foi realizada por espectrofotometria UV, no comprimento de onda de 266nm, com método desenvolvido e validado previamente (CARVALHO, 2012).

5.2.7 Ensaios de permeação e retenção cutânea

5.2.7.1 Preparo do estrato córneo da membrana de pele de cobra (*Boa constrictor*) para FT- IR/ATR

As amostras de biomembranas foram preparadas utilizando-se porções dorsais de pele de muda de Jiboia (*Boa constrictor*), que foram cortadas no formato de disco de cerca de $1,5\text{ cm}^2$, utilizando tesoura e lavadas com água destilada corrente a temperatura ambiente. As amostras de pele foram imersas em água destilada por um período de 24 horas para hidratação. Após este período, foram secas entre folhas de papel de filtro quantitativo, sob leve compressão, e transferidas para beakers onde permaneceram imersas com as microemulsões utilizadas nesta pesquisa (ausência e presença de promotores), separadamente, por um período de 24 horas. Decorrido o tempo indicado, as amostras foram retiradas e secas entre papéis de filtro quantitativo. As amostras foram prensadas entre duas lâminas para microscopia e permaneceram armazenadas em dessecador até o momento do uso. Posteriormente, as amostras foram utilizadas para os experimentos de espectroscopia FTIR/ATR (NUNES *et al.*, 2005).

5.2.7.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier com ATR (FTIR-ATR) em amostras de pele de cobra (*Boa constrictor*)

As amostras de pele de cobra foram avaliadas por espectrofotometria no infravermelho na faixa de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, utilizando-se um espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier equipado com acessório de Refletância Total Atenuada (ATR), modelo Vertex 70. A análise foi realizada em atmosfera pobre em água e CO_2 . As análises dos dados dos espectros de infravermelho foram feitas com o software Opus 6.5. As peles analisadas foram da ME (controle) e das demais amostras acrescidas de promotores de permeação cutânea (VADDIE *et al.*, 2002; SAPRA *et al.*, 2008).

5.2.7.3 Ensaios de Permeação cutânea *in vitro* em modelo de biomembrana alternativa (pele de cobra - *Boa constrictor*) e pele de orelha de porco.

As permeações cutâneas *in vitro* foram conduzidas utilizando células de difusão tipo Franz com área difusional de $1,15 \text{ cm}^2$, volume de $\pm 12 \text{ mL}$, usando membranas de pele de cobra Jibóia (*Boa constrictor*) e pele de orelha de porco (NUNES *et al.*, 2005). O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato 20 mM em $\text{pH} = 7,4$, num sistema composto de quatro células individuais conectadas a um banho termostatzado à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, sob agitação constante de 100 rpm em agitador magnético por um período de 24 horas. No compartimento doador, aplicou-se o equivalente a 400 mg (10mg de AZT) da formulação diretamente sobre a pele de cobra previamente hidratada com tampão fosfato por 12 horas (overnight). As membranas foram colocadas cuidadosamente no compartimento doador de forma que ficassem em contato com a solução receptora. As amostras da solução receptora foram coletadas nos seguintes tempos: 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas. O volume da fase receptora de cada célula (03 mL) foi substituído a cada amostragem com tampão fosfato na mesma temperatura ($37 \pm 0,5^\circ\text{C}$) para manutenção das condições “sink”. Os experimentos de permeação *in vitro* ($n = 4$) com peles da região dorsal de orelhas de porco foram realizados empregando células de difusão tipo Franz modificada descrita neste item e seguindo as mesmas condições do ensaio com a pele de cobra. A quantidade de fármaco liberado no compartimento receptor foi quantificada por CLAE - UV através do método analítico desenvolvido e validado previamente (Apêndice A).

Para avaliação da retenção cutânea (apenas na pele de orelha de porco), as fitas adesivas contendo Extrato Córneo (EC) foram unidas e colocadas em tubos de extração contendo 4,0 mL de solvente extrator (1:1 - metanol: água) e agitadas em mixer por 1 minuto. Em seguida, foram deixadas por 30 minutos em banho ultrassom e filtradas em membranas poro 0,45 µm (Millipore®). A determinação do AZT retido no EC foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta (CLAE – UV).

O tecido cutâneo restante foi triturado e após adição de 4,0 mL do solvente extrator foi agitado em mixer por 1 minuto, semelhante ao relatado anteriormente. Em seguida este foi submetido a banho de ultrassom durante 30 minutos para rompimento das células (LIRA *et al.*, 2008). A mistura foi, então, filtrada em membranas poro 0,45 µm (Millipore®) e a concentração do antirretroviral determinada por CLAE – UV. No estudo com pele de orelha de porco foram avaliadas formulações sem promotores e com a presença de promotores em suas maiores concentrações incorporada nas microemulsão (cineol 5%, etanol 5%, uréia 5% e geraniol 1%).

5.2.7.4 Condições analíticas – HPLC

As análises foram realizadas em HPLC-UV consistindo de duas bombas (LC ADvp 10), a temperatura ambiente controlada (25°C) (CTO 10AVP), detector UV/VIS (SPD 10AVvp) e comprimento de onda de 266nm, coletor automático (10ADvp SIL) e um sistema controle (SCL 10AVP) todos da Shimadzu (Kyoto, Japan). A Separação cromatográfica isocrática foi realizada à temperatura ambiente controlada (25°C) com uma coluna Gemini® C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) com 12,5 x 4,0 mm e tamanho de partícula de 5µm. A fase móvel constituída inicialmente de metanol e água (30:70, v/v), sendo filtrada, degaseificada e bombeada a um fluxo de 1,3 mL/min. O volume de injeção de 20 µl.

5.2.7.5. Análise dos Dados Obtidos nos Experimentos de Permeação Cutânea

Os valores do fluxo ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) foram calculados a partir do coeficiente angular da equação da reta obtido da porção linear do gráfico de quantidade permeada de fármaco ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) por tempo. A razão da promoção da permeação (RP) foi obtida a partir da comparação da quantidade total permeada da formulação teste com o controle (solução de zidovudina). Todos os parâmetros de permeação foram calculados nas duas membranas biológicas utilizadas no experimento.

5.3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incorporação dos promotores químicos ao sistema microemulsionado não alterou de forma significativa as características físico – químicas das microemulsões obtidas. As formulações dispostas na Tabela 2 não apresentaram indicativo de instabilidade, como: cremagem, coalescências e separação de fase após a incorporação dos promotores utilizados na pesquisa. Os promotores químicos foram incorporados na fase aquosa (uréia e etanol) e/ou na fase oleosa (1,8 cineol e geraniol) para obtenção das formulações avaliadas nesta pesquisa. Posteriormente, após a adição dos promotores e a formação da microemulsão, adicionou-se o AZT. As amostras mantiveram-se estáveis com a presença do fármaco e permaneceram límpidas, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Características físico - químicas de microemulsões com 2,5 % de AZT associado a diferentes promotores químicos (Etanol 1 e 5% / Uréia 1 e 5% / Cineol 1 e 5% e Geraniol 1%).

Parâmetros	ME	ME - ET1	ME - ET5	ME - UR1	ME - UR5	ME - CIN1	ME - CIN2	ME- GE1
Características								
Organolépticas	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida
Resistência a								
Centrifugação	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP
Tamanho								
de gotícula (nm)	132 ± 3,0	100 ± 9	31, ± 5,0	58 ± 0,95	55 ± 0,41	49 ± 0,49	73 ± 10,0	58 ± 1,2
	0,36 ±	0,3723 ±	0,50 ±	0,45 ±	0,41 ±	0,42 ±	0,52 ±	0,4 ±
PDI	0,01	0,06	0,14	0,04	0,01	0,01	0,09	0,01
Potencial zeta	0,562 ±	0,51 ±	1,74 ±	0,07 ±	0,74 ±	0,286 ±	0,31 ±	0,36
(mV)	0,035	0,26	0,17	0,05	0,12	0,09	0,06	±0,10

*PDI – índice de polidispersividade; ** AP – aprovado

Após a incorporação dos promotores e do fármaco, a faixa de pH das amostras obtidas variou entre 6 – 7. Portanto, dentro da faixa utilizada para preparações tópicas que é considerada aceitável na faixa de 5 – 8 (SILVA, 2009B).

Os ensaios organolépticos fornecem parâmetros que permitem avaliar, de imediato, o estado em que se encontra a amostra em estudo por meio de análises comparativas, com o objetivo de verificar alterações como: separação de fases, precipitação e turvação permitindo reconhecimento primário do produto. Esse parâmetro abrange a avaliação do aspecto, cor e odor utilizando a observação visual das formulações verificando se ocorreram modificações macroscópicas (BRASIL, 2008). As amostras com os diferentes promotores não alteraram o aspecto da ME inicial e todas as formulações permaneceram transparentes sem a presença de partículas suspensas e turvação.

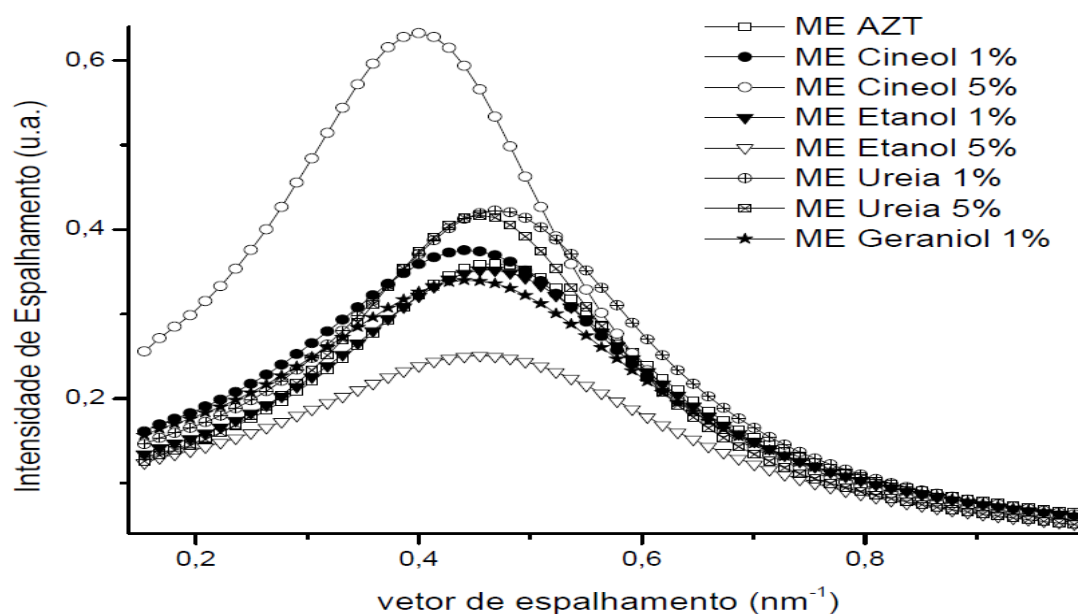
Conforme a Tabela 2, todas as amostras resistiram ao estresse físico das amostras na presença dos diferentes promotores de permeação. A força da gravidade atua sobre os produtos e sistemas, fazendo com que suas partículas se movam no seu interior. A centrifugação produz estresse na amostra, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades (BRASIL, 2008). Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto (caking) e coalescência, entre outras.

Em relação ao tamanho das gotículas, descritas na Tabela 2, as microemulsões diminuíram de tamanho após a incorporação dos promotores em relação a formulação sem promotores. A redução do tamanho de gotícula pode ser atribuída a maior solubilidade do fármaco na ME com a adição dos promotores químicos. Entretanto, as formulações ME e ME - ET1 tiveram valores de IPD aceitáveis (até 0,3). As demais formulações apresentaram IPD elevado, este fato pode ser atribuído à preparação das microemulsões (tempo de agitação, velocidade de agitação das fases, técnica de titulação e etc.). Contudo, as amostras mantiveram-se estáveis, isotrópicas e homogêneas,

mesmo após condições de estresse que foram submetidas posteriormente. A formulação ME-ET5 possui um tamanho de gotícula de 31,23 nm, entretanto a dispersão de valores nesta amostra é bastante elevada (IPD 0,50) e pode ter afetado a leitura, considerando que a amostra tem comportamento bimodal evidenciado em estudos anteriores.

A utilização da técnica de Espalhamento de raios - X a baixo ângulo (SAXS) na caracterização de sistemas é explicada pela possibilidade de se determinar o tamanho médio e a distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, micelas ou estruturas cristalinas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados de forma ordenada (CARVALHO, 2010). Os espectros de SAXS das amostras de ME e após a incorporação dos diferentes promotores químicos estão descritos na figura 2.

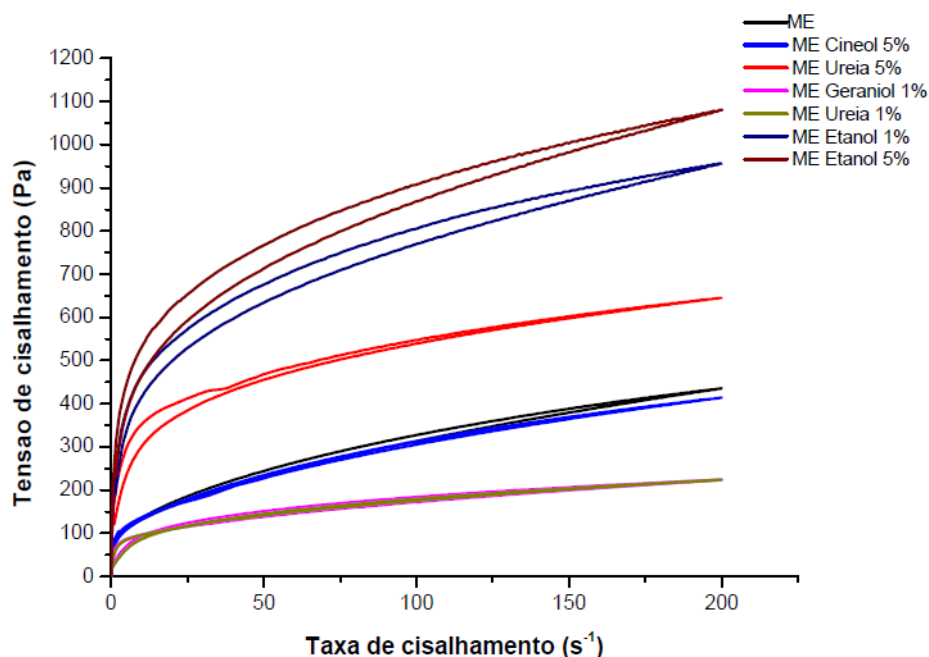
Figura. 2. Espectros de SAXS de diferentes formulações microemulsionadas na presença de diferentes promotores químicos de permeação cutânea.



De acordo com as análises de SAXS, a incorporação dos diferentes promotores de permeação não alterou o tipo de sistema coloidal ME. Conforme a figura 2, os picos apresentam-se alargados e simétricos, sendo característicos de um sistema microemulsionado. Sua organização e estrutura interna permaneceram inalteradas após a adição dos promotores na ME. Não foram evidenciados outros picos, no intervalo de 0,2 a 0,8 nm⁻¹, no perfil de SAXS que poderiam ser característicos de sistemas, como mesofases (estrutura de cristal líquido liotrópico, por exemplo). Todas as amostras, com ausência ou presença, de promotores de permeação cutânea são microemulsões e o promotor não alterou a capacidade de formação da ME (FORMARIZ *et al.*, 2007; FORMARIZ *et al.*, 2008). Portanto,

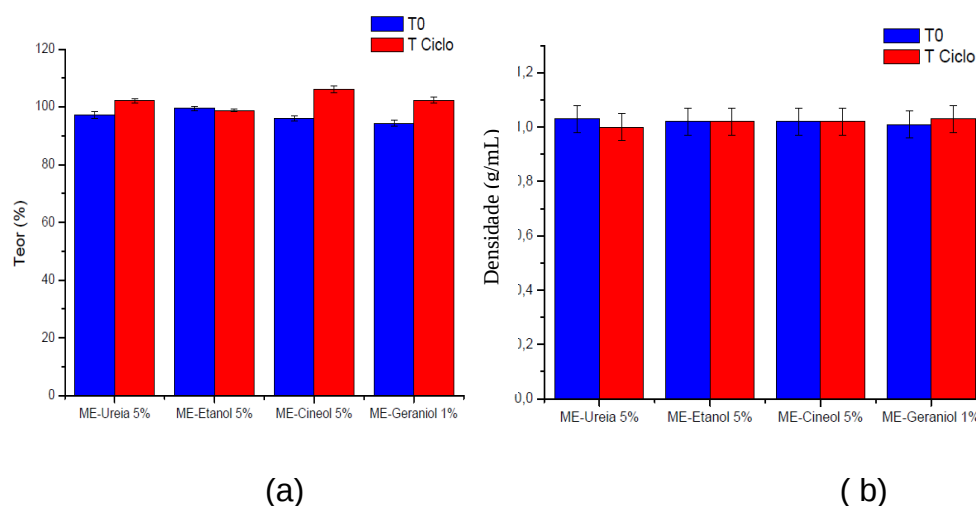
A determinação do comportamento reológico da microemulsão é fundamental para a definição do fluxo de escoamento de sistemas semissólidos e líquidos. As propriedades reológicas são importantes como ferramentas de avaliação da estabilidade e na caracterização de fluidez e espalhabilidade de sistemas que são aplicados pela via cutânea. Algumas microemulsões avaliadas neste trabalho possuem comportamento newtoniano (ME, ME-UR1, ME-UR5, ME-CIN5 e ME-GE1), pois a velocidade de cisalhamento é diretamente proporcional à taxa de cisalhamento, além disso, a viscosidade permanece constante com o aumento da taxa de cisalhamento (conforme a figura 3) (FORMARIZ, 2005; AULTON, 2005).

Figura 3. Gráfico do comportamento reológico da ME e com ME na presença de diferentes promotores de permeação cutânea (uréia, etanol, cineol e geraniol).



As formulações ME-ET1 e ME-ET5 apresentaram características não newtonianas, pseudoplásticas e com evidente fenômeno tixotrópico. As curvas ascendentes e descendentes da rampa reológica com velocidade de cisalhamento de 0 – 200 cm^{-1} e 200 – 0 cm^{-1} não estão sobrepostas e existe uma área de histerese evidente. Este fenômeno é característico de sistemas dispersos, pois diminuir a viscosidade com o cisalhamento do produto na pele, entretanto a recuperação da estrutura é tempo-dependente e permite após a administração uma eficiente bioadesão. Tal fato pode ter ocorrido em função da redução da viscosidade na presença do etanol que atua como controlador de viscosidade em sistemas emulsionados (CARVALHO, 2007; CHORILLI *et al.*, 2011).

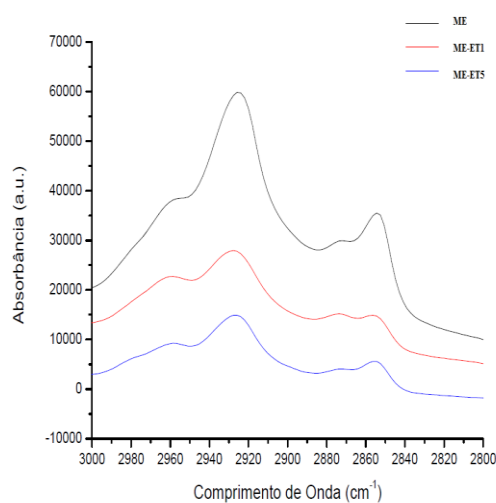
Figura 4 - Avaliação do teor (a) de AZT e densidade (b) de microemulsões com diferentes promotores químicos (antes e após ciclo gelo degelo).



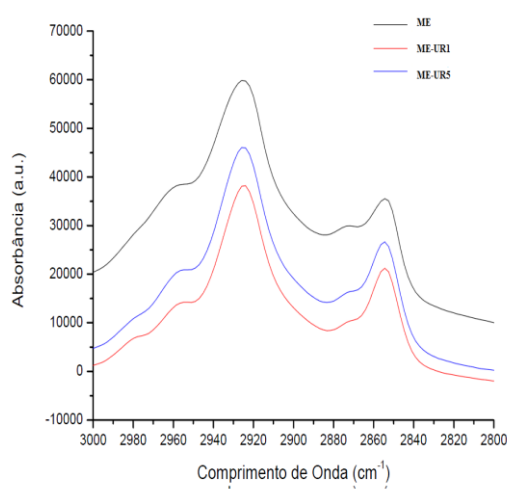
Os resultados da estabilidade preliminar das microemulsões, conforme os gráficos 4 (a) e (b) não tiveram alterações significativas nos parâmetro densidade e doseamento. O que demonstra a compatibilidade da ME e os diferentes promotores de permeação cutânea. As amostras não sofreram alterações significativas ao longo do ciclo e permaneceram com características semelhantes ao início do ciclo. As características organolépticas foram mantidas após o ciclo-gelo degelo e os valores de pH permaneceram dentro de faixa aceitável para utilização destas formulações pela via cutânea (pH entre 5 – 8) (SILVA, 2009B).

Entre as técnicas empregadas para investigar a via de penetração e a modificação bioquímica induzida pela permeação, à espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) é adequada. Não só pode ser descrita corretamente a composição bioquímica de tecidos biológicos, mas a introspecção na composição da estrutura secundária da proteína (queratina) pode ser adquirida. Entre as configurações experimentais disponíveis, a FT- IR com refletância total Atenuada (ATR), sonda especificamente as camadas mais externas da pele. Esses estudos trazem informações adicionais sobre as propriedades do estrato córneo, especialmente para a composição e organização de lipídios (VADDI *et al.*, 2002; COTTE, 2004). Os resultados deste ensaio estão descritos nos gráficos da Figura 5.

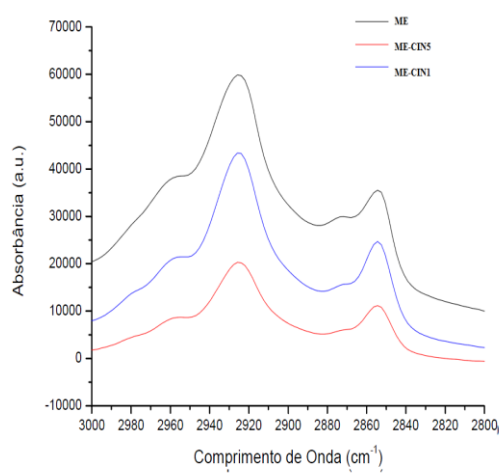
Figura 5 Espectros de FT-IR/ATR de diferentes microemulsões de zidovudina na ausência de promotores (ME) e na presença de etanol 1 e 5% (ME-ET1 / ME-ET5 – (A)), de ureia 1 e 5% (ME-UR1/ME-UR-2 – (B)), de cineol 1 e 5% (ME-CIN1 / ME-CIN5 – (C)) e geraniol 1% (ME-GE1 – (D)) no intervalo de banda de 2800 – 3000 cm^{-1} .



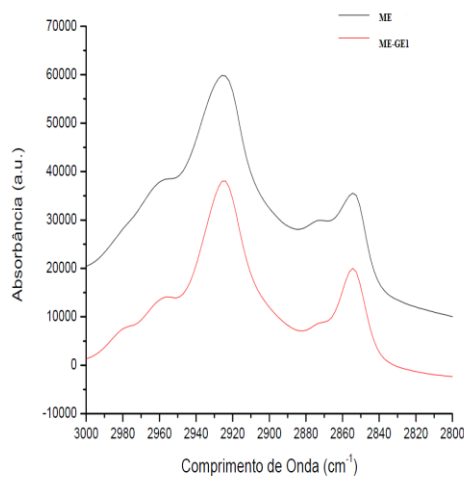
(A)



(B)



(C)



(D)

A banda de absorção de 3000 a 2700 cm^{-1} (visualizada na Figura 5) provavelmente pode ser atribuída ao movimento de estiramento C - H do grupo alquil presente em proteínas e lipídios do estrato córneo. O sinal ligado às proteínas é uma banda larga e um sinal bastante fraco em comparação com a absorção dos lipídios, que exibe quatro picos finos em torno de 2850 cm^{-1} (vibração simétrica CH_2), 2920 cm^{-1} (vibração assimétrica CH_2), 2870 cm^{-1} (vibração simétrica CH_3), 2955 cm^{-1} (vibração assimétrica CH_3). Estas bandas estreitas podem ser atribuídas à longa cadeia alquil de ceramidas, colesterol e ácidos graxos, que são os maiores componentes lipídicos do estrato córneo. Conforme as Figura 5, todos os promotores de permeação cutânea alteraram a intensidade do espectro de infravermelho no intervalo avaliado.

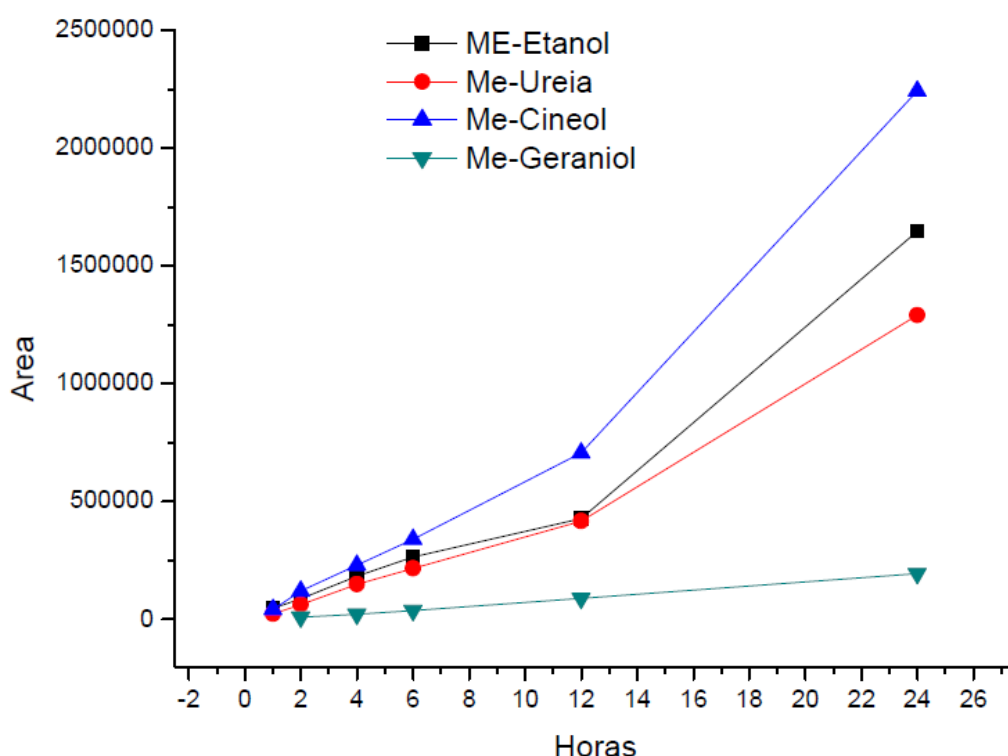
A redução da intensidade de estiramento de pico CH_2 (2920-2850 cm^{-1}) sem afetar a posição dos picos sugere extração dos lipídeos. Fato evidenciado de forma mais efetiva na figura 5(a) e (c) com a presença de etanol e 1,8 cineol. É provável que o promotor tenha desestruturado o arranjo da camada lipídica do estrato córneo, primariamente originada pela cadeia alquil de lipídeos nos espaços intracelular do desta camada da pele (MARJUKKA, 1999). Entretanto, técnicas adicionais são necessárias para comprovação do efeito, por exemplo, através de análises térmicas (DSC).

Adicionalmente, o poder de perturbação do 1,8 cineol no estrato córneo pode ser atribuído à formação de pontes de hidrogênio preferencialmente com a cabeça polar das ceramidas presentes no manto lipídico, rompendo assim uma rede de ligações secundárias presentes nas bicamadas lipídicas e promovendo a inserção de espaços especialmente importantes para molécula a permeação de moléculas hidrofílicas. Este fenômeno é competitivo e, portanto, dependente da concentração, além disso a modificação é transitória e reversível (PANCHAGNULA & NARISHETTY, 2004; SAPRA *et al.*, 2008).

A permeação em pele de cobra foi realizada e os resultados estão descritos na Figura 6. Os promotores que potencializaram o desempenho da microemulsão foram os seguintes, conforme ordem decrescente de efeito promotor, cineol > etanol > uréia. O terpeno geraniol retardou a permeação cutânea da ME tanto na pele de cobra (modelo de estrato córneo) como na membrana biológica da orelha de porco. Os resultados apresentados no estudo

de permeação em pele de cobra corroboram com o FT- IR, considerando que os promotores fortaleceram as alterações da pele de cobra após tratamento com as microemulsões acrescidas de promotores químicos.

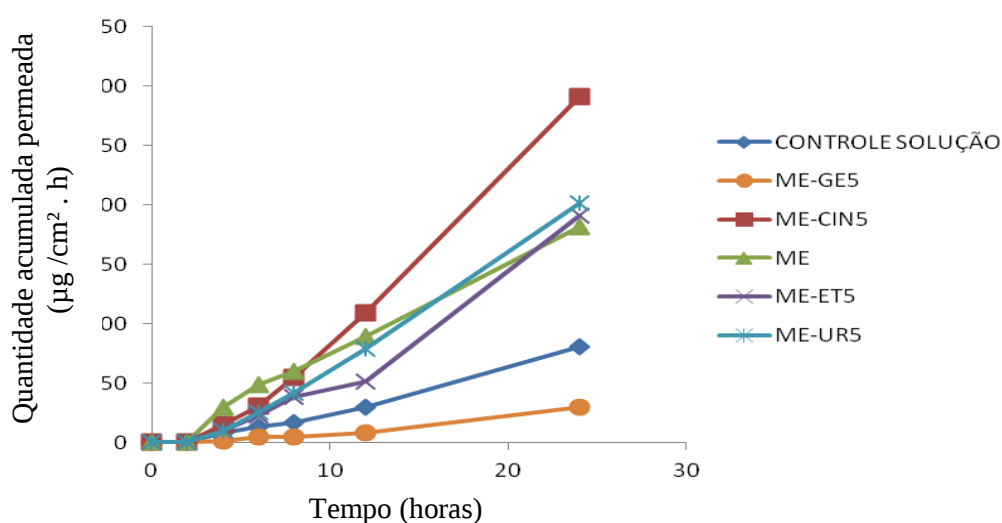
Figura 6. Perfil de permeação cutânea *in vitro* em pele de cobra (*Boa constrictor*) com quatro replicatas em cada ponto do ensaio (n = 3).



O perfil de permeação cutânea *in vitro* em pele (total) de orelha de porco está descrito na Figura 7, onde observam-se os distintos comportamentos de penetração cutânea. O fármaco incorporado na formulação ME - GE5 alcançou o compartimento receptor da célula de Franz em quantidades baixas, comparando com as demais formulações, pois foi detectada zidovudina ao final de 24 horas de experimento em quantidade menor que a ME controle. A dificuldade de liberação na pele da zidovudina nessa formulação pode ser atribuída a provável interação do promotor com algum componente da microemulsão ou ao aumento da afinidade do AZT após a adição do terpeno, fato que podem ter retardado a liberação do fármaco. Consequentemente, a

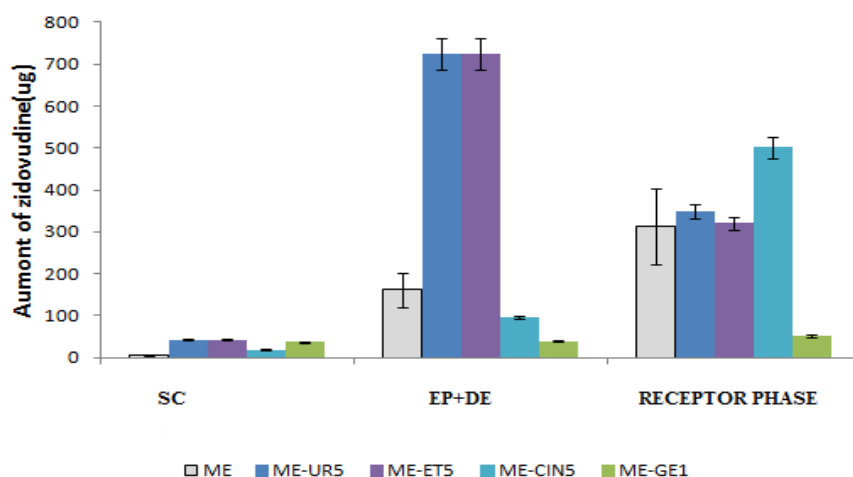
presença deste promotor promoveu a retenção do fármaco no veículo, funcionando assim como reservatório e não adequado para liberação transdérmica do AZT.

Figura 7. Perfil de permeação cutânea *in vitro* de diferentes formulações microemulsionadas em pele de orelha de porco na presença e ausência de diferentes promotores de permeação cutânea, com quatro replicatas (n=4).



As formulações ME, ME-ET5 e ME-UR tiveram comportamento semelhante em relação ao perfil de permeação e promoveram a permeação cutânea de forma semelhante à microemulsão controle. O cineol 1,8 promoveu maior penetração cutânea *in vitro* no compartimento receptor, tornando-se um promotor adequado, pois a sua presença no sistema microemulsionado não alterou o tipo de sistema coloidal e não ocasionou o desequilíbrio no sistema pesquisado, além de atuar de forma efetiva, conforme figura 8. Adicionalmente, a ME – CIN8 promover maior quantidade de fármaco no compartimento receptor reduziu a retenção de fármaco no estrato córneo, epiderme viável e derme, comparado aos outros promotores utilizados nesta pesquisa. Este resultado corrobora com NARISHETTY & PANCHAGNULA (2004) que obtiveram o 1,8 - cineol como melhor promotor de AZT em misturas de solventes.

Figura 8. Distribuição do AZT retido após a permeação com diferentes microemulsões no estrato córneo (SC), epiderme e derme (E + D) e meio receptor da célula de Franz, 24 horas após o ensaio de permeação cutânea *in vitro*, através da técnica de tape stripping com quatro replicatas (n=4).



Os parâmetros de permeação e o comportamento cinético dos ensaios com pele de orelha de porco estão definidos na tabela 3. As ME-ET5 e ME-UR5 obtiveram fluxo de permeação no “*steady state*” de forma semelhante. O geraniol possui um fluxo inferior à formulação controle e a presença de 5% de 1,8 cineol duplicou o fluxo da ME controle. O que demonstra a grande efetividade do terpeno em todos os parâmetros de permeação. A ME-CIN5 praticamente duplicou o fluxo de permeação e a quantidade de fármaco após 24 horas de ensaio em relação a ME controle.

O modelo cinético de ordem zero apresentou um maior coeficiente de correlação ($r^2 = 0,9725 - 0,9998$) para todas as formulações durante o experimento, indicando que o fluxo, neste intervalo, independe da concentração do fármaco. Este modelo cinético é característico de formulações com doses infinitas.

Tabela 3. Parâmetro de permeação cutânea para as diferentes microemulsões em orelha de porco após 24 horas de ensaio de permeação cutânea, com os diferentes promotores de permeação cutânea, com quatro replicatas (n=4).

Amostras	Fluxo ($\mu\text{g} / \text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	Q24 ($\mu\text{g/mL}$)	r^2	Ordem
ME	7,59	181,33	0,9998	zero
ME-ET5	10,05	191,35	0,9725	zero
ME-UR5	10,05	201,46	0,9996	zero
ME-CIN5	14,82	290,59	0,9996	zero
ME-GE1	1,614	29,68	0,9859	zero

5.4 CONCLUSÃO

De acordo com o exposto, pôde-se verificar que a presença dos diferentes promotores de permeação alterou as propriedades do modelo alternativo de estrato córneo, entretanto não alteram de forma significativa as características físico-químicas da ME controle. As formulações foram resistentes ao estresse térmico de ensaios de estabilidade preliminar e a formulação ME-CIN5 proporcionou maior penetração cutânea da zidovudina nas duas membranas avaliadas. Portanto, a combinação de miristato de isopropila, labrasol®, plurol® e 5% de cineol 1,8 é um veículo promissor para via transdérmica do AZT ou para fármacos com características semelhantes.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.D.P., COSTA, A.A., SERAFINI, M.R., ROSSETI, F.C., MARCHETTI, J.M., SARMENTO, V.H., NUNES, R.S., VALERIO, M.E.G, ARAÚJO, A.A., LIRA, A.A.M. Preparation and characterization of chloroaluminum phtalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles by thermal

analysis and powder X – ray diffraction techniques. **J Therm Anal Calorim.** nº108, p.191-196, 2012.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos – uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos. Brasília, 2008.

CARVALHO, A. L. M. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco. Título: Cinética de difusão in vitro e atividade in vivo de preparações magistrais de cetoprofeno. Recife, 2007.

CARVALHO, F. C. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Título: Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina. Araraquara, 2010

CARVALHO, A. L. M., CUNHA, C. P., CRUZ, E. T. L., SILVA, J. A., LIRA, A. A . M.; SANTANA, D. P. Spectrophotometric determination of zidovudine – loaded microemulsion and application in assay of in vitro realease kinetics. **Latin American Journal of Pharmacy**, 2012 in press

CHORILLI, M; PRESTES, P.S; RIGON, R.B; LEONARDI, G.R; CHIAVACCI, L.A; SARMENTO, V.H.S; OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Structural characterization an invivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and Surfaces B; Biointerfaces.** v. 85.p.182-188, 2011.

COTTE M. et al.; Synchrotron FT-IR microscopic study of chemical enhancers in transdermal drug delivery: example of fatty acids. **Journal of Controlled Release.** 97 (2004) 269 – 281.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M.; In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**. Belgrade-Serbia and Montenegro, v. 296, p. 73-79, 2005.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JUNIOR, A. A. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsão e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Vol. 41, n. 03, jul./set., 2005.

FORMARIZ, T.P; CHIAVACCI, L.A; SARMENTO, V.H.S; FRANZINI, C.M. SILVA-jr, A.A., SCARPA, M.V.; SANTILLI, C.V; EGITO, E.S.T; OLIVEIRA, A.G. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phsphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**.v.63.p.287 - 295, 2008.

FORMARIZ, T.P; CHIAVACCI, L.A; SARMENTO, V.H.S; SANTILLI, C.V; EGITO, E.S.T; OLIVEIRA, A.G. Relationship between features and in vitro release of doxorubicin from biocampatible anionic microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**.v.60.p.28-35, 2007.

LIRA, A.A.M.; SESTER, E.A.; SANTANA, D.P.; WANDERLEY, A.G. et al. Development of lapachol topical formulation: anti-inflammatory study of a selected formulation. **AAPS PharmSciTech.**, v. 9,p.163-168, 2008.

MAINARDE, R.M; KHALIL, N. M. GREMIÃO, M.P.D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 395, p.266-271 , 2010.

MARJUKKA T.S. et al.; Chemical enhancers of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal of Controlled Release**. 59 (1999) 149 – 161.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 1, p. 33-54, jan/mar., 2002.

MENDONÇA, C. R. B.; BICA, C. I. D.; PIATNICKI, C. M. S. Water in sorbean oil microemulsion as médium for electrochemical measurements. **J. Braz. Chem. Soc.** Porto alegre. v. 14, nº 4, p. 628-636, 2003.

NASCIMENTO, J. E. Avaliação farmacocinética de comprimidos contendo lamivudina e zidovudina em plasma humano. São Paulo. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol.40 no.1, 2004.

NUNES, R.S; AZEVEDO, J.R; VASCONCELOS, A.P; PEREIRA, N.L. Estudo de padronização da pele de cobra espécie – Boa constrictor – como modelo de estrato córneo para permeação de fármacos. v 1. nº 7. p.171-175, 2005.

OH, S. Y.; JEONG, S. Y.; PARK, T.G.; LEE, J.H. Enhanced transdermal delivery of AZT (Zidovudine) using iontophoresis and penetration enhancer. **Journal of Controlled release**. Turin. v. 51, p. 161 – 168, 1998.

PANNCHAGNULA, R.; NARISHETTY, S. T. K. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. **Journal of Controlled release**. Turin. v. 95, p. 367 – 379, 2004.

PANNCHAGNULA, R.; NARISHETTY, S. T. K. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. Effect of L – menthol and 1,8 cineole on phase behaviour and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine. **Journal Controlled release**. Turin. v. 102, p. 59 – 70, 2005.

SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A.K. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: mechanistic view. **AAPS journal**.v. 10, Nº 1, P.120 – 132, 2008.

SILVA J.A., DAMASCENO, B.P.G.L., BORBA,V.F.C., EGITO, E.S.T., SANTANA, D.P. Uso de diagramas de fase pseudoternários como ferramenta de obtenção de nanoemulsões transdérmicas. **Rev. Bras. Farm.** 90(3): 245-249, 2009A.

SILVA. J.A.; SANTANA, D.P.; BEDOR, D.G.C.; BORBA, V.F.C.; LIRA, A.A.M.; EGITO, E.S.T. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Quim. Nova**, vol.32, nº6, p. 1389-1393, 2009B.

SILVA. J. A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA. M.R.S., DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS. A.C.D. Administração cutânea de fármaco: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, vol.31, nº 3, p.125 -131, 2010.

SUWANPIDOKKUL, N.; THONGNOPNUA, P.; UMPRAYN, K. Transdermal delivery of Zidovudine (AZT): the effects of vehicles, enhancers, and polymers membranes on permeation across cadáver pig skin. **AAPS PharmaSciTech**. EUA. v.5 (3),48.p 01 – 08, 2004.

VADDI, H.K; HO, P.C; CHAN, S.Y. Terpenes in propylene glycol as skin-penetration enhancers: permeation and partition haloperidol, fourier transform infrared spectroscopy, and differential scanning calorimetry. **Journal of Pharmaceutical Science**.v.91, nº 7, p.1639 – 165, 2002.

Capítulo IV

ARTIGO III - Spectrophotometric determination of zidovudine – loaded microemulsion and application in assay of *in vitro* release kinetics –
Artigo aceito no *Journal Latin American of Pharmacy (JLAP)*

CAPÍTULO IV – Artigo III

6. Spectrophotometric determination of zidovudine – loaded microemulsion and application in assay of *in vitro* release kinetics

CARVALHO, A.L.M.^{1,4*}; CUNHA, C.P¹; CRUZ, E.T.L.¹; SILVA, J.A.²; LIRA., A.A.M.³ SANTANA, D. P. de^{4*}.

¹ Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Campus Ministro Petrônio Portela s/n, Ininga, CEP 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Campus Universitário, Rua Juvêncio Arruda s/n, Bodocongó , CEP 58100-001, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

³ Departamento de Fisiologia, Curso de Farmácia, Avenida Marechal Rondon s/n, Cidade Universitária, São Cristóvão, CEP 49.100.000, Aracaju, Sergipe, Brasil.

⁴ Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC), Rua Professor Arthur de Sá s/n, cidade universitária, CEP 50740-520, Recife, Pernambuco, Brasil.

e-mail: aluismenezes@yahoo.com.br

**Spectrophotometric determination of zidovudine – loaded microemulsion
and application in assay of *in vitro* release kinetics**

Abstract. This work aimed at developing a method for quantification of zidovudine (AZT) in microemulsion system and samples derived from *in vitro* release kinetics. The samples were quantified by UV spectrophotometry at 266 nm wavelength. The method was linear between 4 and 25 µg/mL, the coefficient of correlation (R^2) was 0.9998; it showed coefficient of variation below 5% in intra-run and inter-run precision. The recovery was obtained with values close to the 100% of theoretical at three different concentrations using ethanol as solvent. *In vitro* release kinetics was evaluated in Franz cell set with pre-collection set at 6-hour interval. The method is suitable for zidovudine quantification in samples of microemulsion systems evaluated using relatively low cost solvents and no complex extraction techniques.

Keywords: HIV, Nanotechnology, Quality Control, Transdermal,

6.1. Introduction

Zidovudine (3'-azido-2', 3'-deoxythymidine, AZT), a nucleoside analogue active against human immunodeficiency virus (HIV), was the first drug approved for the treatment of AIDS and HIV infection (1987)¹. Currently, AZT is used in isolation or treatment regimens for the prophylaxis of vertical transmission of HIV and virus spread in accidental instance²⁻³. However, its prolonged use by the conventional route of administration may have toxic effects, drug resistance, influence of first-pass hepatic effects and therapeutic failure⁴⁻⁵.

The development of transdermal systems for antiretroviral therapy has attracted increasing interest in recent decades. Various carriers are designed to promote controlled and reproducible release for a long period of time in the systemic circulation^{6,7,8}. They also have advantages over conventional antiretroviral therapy once it may enable the use of hydrophilic drugs with low oral bioavailability, dose-dependent toxicity, thereby providing the user with fewer side-effects and increased drug effectiveness in the treatment⁹⁻¹⁰.

Microemulsions are isotropic, transparent and thermodynamically stable dispersions, usually consisting of four component mixtures, water, oil, surfactant and co-surfactant^{11,12,13}. Due to their high proportion of surfactants, these nanocarriers can interact with the corneum stratum destabilizing its lipid bilayer, increasing the skin permeability and facilitating the substances penetration, which usually would not pass through such barrier, for example the AZT¹⁴.

Analytical methods for AZT quantification described in official compendia and literature are based on the high performance liquid chromatography – HPLC^{15,16}, titration¹⁷ and UV Spectrophotometry^{17,18}. HPLC is a high cost and longer analysis method for pharmaceutical companies and research centers. The other reported methods use prior stages of complexation, extractions and high cost solvents. Overall, titration and UV/VIS spectrophotometry used for analysis of raw materials and conventional pharmaceutical forms are not applied to the quantification of this drug transmitted through colloidal carriers, since these release systems are composed of different types of oils, high concentrations of surfactants and polymers. Therefore, the objective of this study was to develop and validate an analytical method for AZT quantification in

microemulsion system and samples derived from release kinetics *in vitro* tests. Thus providing technological development of transdermal nanocarriers of zidovudine.

6.2. Material and methods

6.2.1. Chemical and reagents

Standard zidovudine was used (Northeast® batch DY070040 - 97.8% content), isopropyl myristate - Henrifarma, batch 0606-195 (oil phase), Labrasol®-Gattefosse (PEG-8 caprylic / capric glyceride), batch 104 250 (surfactant); Plurol Oleic®-Gattefosse (polyglyceryl-6 dioleate) batch 101555 (co-surfactant) Ethanol-VETEC, Triethanolamine, buffer solutions (NaOH/H₂KPO₄) pH 7.4. Water was purified using a MilliQ system® from Millipore (Molsheim, France). All other chemicals used were of analytical purity grade.

6.2.2. Preparation of microemulsions

Samples were obtained by mixing specific proportions of surfactant/co-surfactant (36% Labrosol® and 9% oleic plurol®) with oil phase (5% isopropyl myristate) and 47.5% aqueous phase under magnetic stirring at room temperature. The formulations are derived from pseudoternary diagrams previously developed by our research group¹⁹. The incorporation of zidovudine (2.5%) was performed after forming the microemulsion systems ME. Each formulation has remained in balance for 48 hours to be used in the validation and *in vitro* release kinetics experiment.

6.2.3. The analytical method validation

The method validation was obtained by evaluating the parameters linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, specificity, accuracy and robustness as described in the Resolution - RE n ° 899 of 29 May 2003²⁰.

6.2.3.1. Linearity, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD)

The linearity was performed using the linear regression by the method of least squares of medium points of three curves with a minimum of five points in triplicate at concentrations 4.0, 12.0, 16.0, 20.0 and 25.0 µg/mL AZT in ethanol p.a. under conditions recommended by the National Health Surveillance Agency - ANVISA²⁰ and International Conference on Harmonization - ICH²¹, confirmed by the coefficient of correlation (r^2) obtained from the linear regression. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined according to the Resolution 899/2003-ANVISA.

6.2.3.2. Specificity, Precision, Accuracy and Robustness

For specificity, spectrophotometric scans were performed (180 to 360nm) with samples prepared only with placebo microemulsion in ethanol and others with microemulsion containing 2.5% AZT in triplicate. The method precision was evaluated for repeatability and reproducibility. The repeatability is determined by analyzing six individual samples with the same concentration (16.0 µg/mL) in a short time interval. In the reproducibility was performed the analysis of six individual samples with the same concentration (16.0 µg/mL) at different laboratories and different equipment. Accuracy was assessed based on the degree of recovery, as percentage of placebo solutions fortified with known amounts of AZT, in triplicate ($n = 3$), at concentrations of 80%, 100% and 120% of the working concentration. The robustness was evaluated under different laboratory temperatures: 32 °C and 29 °C.

6.2.4. Method application for zidovudine quantification in samples derived from *in vitro* release kinetics.

The evaluation of zidovudine amount released from the microemulsion was performed using four Franz diffusion cells connected to a thermostat bath at 37 °C $\pm$ 0.5 arranged individually in magnetic stir plate. An aliquot of 400 mg of each formulation was applied to the donor compartment (with 1.15 cm²

diffusion area) separated by a membrane (0.45 μM) of the receiver compartment (with volume ± 6 mL) which was pre-filled with buffer phosphate (pH 7.4). In the release study was used an artificial membrane of cellulose acetate (0.45 μm). Samples were collected from the receiver solution (2.0 mL) and analyzed by spectrophotometry at pre-determined intervals (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 and 6.0 hours). The selectivity for release kinetics was evaluated by the experiment using a drug-free microemulsion sample.

6.3. Results and Discussion

6.3.1. Method validation

6.3.1.1. Linearity, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD)

The linearity was obtained in the range 4-25 $\mu\text{g/mL}$, the line equation $y = 0.0406x + 0.0029$ and its corresponding correlation coefficient was $r^2 = 0.99998$. The absorbance values corresponding to the concentrations analyzed are described in Table 1.

Table1. Absorbance results for AZT solutions in ethanol at each concentration and their respective standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV).

Sample ($\mu\text{g/mL}$)	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Mean	SD	CV (%)
4	0.165	0.168	0.165	0.166	0.001	0.817
12	0.487	0.489	0.495	0.490	0.004	0.856
16	0.650	0.644	0.653	0.6491	0.004	0.672
20	0.817	0.814	0.821	0.8174	0.003	0.44
25	1.020	1.014	1.019	1.0178	0.003	0.329

Statistical analysis of the curve points (Table 1) showed coefficients of variation (CV) lower than 5% as recommended by the literature and an acceptable result was obtained in the range of 95% by the analysis of variance (ANOVA) at 5% probability,. The F_{critical} (4.667) was higher than the $F_{\text{calculated}}$ (3.708). Moreover, there was no lack of fit in the model. The limits of quantification and detection calculated were 3.03 $\mu\text{g/mL}$ and 1.99 $\mu\text{g/mL}$, respectively^{20,21,22}.

6.3.1.2. Specificity, Precision, Accuracy and Robustness

The method specificity is shown in Figure 1, which shows 2.5% absorption spectra for AZT solution in ethanol and placebo formulation sample in ethanol. There were peaks related to the AZT absorption separately from the peaks related to the components of the solvent or formulation. The placebo formulation absorbance at 266 nm is negligible and does not interfere with the AZT determination.

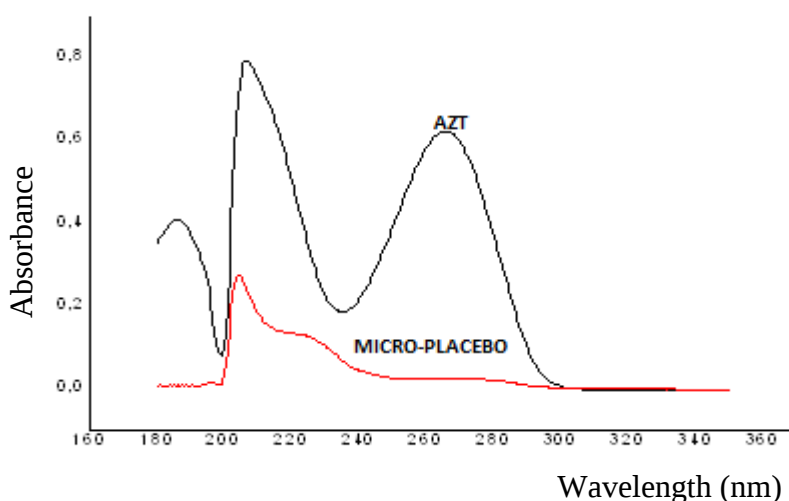


Figure 1. Overlay of the spectra obtained between 180 and 360 nm solution of AZT and AZT-free placebo formulation.

The repeatability and reproducibility results are shown in Table 2. These results associated to the coefficient of variation and recovery percentage show that the method is precise, once the values are lower than 5%. The coefficient of variation for reproducibility and repeatability was below 5%. Moreover, the method accuracy was verified, since the limits for recovery were not less than 80% and not superior to 120%^{20,21,22}.

Table 2. Results for repeatability and reproducibility

Samples	Repeatability	Reproducibility
ABS 1	0.672	0.696
ABS 2	0.675	0.684
ABS 3	0.660	0.677
ABS 4	0.667	0.671
ABS 5	0.678	0.670
ABS 6	0.679	0.670
Mean	0.672	0.678
SD	0.00684	0.010
CV (%)	1.02	1.475

The coefficient of variation (CV) for reproducibility and repeatability were below 5%. The analysis performed in another laboratory confirmed the method reproducibility, once (Table 2) after the statistical evaluation (t-student) was found no significant difference among means obtained at $p < 0.005$.

The method accuracy is shown in Table 3. All concentration values obtained were very close to the theoretical value. The coefficient of variation remained below 1% in all samples and met the national health legislation²⁰.

Table 3. Results for accuracy.

Conc. AZT	1	2	3	Mean	SD	CV %	Theoretical conc ($\mu\text{g/mL}$)	Practice conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
2.0%	0.51	0.51	0.51	0.51	0.0015	0.30	12.80	12.40	97.20
2.5%	0.64	0.64	0.64	0.64	0.0058	0.91	16.00	15.70	98.20
3.0%	0.75	0.76	0.76	0.76	0.0025	0.33	19.20	18.60	96.90

The method robustness was evaluated through the analysis performed at two different temperatures (32 °C and 29 °C). There was no statistically significant difference among samples at different temperatures, since the F-calculated (3.197) < F-critical (7.709). Therefore, the method was robust according to the parameter analyzed²².

6.3.1.3 Method application for AZT measurement on *in vitro* release kinetics.

The *in vitro* release profiles after 6 hours testing are shown in Figure 2. These results demonstrated the analytical method application for zidovudine quantification on *in vitro* release experiments derived from samples of microemulsion system.

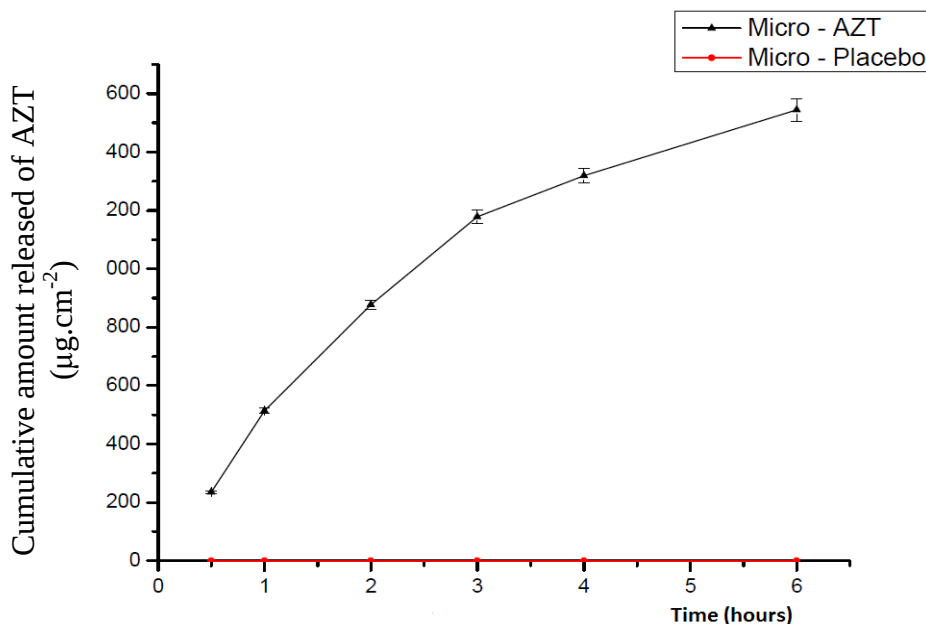


Figure 2. *In vitro* release profile of AZT-ME (Micro - AZT) and ME (Micro-placebo). Each point represents the mean $\pm$ SD of 4 determinations.

The rate of drug release from the microemulsion system and the cumulative amount of AZT released after 6 hours ($Q_{6\text{hours}}$) were respectively, $120.44 \pm 28.62 \mu\text{g.cm}^{-2}$ and $1.544 \pm 38.67 \mu\text{g/cm}^2/\text{h}$. The release rate was calculated in the linear portion of the plot for *in vitro* release kinetics obtained from the linear regression defined in Figure 24,23,25. The tests proved to be reproducible and selective, once replicates were obtained with slight standard deviation from the mean at each sampling point and the test with the micro - placebo showed no ultraviolet absorption at the wavelength used in the methodology for AZT quantification during the entire experimental period.

6.4. Conclusion

The method developed for AZT quantification in microemulsion system by UV spectrophotometry was linear, precise, accurate, specific and applicable to *in vitro* release kinetic studies. Furthermore, there were good reproducibility and specificity using the solvent of relatively low cost, easy access and absence of prior drug extraction in the formulation. Thus, future research on these colloidal carriers for transdermal purposes is encouraged through studies of physiochemical characterization and *in vitro* release kinetics.

6.5. Acknowledgement

We acknowledge the Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco State (LAFEPE) for donating the drug and the Research Foundation of the State of Piauí (FAPEPI) and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPQ) for the financial support.

6. References

- [1] Lefebvre, I., J.Y.Puy, C. Perrin C, C. Périgaud (2007) *J Chromatogr. B* **858** (1-2): 2–7.
- [2] Santos, J.V., L.A.E. Batista de Carvalho, M.E.S.R.T. Pina (2008) *Lat Am J Pharm* **27**(2):303-313.

- [3] BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. *Protocolo de Assistência Farmacêutica em DST/AIDS/HIV: recomendações do grupo de trabalho de Assistência Farmacêutica*. Available at (http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_assistencia_farmaceutica_aids.pdf).
- [4] Suwanpidokkul, N., P. Thongnopnua & K. Umprayn (2004) *AAPS PharmaSciTech* **5** (3): 01 – 08.
- [5] Narishetty, S. T. K. & R. Panchagnula (2005) *J Control Release* **102**: 59 – 70.
- [6] Martins, M.R.F.M & F. Veiga. *Braz. J. Pharm. Sci.* **38**(1): 33-54, 2002.
- [7] Ojewolw, E, I. Mackraj, P. Naidoo & T. Govender (2008) *Eur J Pharm Sci.* **70** (3): 697–710, 2008.
- [8] Narishetty, S. T. K. & R. Panchagnula (2004) *J Control Release* **95**: 367-379.
- [9] Kantarci, G, I. Ozguney, H.Y. Karasulu, S. Arzik & T. Guneri (2007) *AAPS PharmSciTech.* **8**(4): article 91, 2007.
- [10] Liu, C. H & C.T. Wu (2012) *Colloid Surface A: Physicochem. Eng. Aspects* **353** (2010): 149–156, 2012.
- [11] Heuschkel, S., A. Goebel & R.H.H. Neubert (2008) *J Pharm Sci-US* **97**(2):603- 631.
- [12] McClements, D.J (2012) *Soft Matter* **8**:179-1719.
- [13] Formariz, T.P., M.C.C. Urban, A.A. da Silva- Júnior, M.P.D. Gremião & A.G. Oliveira (2005) *Braz. J. Pharm. Sci.* **41**(3):301 -313.

- [14] Oliveira, A.G., M.V. Scarpa, M.A. Correa, L.F.R. Cera & T.P. Formariz (2004) *Quim. Nova* **27**(1): 131-138.
- [15] Farmacopéia Brasileira, 5ª Ed. (2010) Brasília: Editora Ateneu.
- [16] Carvalho, F.C., M.S. Barbi & M.P.D. Gremião (2009) ***Chromatographia*** **69**(2): 207 – 2011.
- [17] Basavaiah, K & A.Kumar (2007) *Indian J Chem Techn* **14**:200-203.
- [18] Basavaiah, K & A.Kumar (2007) *J Chem* **4**(2):173-179.
- [19] Silva, J.A., B.P.G.L. Damasceno, V.F.C. Borba, E.S.T. Egito & D.P de Santana (2009) *Rev. Bras. Farm.* **90**(3): 245-249.
- [20] Brasil (2003) *Guia para validação de métodos analíticos*. Diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899.
- [21] International Conference on Harmonization (2005): *Guidance for Industry Q2B-R1 Validation of Analytical Procedures: Methodology*. U.S Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research.
- [22] Ribani, M., C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim & L.F.C. Melo (2004) *Quim. Nova* **27**(5): 771 – 780.
- [23] Diefenbach, I.C.F., M. Friedrich, C.F. Bittencourt, M.R. Santos & A.L.V. Escarrone (2008) *Lat Am J Pharm* **27** (4): 612-617.
- [24] Cornélio, R & P. Mayorga (2007) *Lat Am J Pharm* **26**(6):883-888.
- [25] Silva, J.A., A.C. Apolinário, M.S.R. Souza & B.P.G.L. Damasceno, A.C.D. Medeiros. (2010) *Rev Ciênc Básica Apl.* **31**(3): 125-131.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir:

- ✓ A zidovudina foi incorporada por agitação mecânica leve e foi possível acrescentar 25mg/g do fármaco em um sistema microemulsionado a base de polietilenoglicol-8 cáprico/caprílico glicerídeo (Labrasol®) e poligliceril 6-dioleato (Plurol Oléico®) como tensoativo e co-tensoativo respectivamente e o miristato de isopropila como fase oleosa;
- ✓ As formulações obtidas apresentaram limpidez, isotropia, ausência de partículas suspensas e pH compatível com a pele. O tamanho de partícula das preparações não ultrapassou 200nm, características importantes de sistemas microemulsionados que objetiva a via transdérmica.
- ✓ Foram desenvolvidos e validados 02 (dois) métodos de quantificação da zidovudina por espectrofotometria UV e por cromatografia de alta eficiência (CLAE) para quantificação do AZT nas formulações e nas amostras e pele de orelha de porco. Todos os métodos foram lineares, específicos, repetitivos e reprodutíveis. Além disso, apresentou baixo limite de quantificação (LQ) e tempo de retenção para o método de CLAE e para o método de espectrofotometria UV a possibilidade de quantificar o azt com solvente de baixo custo (etanol), em relação a outros solventes (metanol e clorofórmio), além da ausência de técnicas complexas de extração do fármaco na matrix microemulsionada.

- ✓ A formulação ME promoveu a penetração cutânea da zidovudina e a formulação LP funcionou como reservatório, com isso não possibilitou a entrada do fármaco na pele. Inviabilizando este sistema de LP como matrix de liberação transdérmica.

- ✓ A incorporação dos promotores ocorreu de forma satisfatória e as características funcionais da microemulsão não foram alteradas. A formulação ME-CIN5 duplicou a penetração do fármaco na pele em relação ao controle ME. Em relação ao controle de uma solução aquosa, o fator de promoção do azt foi de 4,3 vezes maior para a formulação ME-CIN5, tornando-se assim um veículo promissor para utilização do azt por esta via ou para fármaco com características semelhantes.

Referências Bibliográficas

8.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQIL, M.; AHAD, A.; SULTAMA, Y.; ALI.A. Status of terpenes as skin permeation enhancers. **Drug Discov Today**. v. 12, nº23/24, p.1061- 1067, 2007.

AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN – FILHO, C. A.; SARRUF, F. D.; TAVANTE-JUNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S. O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E. P. G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rotina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Braz. J. Pharm. Sci.** v.44, nº 2, 2008.

BABY, A. R.; LACERDA, A. C.; VELASCO, M. V. R.; LOPES, P. S.; KAWANO, Y.; KANEKO, T.M. Evaluation of the interaction of surfactants with startum corneum model membrane from *Bothrops jararaca* by DSC. **Int J Pharm.** v.317, 2008. p. 7 – 9.

BARRY, B.W. A novel approach for identifying synergistic mixtures of skin penetration enhancers promises to transform development of transdermal products, including patches. **Nat Biotechnol.** v. 22, p. 165 – 167, 2004.

BARRY, M.; MULCAHY, F.; MERRY, C.; GIBBONS, S.; BACK, D. Pharmacokinetics and potential interactions amongst antiretroviral agents used to treat patients with HIV infection. **Clin Pharmacokinet.**v. 36, n. 4, p. 298-304, 1999.

BECHTOLD, I. H. Cristais líquidos: um sistema complexo de simples aplicação. **Rev. Bras. Ens. Fís.** v. 27, nº 3, 2005.p. 333 – 342.

BONNABRY, C. Mise au point et validation de modeles d'étude in vitro du passage percutané – Université d'auvergne – UFR de pharmacie, 1999.

BONOLO, P. F.; GOMES, R. R. F. M.; GUIMARÃES, M. D. C. Adesão à terapia anti-retroviral (HIV/Aids): fatores associados e medidas de adesão. **Epidemiol serv saúde**, v. 16, nº 4, 2007. p. 261-278.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Guia para avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Brasília, p.43, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV. 7 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. Protocolo de assistência farmacêutica em DST/HIV/Aids: recomendações do grupo de AIDS
<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS3B800322PTBRIE.htm>. Acesso em: 05 mar.

BRITO, A.M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C.L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada.

BONNABRY, C. Mise au point et validation de modeles d'étude in vitro du passage percutané – Université d'auvergne – UFR de pharmacie, 1999.

BRITO, M. A. Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1: enfuvirtida, maraviroc, raltegravir e etravirina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 32, nº 2, 2011. p. 159 – 168.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2006

CANDAU, F.; PABON, M.; ANQUETIL, J. Y. Polymerizable microemulsions: some criteria to achieve an optimal formulation. **Colloids and Surfaces B.** Strasbourg, v. 153, 1999.p. 47-59,

CARVALHO, A. L. M. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco. Título: Cinética de difusão *in vitro* e atividade *in vivo* de preparações magistrais de cetoprofeno. 2007.

CARVALHO, F. C. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Título: Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina. Araraquara, 2009.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **J Control Release**, v.141, nº 3, 2010.p. 277 – 299,

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica estudo de caso. Determinação de cádmio por

espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Quím. Nova.** Brasil, vol. 24, nº3, 2001.p.374 – 380,

CONSTATINIDES, P. P.; SCALART, J. P. Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long-versus medium-chain glycerides. **Int J Pharm.** King of Prussia, v. 158, p. 57-68, 1997.

DAMASCENO, B.P.G.L; SILVA, J.A, OLIVEIRA, E.E, SILVEIRA, W.L.L, ARAÚJO, I.B, OLIVEIRA, A.G, EGITO, E.S.T. Micremulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 32, nº 1, 2011. p. 9 -18,

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M.; In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. **Int J Pharm.** v. 296, 2005. p. 73-79,

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M.; KRAJISNIK, D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug **Int J Pharm.** v. 271, 2004.p. 11-19,

ESCRIBANO, E., CALPENA, A. C., QUERALT, J., OBACH, R., DOMÉNECH, J., Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. **Eur J Pharm Sci.** Barcelona, v. 19, p. 203-210, 2003.

FDA (FOOD and DRUG ADMINISTRATION), acessado em 20 de Agosto de 2012, disponível em <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm312210.htm>.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JUNIOR, A. A. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsão e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 41. n. 03, p. 301 – 313, 2005.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistema de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farm. Bonaerense.** Argentina, volume 23, p. 558- 566, 2004.

GIR, E., VAICHULONIS, C. G .; OLIVEIRA, M. D. Adesão à terapêutica anti-retroviral por indivíduos com HIV/AIDS assistidos em uma instituição do interior paulista. **Rev Latino-am Enfermagem.** 2005. V. 13, n. 5, pág. 634-641.

GOODMAN, L. S. **Goodman & Gilman:** As bases farmacológicas da terapêutica. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p.1821.

GUO, C.; QANG, J.; CAO, F.; LEE, E. J.; ZHAI, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discov Today.** v.15, nº 23/24, 2010, p. 1032 – 1040.

HADGRAFT, J. Skin deep. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v.58, n.2, p.291-299, 2004.

KANG, L.; POH, A. L. ; FAN, S. K.; HO, P. C.; CHAN, Y. W. CHAN, S. Y. Reversible effects of permeation enhancers on human skin. **Eur J Pharm Sci.** v. 67, 2007. p. 149 – 155.

KAUSHIK, D.; COSTACHE, A.; MICHNIAK, B. Percutaneous penetration modifiers and formulation effects. **Int J. Pharm.** v. 386, nº 1-2, 2010.p. 42-51.

KAUSHIK, D.; MICHNIAK-KOHN, B. Percutaneous penetration modifiers and formulation effects: thermal and spectral analyses. **AAPS PharmSciTech.** v.11, nº 3, 2010.p.1068 – 1083.

KE, W. T.; LIN, S. Y.; HO, H. O.; SHEU, M. T. Physical characterizations of microemulsion systems using tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) as a surfactant for the oral delivery of protein drugs. **J Control Release.** Taiwan, v. 102, 2005.p. 489-507.

LAWRENCE, M. J.; RESS, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Delivery Rev.** v.45, nº1, , 2000.p.89 – 121.

LEONARDI, G. R.; CHORILLI, M. Dermofarmácia – Bases Dermocosméticas microemulsionadas e lipossoma. Editora RX, São Paulo, p. 17 – 21, 2008.

LEUNG, R.; SHAH, D. O. Microemulsions: an evolving technology for pharmaceutical applications. In: ROSOFF, M. (ed). **Controlled release of Drugs: Polymers and aggregate systems.** v. 1, 1989.p. 185-216.

LIRA, A.A.M.; SESTER, E.A.; SANTANA, D.P.; WANDERLEY, A.G. et al. Development of lapachol topical formulation: anti-inflammatory study of a selected formulation. **AAPS PharmSciTech.**, v. 9, 2008.p.163-168.

LONGO, D. P. **Obtenção, Caracterização e Estudo de Liberação in vitro e Permeação in vivo de Sistemas Microestruturados Contendo Cafeína.** 2006. 130 F. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MAINARDES, R.M; KHALIL, N. M. GREMIÃO, M.P.D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **Int J Pharm.** vol. 395, 2010.p.266 – 271.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para ciclodextrinas. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 38, n. 1, p. 33-54, jan/mar., 2002.

Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista,

MENDONÇA, C. R. B.; BICA, C. I. D.; PIATNICKI, C. M. S. Water in sorbean oil microemulsion as médium for electrochemical measurements. **J. Braz. Chem. Soc.** Porto alegre. v. 14, nº 4, 2003.p. 628-636.

NOKHODCHI, A.; SHARABIANI, K.; RASHIDI, M. R.; GHAFOURIAN, T. The effect of terpene concentrations on the skin penetration of diclofenac sodium. **Int J. Pharm.** v. 335, 2007. p. 97 – 105.

NUNES, R.S; AZEVEDO, J.R; VASCONCELOS, A.P; PEREIRA, N.L. Estudo de padronização da pele de cobra espécie – Boa constrictor – como modelo de estrato córneo para permeação de fármacos. **Scientia Plena.** v.1, nº 7, 2005. p.171-175.

OH, S. Y.; JEONG, S. Y.; PARK, T.G.; LEE, J.H. Enhanced transdermal delivery of AZT (Zidovudine) using iontophoresis and penetration enhancer. **J Control Release.** Turin. v. 51, 1998. p. 161 – 168.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P., Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quím. Nova,** São Paulo, v. 27, n. 1, 2004.p. 131-138.

PADOIN, S. M. M.; PAULA, C. C.; ZUGE, S. S.; PRIMEIRA, M. R.; SANTOS, E. E. P.; TOLENTINO, L. C. Fatores associados à não adesão ao tratamento antirretroviral em adultos acima de 50 Anos que têm HIV/AIDS. **J Bras Doenças Sex Transm.** v. 23, nº 4, 2011, p. 194-197.

PANNCHAGNULA, R.; NARISHETTY, S. T. K. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. **J Control Release.** Turin. v. 95, 2004.p. 367 – 379.

PANNCHAGNULA, R.; NARISHETTY, S. T. K. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. Effect of L – menthol and 1,8 cineole on phase behaviour and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine. **J Control Release.** Turin. v. 102, 2005. p. 59 – 70.

PAOLINO, D.; VENTURA, C. A.; NISTICO, S.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Lecithin microemulsions for the topical administration of Ketoprofen: Percutaneous adsorption through human skin and *in vivo* human skin tolerability. **Int J Pharm.** Catania, v. 244, 2002. p. 21-31.

PERNO, Carlo Federico. The discovery and development of HIV therapy: the new challenges. **Revista Ann Ist Super Sanità.** vol. 47, n 01, 2011.p. 41- 43.

PIERI, F. M.; LAURENTI, R. HIV/AIDS: Perfil epidemiológico de adultos internados em Hospital Universitário. **Cienc Cuid Saude.** v.11(suplem.), 2012. p. 144 – 152.

PRAÇA, F. S .G. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Título: Liberação e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais. Ribeirão Preto, 2010.

PRESTES, P. S.; RIGON, R. B.; CORRÊA, N. M. N.; LEONARDI, G. R. Avaliação da estabilidade físico-química de emulsão acrescida de uréia dispersada, ou não, de propilenoglicol. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 30 (1), 2009. p. 47 - 53.

RAUT, Y. S.; SURUSE, P. B.; SHIVHARE, U. D.; BHUSARI, K. P. Development and evaluation of non-ionic surfactant based organogels for transdermal delivery of zidovudine. **Pharmacie Globale.** v. 1, nº 3, 2010.p. 1 – 7.

SAULNIER, P.; ANTON, N.; HEURTAULT, B.; BENOIT, J.P. Liquid crystals and emulsion in the formulation of drug carriers. **C. R. Quimie.** v. 11, p. 221-228, 2008.

SILVA, P. **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7.ed, p.1081. 2006.

SILVA. J. A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA. M.R.S., DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS. A.C.D. Administração cutânea de fármaco: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, vol.31, nº 3, 2010.p.125 -131.

SILVA. J.A.; DAMASCENO, B.P.G.F; BORBA, V.F.C; .; BEDOR, D.G.C.; EGITO, SANTANA, D.P . Uso de diagramas de fase pseudoternários como ferramenta de obtenção de nanoemulsões transdérmicas. **Rev. Bras. Farm**, vol.90, nº3, 2009A. p. 245-249.

SILVA. J.A.; SANTANA, D.P.; BEDOR, D.G.C.; BORBA, V.F.C.; LIRA, A.A.M.; EGITO, E.S.T. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Quim. Nova**, vol.32, nº6, 2009B. p. 1389-1393.

SILVEIRA, V. L., DRACHLER, M. L.; LEITE, J. C. C.; PINHEIRO, C. A. T. Characteristics of HIV antiretroviral regimen and treatment adherence. **Braz. J. Infect. Dis.**v. 7, 2003. p.194-201.

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. **J Control Release.** Israel, v. 95, 2004. p. 173-183.

SOUZA, M.N. ; PAULA, C. S.; MIGUEL, M. D. ; ZANETTI, V. C.; MIGUEL, O. G.; ZANIN, S. M. W. Acompanhamento farmacoterapêutico a pacientes usuários de enfuvirtida. **Rev Ciênc Farm Apl.** v. 31, nº 3, 2012. p. 235 – 239.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. Biofarmacotécnica – Ciências Farmacêuticas. 1ª edição, editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2009.

SUHONEN, T.M.; BOWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 59, 1999. p. 149 – 161.

SUWANPIDOKKUL, N.; THONGNOPNUA, P.; UMPRAYN, K. Transdermal delivery of Zidovudine (AZT): the effects of vehicles, enhancers, and polymers membranes on permeation across cadáver pig skin. **AAPS PharmaSciTech.** EUA. v.5 (3),48. 2004. p 01 – 08.

TAHA, M. O.; AL-GHAZAWI, M.; ABU-AMARA, H; KHALIL, E. Development of quantitative struture-property relationship models for pseudoternary microemulsions formulated with nonionic surfactants and molecular modeling. **Eur J Pharm Sci.** Amman, v. 15, 2002.p. 461-478.

TASSOPOULOS, T. F. PHD in Faculty of Natural Sciences, University of Basel. Title: Evaluation of topical bioavailability in human stratum corneum in vivo by tape stripping using a direct spectroscopic method, Riehen, 2006.

TERÇARIOLI, G. R.; ALKMIM,W. Raltegravir: perfil de resistência genotípica em indivíduos infectados pelo HIV. **Revista Tendências em HIV/AIDS.** v. 5, nº 12, 2010. p. 14-18.

TORRES, D. V. M.; MIRANDA, K. C. L. Enfuvirtida para o tratamento do paciente com AIDS: o divisor de águas. **Ciênc. saúde coletiva.** v. 15, supl. 1, 2010. p.1133 - 1142.

TROTA, M.; UGAZIO, E.; PEIRA, E.; PULITANO, C. Influence of íon pairing on topical delivery of retinoic acid from microemulsions. **J Control Release.** Turin, v. 86, 2003. p. 315-321.

UNAIDS. WHO. Report on the global HIV/AIDS epidemic 2008: executive summary. WHO, 2008.

APÊNDICE A

9 Apêndice A

Desenvolvimento e validação da Metodologia Analítica por HPLC para quantificação da zidovudina.

1.0– Materiais e métodos

Condições cromatográficas.

As análises foram realizadas por CLAE-UV (Perkin Elmer). A Separação cromatográfica isocrática foi realizada com uma coluna C18 com 12,5 x 4,0 mm e tamanho de partícula de 5µm. A fase móvel constituída inicialmente de metanol e água (30:70, v/v), sendo filtrada, degaseificada e bombeada a um fluxo de 1,3 mL/min. O volume de injeção foi de 100 µl .

Para determinar o comprimento de onda (λ) onde ocorre maior absorção para a zidovudina, realizou-se a leitura na região UV de 200 a 500nm no próprio equipamento CLAE-UV. A validação da metodologia analítica foi baseada no método de padronização externa e de acordo com o guia de validação de metodologias analíticas e bioanalíticas da ANVISA (RE nº 899, de 29 de maio de 2003).

Obtenção da curva de calibração da zidovudina na região UV.

Para a construção da curva analítica, primeiramente preparou-se três soluções-mãe de Zidovudina (200µg/mL), e foram realizadas as diluições em fase móvel e em solução tampão pH 7,4 para as concentrações correspondentes a 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0µg/mL. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente. Estas amostras foram analisadas por

CLAE e os resultados obtidos relacionados em um gráfico da concentração da solução pela área do pico. A curva analítica foi obtida em triplicata ($n=3$).

Determinação da linearidade da curva analítica.

A avaliação da linearidade do método analítico, ou seja, a proporcionalidade entre a concentração e a resposta foi realizada mediante a obtenção de uma curva analítica e do cálculo do coeficiente de variação (CV%) entre os pontos da curva, do coeficiente de correlação linear (R) e da equação da reta. A ferramenta estatística realizada foi a análise de variância (ANOVA).

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

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de um analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação (LQ) inferior e superior é a menor e maior, respectivamente, quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). Estes parâmetros, LD e LQ foram calculados experimentalmente pela análise das concentrações decrescentes.

Estudo de interferentes

A seletividade do método foi verificada pela análise de possíveis interferentes experimentais. Dessa forma, foram analisadas as soluções

obtidas a partir do homogeneizado da pele e do estrato córneo sem fármaco (descrita no item 3.5).

Avaliação da recuperação da zidovudina extraída das amostras da pele

A pele da orelha de porco será utilizada como modelo nos estudos de recuperação, seletividade (interferentes) e permeação/retenção *in vitro*. Para tal, a pele da parte externa das orelhas proveniente de animais recentemente sacrificados em matadouros locais foi retirada da cartilagem com auxílio de pinça e bisturi, seguindo-se a remoção do tecido gorduroso remanescente na pele. As secções de pele foram então congeladas por até um mês antes de serem utilizadas nos ensaios.

Para avaliar a recuperação da zidovudina nas amostras da pele, primeiramente o estrato córneo (EC) foi retirado de uma área de $1,77\text{cm}^2$ da pele de orelha de porco com o uso de 15 fitas adesivas (tape stripping). As fitas contendo o estrato córneo foram colocadas em um tubo de ensaio onde foram adicionados volumes conhecidos ($100\mu\text{l}$) de uma solução metanólica do fármaco (concentrações média, alta e baixa da curva padrão determinada no item 3.4.2) conforme tabela 2.

Tabela 2. Quantidades de solução metanólica de zidovudina adicionadas nas fitas adesivas contendo o EC ou na pele sem o EC para estudo de recuperação do fármaco.

Concentração da solução metanólica (µg/mL)	Volume da solução adicionada à pele (µL)	Quantidade teórica de zidovudina adicionado (µg)	Concentração teórica obtida (µg/mL)
2000	100	200	50
1000	100	100	25

O solvente foi evaporado e em seguida adicionado 4 mL de metanol:água (30:70, v:v), utilizado como solvente extrator, para a extração do fármaco das fitas contendo o estrato córneo. O tubo foi agitado por 2 minutos e submetido a banho de ultrassom por 30 minutos, seguido de filtração e quantificação por CLAE.

O pedaço de pele sem o EC foi picotado e transferido para um tubo Falcon. A este tubo foi adicionado volumes conhecidos (100µL) de uma solução metanólica do fármaco semelhante ao item anterior e após evaporação do metanol foi adicionado 4 mL do solvente extrator para a extração do fármaco. Em seguida, o tubo foi colocado no homogeneizador de tecidos por 1 min. e em banho de ultrassom por mais 30 minutos, seguido de centrifugação e filtração utilizando membranas com poro de diâmetro 0,45µm e quantificação por CLAE (n=5).

A recuperação (R) será determinada pela seguinte fórmula:

$$R = (\text{concentração obtida} / \text{concentração real}) \times 100$$

Determinação da solubilidade do fármaco em tampão de fosfatos pH 7,4

A solubilidade da zidovudina foi determinada mediante o preparo de dispersões contendo excesso de zidovudina. Nesse procedimento, realizado em triplicata, excesso de zidovudina foi transferido para frascos com tampa.

Em cada frasco foram adicionados 5mL de diferentes soluções de tampão fosfato. Essas dispersões foram homogeneizadas por meio de agitação magnética à temperatura ambiente por um período de 24 horas e, em seguida, filtradas em filtro Milipore®, com auxílio de uma bomba a vácuo e analisado por CLAE.

Concentração (µg/mL)	Área	Precisão (CV %)
0,5	17489,82 ± 855,73	4,9
1	30425,01 ± 286,95	1,9
5	155889 ± 2726,08	0,7
10	327807,8 ± 16157,95	4,9
25	856630,8 ± 37187	4,3
50	1773492 ± 72757,72	4,1

2.0 – Resultados da padronização do método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Validação do método analítico de quantificação de zidovudina por CLAE–UV

As Figuras 6 e 7 mostram a curva analítica obtida para a zidovudina em fase móvel e em tampão pH 7,4, respectivamente. As padronizações foram realizadas partindo-se de quantidades conhecidas do fármaco obtidas a partir de uma solução metanólica estoque na concentração de 200 µg/mL (padronização externa).

A metodologia para a análise da zidovudina mostrou linearidade na faixa de 0,5 a 50 µg/mL, com coeficiente de correlação linear de 0,999 para as amostras diluídas em fase móvel. Para as amostras diluídas em tampão, um coeficiente de correlação linear de 0,998. Segundo a ANVISA (*Resolução RE nº 899*, de 29 de maio de 2003) o coeficiente de correlação linear deve ser

igual ou superior a 0,95. Sendo assim, o valor de R obtido para a análise da zidovudina está dentro dos limites estabelecidos.

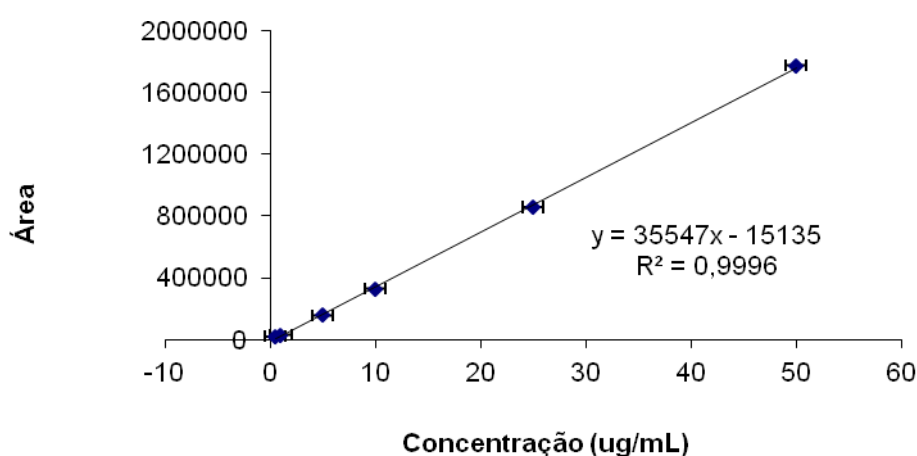


Figura 6. Representação da curva analítica da zidovudina em fase móvel obtido por CLAE (0,5 – 50,0 µg/mL). Os resultados apresentados representam a média ± desvio padrão de três determinações (n = 3).

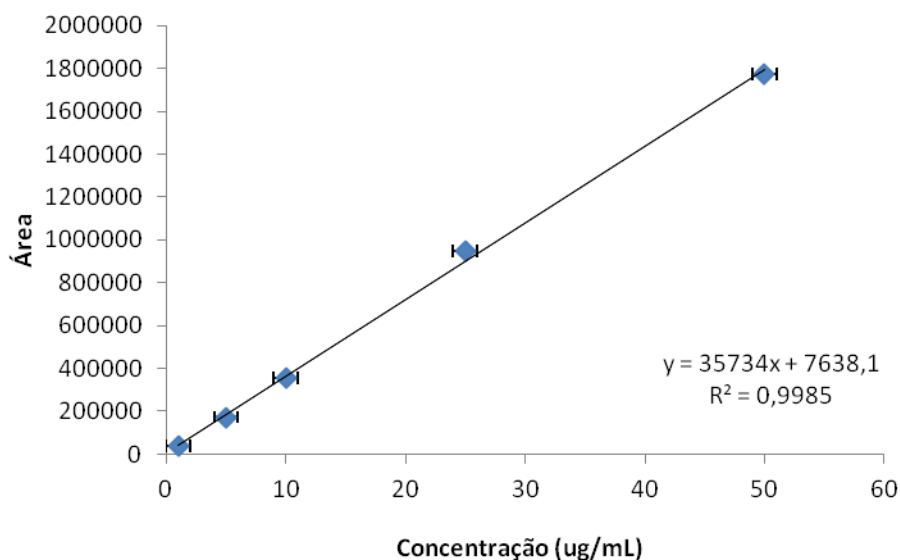
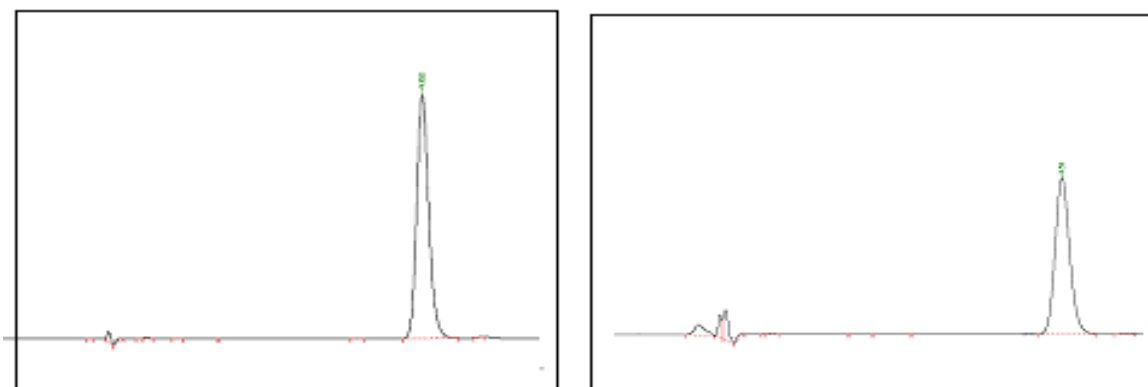
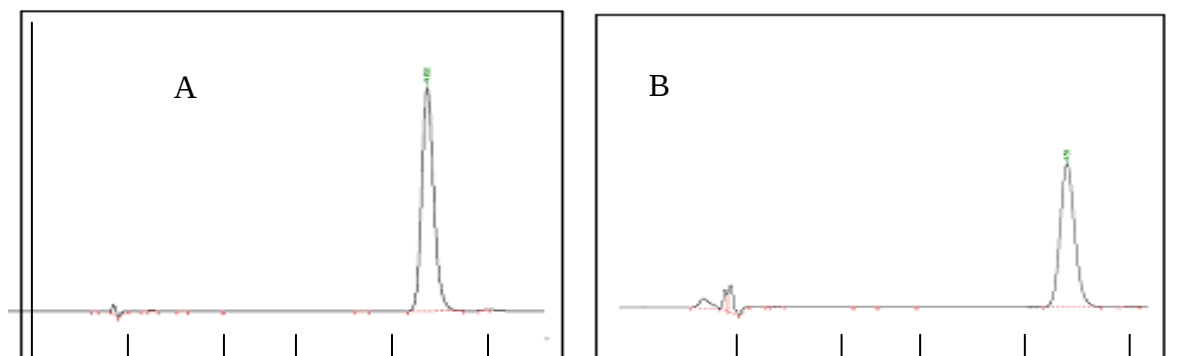


Figura 7. Representação da curva analítica da zidovudina em solução tampão pH 7,4 obtido por CLAE (0,5 – 50,0 µg/mL). Os resultados apresentados representam a média ± desvio padrão de três determinações (n = 3).



Os cromatogramas obtidos a partir das condições de análise de quantificação empregadas estão representados na Figura 8. O tempo de retenção foi de aproximadamente 4,6 minutos para a zidovudina para os dois tipos de solventes utilizados.

Figura 8. Representação do cromatograma da zidovudina obtido por CLAE. (A) Amostra diluída em fase-móvel (25µg/mL). (B) Amostra diluída em tampão (10µg/mL).



O coeficiente de variação entre os pontos das curvas (CV%) estão apresentados nas tabelas 5 e 6. A ANVISA (Resolução - RE número 899, de 29 de maio de 2003) recomenda que o CV% não deve exceder 5%. Assim, os valores encontrados atendem os limites estabelecidos.

Tabela 6. Dados das curvas analíticas obtidas a partir de amostras diluídas em fase móvel.

Tabela 7. Dados das curvas analíticas obtidas a partir de amostras diluídas em tampão fosfato.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Precisão (CV %)
0,5	15039,11 $\pm$ 961,87	5,0
1	38744,4 $\pm$ 1192,65	3,1
5	172395,3 $\pm$ 456,19	0,3
10	356531,7 $\pm$ 6271,66	1,8
25	948606,6 $\pm$ 1844,34	0,2
50	1773690 $\pm$ 7241,72	0,4

Os parâmetros de limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o método foram determinados experimentalmente e corresponderam a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Valores importantes, em especial pela possibilidade de quantificação de fármaco mesmo em baixas concentrações, o que viabiliza a realização de cinéticas de liberação e permeação cutânea.

5.4. Estudo de interferentes:

Não foram observados interferentes em nenhuma das amostras analisadas a partir da pele no comprimento de onda utilizado conforme pode ser observado nas figuras 09 e 10.

Figura 9. Representação dos cromatogramas da análise das amostras da pele (epiderme + derme) sem fármaco obtido por CLAE (A) e tratada com o fármaco após 24 horas do experimento de permeação cutânea (B).

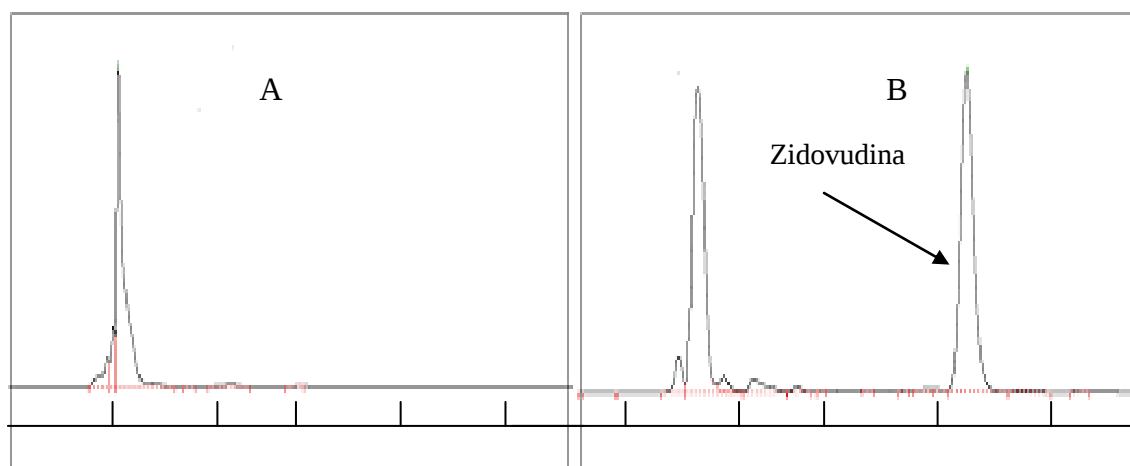
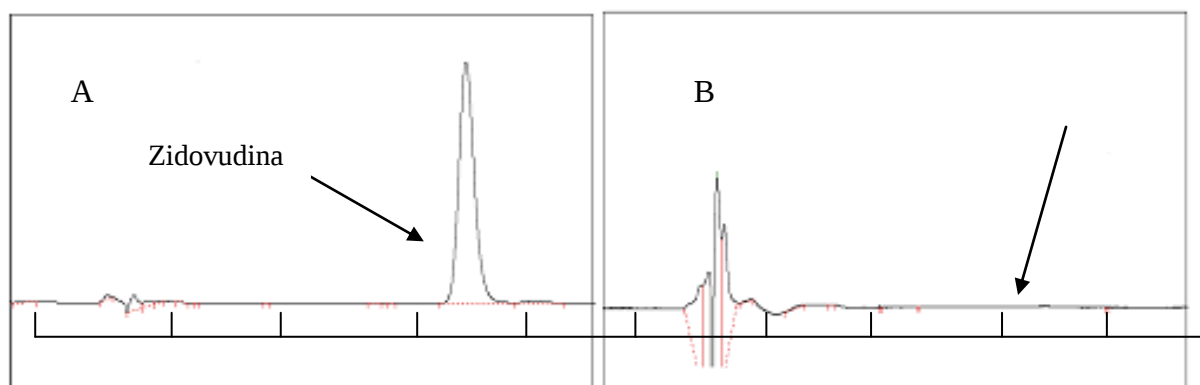


Figura 10. Representação dos cromatogramas da análise das amostras da pele (estrato córneo e fita adesiva obtidos da técnica de tape stripping) sem fármaco obtido por CLAE (B) e tratada com o fármaco após 24 horas do experimento de permeação cutânea (A).



Anexos

ANEXO A – ACEITE DO ARTIGO III

----- Mensagem encaminhada -----

De: Latin American Journal of Pharmacy <info@latamjpharm.org>

Para: ANDRÉ LUIS MENEZES CARVALHO <aluismenezes@yahoo.com.br>;
ANDRÉ LUIS MENEZES CARVALHO <aluismenezes@yahoo.com.br>

Enviadas: Quinta-feira, 2 de Agosto de 2012 13:29

Assunto: Latin American Journal of Pharmacy - Answer to the Presentation of Manuscript
August 2nd, 2012

ANDRÉ LUIS MENEZES CARVALHO

Universidade Federal do Piauí (aluismenezes@yahoo.com.br)

Manuscript Identification Number: LAJP 2919-12

Dear author:

I am glad to inform you that your article **Spectrophotometric determination of zidovudine – loaded microemulsion and application in assay of in vitro release kinetics'** by ANDRÉ L. M. CARVALHO^{1,4*}; CLEMILTON P. CUNHA¹; EMILSON T. L. CRUZ¹; JOSÉ A. DA SILVA²; ANA A. M. LIRA³; DAVI P. DE SANTANA⁴ has been accepted for publication in Latin American Journal of Pharmacy. In due moment you will receive the page proof consigning the issue where your article will be included.

Many thanks for your interest in our journal.

Reviewer's comments:

The revised version is suitable for being published

Yours sincerely,



Prof. Néstor O. Caffini, Editor
Latin American Journal of Pharmacy
E-mail: caffini@biol.unlp.edu.ar

Spectrophotometric Determination of Zidovudine-Loaded Microemulsion and Application in Assay of *In Vitro* Release Kinetics

Andre L.M.CARVALHO ^{1,4*}, Clemilton P.CUNHA ¹, Emison T.L. CRUZ ¹,
José A.da SILVA ², Ana A.M. LIRA ³ & Davi. P.de SANTANA ⁴

¹ Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Campus Ministro Petrônio Portela s/n, Ininga, CEP 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Campus Universitário, Rua Juvêncio Arruda s/n, Bodocongó, CEP 58100-001, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

³ Departamento de Fisiologia, Curso de Farmácia, Avenida Marechal Rondon s/n, Cidade Universitária, São Cristóvão, CEP 49.100.000, Aracaju, Sergipe, Brasil.

⁴ Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC), Rua Professor Arthur de Sá s/n, cidade universitária, CEP 50740-520, Recife, Pernambuco, Brasil.

SUMMARY. This work aimed at developing a method for quantification of zidovudine (AZT) in microemulsion system and samples derived from *in vitro* release kinetics. The samples were quantified by UV spectrophotometry at 266 nm wavelength. The method was linear between 4 and 25 µg/mL, the coefficient of correlation (R^2) was 0.9998; it showed coefficient of variation below 5 % in intra-run and inter-run precision. The recovery was obtained with values close to the 100 % of theoretical at three different concentrations using ethanol as solvent. *In vitro* release kinetics was evaluated in Franz cell set with pre-collection set at 6 h interval. The method is suitable for zidovudine quantification in samples of microemulsion systems evaluated using relatively low cost solvents and no complex extraction techniques.

INTRODUCTION

Zidovudine (3'-azido-2',3'-deoxythymidine, AZT), a nucleoside analogue active against human immunodeficiency virus (HIV), was the first drug approved for the treatment of AIDS and HIV infection ¹. Currently, AZT is used in isolation or treatment regimens for the prophylaxis of vertical transmission of HIV and virus spread in accidental instance ^{2,3}. However, its prolonged use by the conventional route of administration may have toxic effects, drug resistance, influence of first-pass hepatic effects and therapeutic failure ^{4,5}.

The development of transdermal systems for antiretroviral therapy has attracted increasing interest in recent decades. Various carriers are designed to promote controlled and reproducible release for a long period of time in the systemic circulation ⁶⁻⁸. They also have advantages over conventional antiretroviral therapy once it may enable the use of hydrophilic drugs with low oral bioavailability, dose-dependent toxicity, thereby providing the user with fewer side-

effects and increased drug effectiveness in the treatment ^{9,10}.

Microemulsions are isotropic, transparent and thermodynamically stable dispersions, usually consisting of four component mixtures, water, oil, surfactant and co-surfactant ¹¹⁻¹³. Due to their high proportion of surfactants, these nanocarriers can interact with the corneum stratum destabilizing its lipid bilayer, increasing the skin permeability and facilitating the substances penetration, which usually would not pass through such barrier, for example the AZT ¹⁴.

Analytical methods for AZT quantification described in official compendia and literature are based on the HPLC ^{15,16}, titration ¹⁷ and UV Spectrophotometry ^{17,18}. HPLC is a high cost and longer analysis method for pharmaceutical companies and research centers. The other reported methods use prior stages of complexation, extractions and high cost solvents. Overall, titration and UV/VIS spectrophotometry used for analysis of raw materials and conventional pharmaceutical forms are not applied to the quantifi-

KEY WORDS: HIV, Nanotechnology, Quality Control, Transdermal.

* Autor to whom correspondence should be addressed. E-mail: aluismenezes@yahoo.com.br

ANEXO B – APRESENTAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS**ANO 2012**

 **Bioencapsulation**
Research Group

**South-American Symposium
on Microencapsulation**

 **UNICAMP**



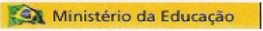
**Limeira, Brazil
April 30 - May 2, 2012**

Supported by

 **unesp**
Centro de
Aquicultura



 **CAPES**

 **Ministério da Educação**

 **FAPESP**

**Bioencapsulation Research Group**

5 rue de la maison blanche

44240 Sucé sur Erdre

Phone : +33 2 954 98 01 66

Contact@bioencapsulation.net

<http://bioencapsulation.net>

Siret : 410 792 154 00024

PROF ANA AMÉLIA LIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
FISIOLOGIA
AV. MARECHAL RONDON, S/N, ROSA
ELZE
49000-000 SÃO CRISTÓVÃO SERGIPE
BRAZIL

Date 2012-05-29
Our reference 2012_Limeira_158
Your reference

Certificate of attendance

I, undersigned, Denis Poncelet, President of Bioencapsulation Group, certify that Prof Ana Amélia Lira from Universidade Federal de Sergipe (Brazil) attended to the South-American Symposium on Microencapsulation hold in Limeira, Brazil, April 30 - May 2, 2012.

During the symposium, Prof Ana Amélia Lira has presented the following contribution:

TRANSDERMAL PERMEATION OF ZIDOVUDINE IN
NANOEMULSION SYSTEMS

as poster

Done in Limeira on May 2, 2012

Denis Poncelet

President of Bioencapsulation Research Group

Limeira, Brazil ; April 30 - May 2, 2012

TRANSDERMAL PERMEATION OF ZIDOVUDINE IN NANOEMULSION SYSTEMS

Lira, A.A.M.¹; Carvalho, A.L.M.²; Conceição, T.M.F.¹; Nunes, R.S.¹; Silva, J.A.³; Albuquerque Júnior, R.L.⁴; Sarmento, V.H.V.⁵; Santana, D.P.²

¹Federal University of Sergipe, Department of Physiology; ²Federal University of Pernambuco, Department of Pharmaceutical Sciences – UFPE; ³State University of Paraíba, Department of Pharmacy; ⁴University Tiradentes, Institute of Technology and Research; ⁵Federal University of Sergipe, Department of Chemistry.

Corresponding author: ana_lira2@hotmail.com

Keywords: Nanoemulsion, transdermal delivery, zidovudine, antiretroviral therapy.

Abstract:

The potential of antiretroviral drugs for transdermal administration has been extensively studied. However, one of the limitations of the transdermal delivery of these drugs is their poor skin permeation. This study aimed to evaluate nanoemulsion systems containing zidovudine (AZT) for transdermal administration in antiretroviral therapy. The nanoemulsions obtained and selected from pseudoternary diagrams were characterized by analyzing the droplet size, zeta potential, pH, rheological behavior, small-angle X-ray scattering (SAXS) and isotropy of these systems (polarized light microscope). *In vitro* permeation (using pig ear skin) and *in vivo* skin irritation studies (using mice) were also performed. As a result of physical-chemical characterization of the nanoemulsions, the droplet size was determined to be 128 to 132 nm. The droplet size of all nanoemulsions increased after the addition of AZT; however, these systems remained stable, homogeneous and isotropic. In the permeation study, the amount of drug that permeated was higher for the nanoemulsion when compared with the control, getting a permeation enhancer effect on the order of approximately 2-fold ($P < 0.05$). Microscopic analysis suggested only a few histopathological changes in animal skin treated with nanoemulsions, compared with the control group (hydrogel). Thus, nanoemulsion systems have proved to be stable and promising, able to promote permeation of the drug without promoting apparent skin irritation. **Acknowledgements:** MCT/CNPq



Bioencapsulation Research Group
5 rue de la maison blanche
44240 Sucé sur Erdre
Phone : +33 2 954 98 01 66
Contact@bioencapsulation.net
<http://bioencapsulation.net>
Siret : 410 792 154 00024

PROF ANA AMÉLIA LIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
FISIOLOGIA
AV. MARECHAL RONDON, S/N, ROSA
ELZE
49000-000 SÃO CRISTÓVÃO SERGIPE
BRAZIL

Date 2012-05-29
Our reference 2012_Limeira_158
Your reference

Certificate of attendance

I, undersigned, Denis Poncelet, President of Bioencapsulation Group, certify that Prof Ana Amélia Lira from Universidade Federal de Sergipe (Brazil) attended to the South-American Symposium on Microencapsulation hold in Limeira, Brazil, April 30 - May 2, 2012.

During the symposium, Prof Ana Amélia Lira has presented the following contribution:

EVALUATION OF NANOEMULSION AND LAMELLAR
LIQUID CRYSTALLINE SYSTEMS FOR TRANSDERMAL
ZIDOVUDINE DELIVERY
as poster

Done in Limeira on May 2, 2012

Denis Poncelet
President of Bioencapsulation Research Group

ANO 2011



Workshop sobre Luz Síncrotron

I Escola do Programa de Pós-graduação em Física da UFS



18 – 22 de julho de 2011, Aracaju - SE

Apoio:



CERTIFICAMOS que o trabalho **ESTUDO ESTRUTURAL POR SAXS E ESPALHAMENTO DE LUZ DE SISTEMAS MICROEMULSIONADOS CONTENDO ZIDOVUDINA**, de *André Luis M. Carvalho; Tamara N. F. da Conceição; Mário Ernesto G. Valerio; Rogéria de S. Nunes; Victor Hugo V. Sarmento; Davi P. Santana; Ana Amélia M. Lira*, foi apresentado na forma de **PAINEL** no Workshop sobre Luz Síncrotron, organizado pelo Programa de Pós-Graduação em Física da UFS.

Aracaju, 22 de julho de 2011.

Zélia Macedo
Zélia Soares Macedo
coordenadora



CERTIFICADO

P 032

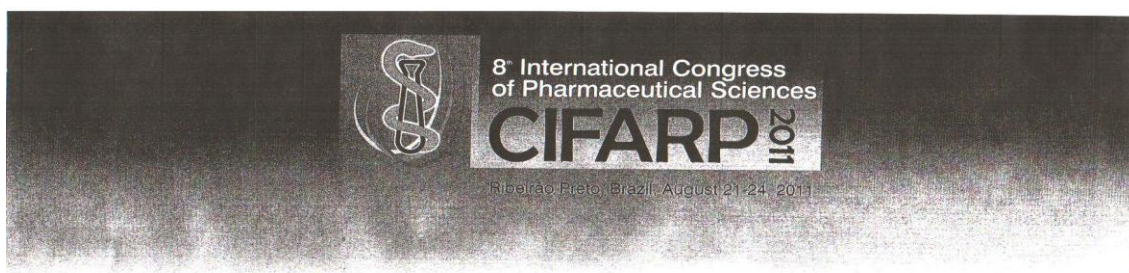
Certificamos que o trabalho científico intitulado **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV/VIS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ZIDOVUDINA EM MICROEMULSÃO E APLICAÇÃO EM CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*** de autoria de Ivana P. S. Carvalho, Clemilton P. Cunha, Emison T. L. Cruz, José A. T. Neto, André L. M. Carvalho, Ana A. M. Lira, José A. Silva, Davi P. Santana foi apresentado no 1º Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica e Inovação – WFI2011, realizado de 23 a 25 de março de 2011, no Mercure Del Mar Hotel, Aracaju, Brasil.

Prof. Dr. Adriano A. S. Araújo
Presidente do WFI 2011

Prof. Ruy Belém
Pró-Reitor de Extensão UFS

Prof. Gilton Kennedy
Pró-Reitor de Extensão UNIT



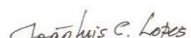


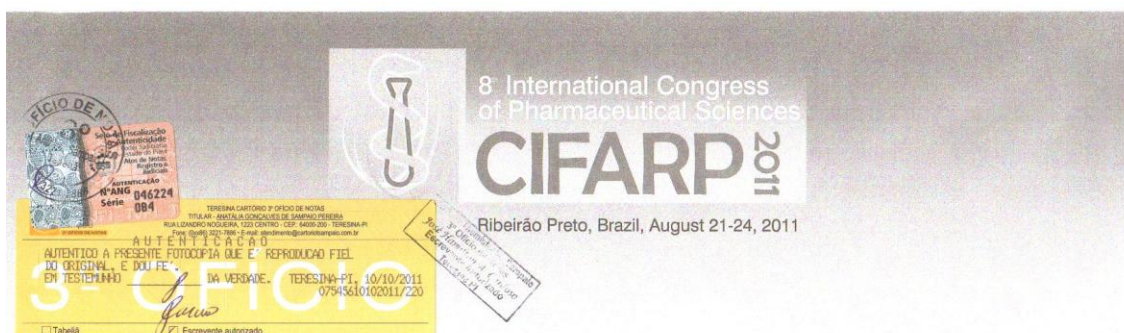
We certify that the abstract entitled "EFFECT OF ETHANOL ON IN VITRO PERCUTANEOUS PENETRATION OF ZIDOVUDINE-LOADED MICROEMULSION ON SNAKE SKIN." by authors: "TERCEIRO NETO, J.A.; CUNHA, C.P.; CARVALHO, A.L.M.; LIRA, A.A.M.; MIURA, L.M.C.V.; LEITE, J.R.S.A.; SANTANA, D.P." was presented in the poster session of the 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences — CIFARP 2011, held on August 21-24, 2011 in the Convention Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Ribeirão Preto, Brazil, August 24th, 2011


Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque
Dean of FCFRP-USP




Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes
Organizing Committee



We certify that the abstract entitled "PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF MICROEMULSIONS OF ZIDOVUDINE WITH DIFFERENT ENHANCERS OF SKIN PERMEATION AFTER FREEZE-THAW CYCLE." by authors: "CARVALHO, I.P.S.; CUNHA, C.P.; TERCEIRO NETO, J.A.; CARVALHO, A.L.M.; LIRA, A.A.M.; SILVA, J.A.; SANTANA, D.P." was presented in the poster session of the 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences — CIFARP 2011, held on August 21-24, 2011 in the Convention Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Ribeirão Preto, Brazil, August 24th, 2011


Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque
Dean of FCFRP-USP




Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes
Organizing Committee