



**Ministério da Educação
Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE PERMEAÇÃO
CUTÂNEA DE DICLOFENACO DE DIETILAMÔNIO EM SISTEMAS TÓPICOS
NANOEMULSIONADOS**

José Alexsandro da Silva

**Recife-PE
2008**



**Ministério da Educação
Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE PERMEAÇÃO
CUTÂNEA DE DICLOFENACO DE DIETILAMÔNIO EM SISTEMAS TÓPICOS
MICROEMULSIONADOS**

José Alexsandro da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Co-orientador: Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

**Recife-PE
2008**

Silva, José Alexsandro da

Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados /José Alexsandro da Silva. – Recife : O Autor, 2008. xxii,180 folhas ; il., quadro, graf., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Medicamentos orgânicos sintéticos. 2. Farmacotécnica. 3. Nanoemulsões. 4. Diclofenaco dietilamônio. 5. Cinética de permeação I. Título.

**615.014.2
615.31**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCS2008-
136**



**Ministério da Educação
Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Reitor

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

Vice-Reitor

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Pro-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof. José Thadeu Pinheiro

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Prof^a Jane Sheila Higino

Vice-chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Prof. Samuel Daniel de Souza Filho

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Prof. Pedro Rolim Neto

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

Prof^a Beat Saegesser Santos



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

Recife, 11 de julho de 2008.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 11 de julho de 2008 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Deptº de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Luis Alberto Lira Soares (Deptº de Tecnologia Farmacêutica e de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN)

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Ana Amélia Moreira de Lira (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Sergipe – UFSE)

Assinatura: _____

“Não deve existir barreiras para a liberdade de questionamentos, pois na ciência não existem dogmas. O cientista é livre, e deve ser livre para perguntar qualquer questão, para duvidar de qualquer afirmação, procurar qualquer evidência e para corrigir alguns erros”.

J. Robert Oppenheimer (Físico Americano)

DEDICATÓRIA

A minha dedicatória não poderia ser diferente da que fiz na minha dissertação de mestrado.

Por tudo que vocês representam para mim e por todo amor que lhes tenho...

Dedico este trabalho a toda minha família, e em especial a minha mãe Anatilde Casimiro da Silva e aos meus irmãos: José Carlos, José Nildomarques e Maria do Socorro e aos sobrinhos (as): Ana Carla, Christyanne, Dayanne, Francisco José e José Nidomarques Junior.

A memória do inesquecível José Zilmar da Silva, meu pai.

*“Prezada família o triunfo aqui alcançado está sendo fascinante para mim e ele não teria sido concretizado sem a presença de vocês que se doaram em silêncio e viveram meu sonho. Vocês fizeram de mim não apenas um profissional capacitado, mas, sobretudo um homem. A nossa família é merecedora desta vitória, pois sempre compartilhamos alegrias e tristezas e agora **SOMOS** merecedores desta vitória”.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela minha existência e por me dar forças para superar tantas dificuldades...!

Ao prof. Dr. Davi Pereira de Santana, pela oportunidade concedida, confiança a mim depositada e por me aceitar como orientador, depois da recusa de alguns, cujas contribuições foram essenciais para meu crescimento pessoal e científico, além do apoio, competência profissional e **amizade** demonstrada em todos os momentos do nosso convívio.

Ao meu co-orientador e grande amigo prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito pelas orientações científicas, ensinamentos sobre nanotecnologia, nanoemulsões, e pela sua competência profissional que foi primordial para o sucesso deste trabalho.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE pelos ensinamentos técnicos durante o desenvolver deste Doutorado.

Aos colegas e grandes amigos (as) do NUDFAC (Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético) e da Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE: André Luiz, André Correia, André Santos, Bráulio, Danilo Bedor, Eduardo, Elison, Homero, Júlio, Karine, Leila Bastos, Osman Jucá, Thalita Mota e em especial a Valéria Borba (aluna de iniciação científica) pela presença constante e árdua no desenvolver do nosso trabalho.

Ao Prof. e amigo Bolivar Ponciano Goulart Damasceno pela contribuição para a construção dos diagramas de fase e estudo de estabilidade das nanoemulsões.

Ao pessoal do LASID (Laboratório de Sistemas Dispersos da UFRN): Bolivar, Clara, Camila, Elquio, Fábio, Luciana, Laura, Junior, Henrique, Gysele, Leonardo, Luciana, Janus Pablo, Ramon, Toshiyuki.

Ao pessoal do LTM (Laboratório de Tecnologia de Medicamentos). Em especial ao Prof. Dr. Pedro Rolim pela disponibilização do seu Laboratório (Laboratório 1) para que fossem realizadas as análises espectrofotométricas da validação da metodologia analítica e aos grandes amigos (as): Adley, Jeckson, José Lamartine, Lívio César, Mônica, Magaly, Mariana, Regina.

Ao pessoal do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos. Em especial a Profa Dra. Miracy Muniz de Albuquerque pela amizade e disponibilização do seu Laboratório (Laboratório 2) para que fossem realizadas as análises espectrofotométricas da validação da metodologia analítica: Junior “Ceará”, Ruth, Rosário, Rossana.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, pela inserção neste programa.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Universidade Estadual Paulista (Unesp-Araraquara) pela atenção e sugestões no desenvolvimento do artigo 1, bem como pela disponibilização do seu laboratório para que fossem realizadas as análises de espalhamento de luz.

Ao Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderlei do Departamento de Farmacologia da UFPE pela contribuição e realização do estudo farmacológico.

A todos do Laboratório da Petrobrás (LAPET-UFRN), em nome de Jeane por realizar o estudo reológico das nanoemulsões.

Aos componentes da Banca Examinadora, funcionários e demais professores da UFPE e UEPB.

Meu muito obrigado!

SÚMARIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1. A pele	8
2.2. A função barreira da pele	10
2.3. Penetração cutânea	11
2.4. Diclofenaco de dietilamônio (DDA)	15
2.4.1. Propriedades físico-químicas e farmacológicas do DDA	15
2.5. Microemulsões ou nanoemulsões (NE)	16
2.5.1. Formação e componentes das NE	20
2.5.2. Diagramas de fase	22
2.5.3. Termodinâmica e teoria de formação das NE	23
2.5.4. Caracterização das NE	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Materiais	31
4.2. Métodos	31
4.2.1. Construção dos diagramas de fase	31
4.2.2. Seleção das formulações	32

4.2.3. Padronização e validação das metodologias analíticas para o doseamento do DDA	33
4.2.3.1. Validação por espectrofotometria	33
4.2.3.2. Validação por CLAE-UV	35
4.2.4. Caracterização das NE	37
4.2.4.1. Doseamento do DDA nas NE	37
4.2.4.2. Determinação da eficiência de encapsulação	38
4.2.4.3. Centrifugação	38
4.2.4.4. Condutividade elétrica	38
4.2.4.5. Determinação da reologia	39
4.2.4.6. Determinação do pH	39
4.2.4.7. Índice de refração	39
4.2.4.8. Determinação da densidade relativa	40
4.2.4.9. Determinação do potencial zeta	40
4.2.4.10. Aspecto macroscópicos das NE	40
4.2.4.11. Determinação do tamanho das gotículas das NE por espalhamento de luz	40
4.2.4.12. Microscopia de luz polarizada	41
4.2.5. Estudo de liberação <i>in vitro</i> do DDA em membranas sintéticas	41
4.2.6. Estudo <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutânea	43
4.2.6.1. Obtenção das peles suína e humana	43
4.2.6.2. Determinação da solubilidade do fármaco em tampão fosfato pH 7,4	44
4.2.6.3. Avaliação da recuperação do DDA em pele da orelha de porco e humana.....	44
4.2.6.4. Estudo de retenção e permeação <i>in vitro</i>	46
4.2.6.5. Cálculo do fluxo (J) e do coeficiente de permeabilidade (K_p) do DDA nas NE	47

4.2.7. Determinação <i>in vitro</i> da atividade antiedematogênica por edema de pata induzido por carragenina em modelo animal	48
4.2.7.1. Obtenção dos animais	48
4.2.7.2. Avaliação da atividade antiedematogênica	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. Desenvolvimento da metodologia e otimização das condições analíticas para quantificação do DDA por espectrofotometria UV-VIS e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)	51
5.1.1. Validação do ensaio por espectrofotometria	53
5.1.2. Validação do ensaio por CLAE-UV	56
5.2. Diagramas de fase	58
5.3. Seleção das NE	62
5.4. Eficiência de encapsulação do DDA nas NE	63
5.5. Caracterização físico-química das NE selecionadas	67
5.6. Estudo de liberação <i>in vitro</i> do DDA em membranas sintéticas	76
5.7. Estudo de permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	78
5.7.1. Recuperação do DDA na pele humana e de orelha de porco	78
5.7.2. Permeação cutânea <i>in vitro</i> do DDA	80
5.7.3. Retenção cutânea do DDA na pele humana e orelha de porco	91
5.8. Avaliação da atividade antiedematogênica	94
6. CONCLUSÃO	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
8. ANEXOS	123

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

a/o	água/óleo
AINEs	Antiinflamatório não esteroideal
Abs _{sob}	Absorbância do DDA no sobrenadante
Abs _{ME-DDA}	Absorbância do DDA na microemulsão
D	Coeficiente de difusão das partículas
λ	Comprimento de onda
σ	Condutividade elétrica
K	Constante de Boltzmann
K _p	Coeficiente permeabilidade
CV	Coeficiente de variação
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência
DDA	Diclofenaco de dietilâmonio
DT	Dispersão turva
EA	Emulsão amarelada
ELBL	Emulsão líquida branca leitosa
ELO	Emulsão líquida opaca
ESS	Emulsão semi-sólida
DLS	Espalhamento de luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
EC	Estrato córneo
ED	Epiderme + derme
PCS	Espectroscopia correlação ftons
Φ_w	Fração volumétrica de fase aquosa
J	Fluxo
IR	Índice de Refração
LD	Limite de detecção

LQ	Limite de quantificação
NE	Nanoemulsão
NEG	Nanoemulsão gel
o/a	óleo em água
PEG-8	Polietilenoglicol-8
pH	Potencial hidrogeniônico
Φ_p	Percolação crítica
Φ_{up}	Percolação ultracrítica
QP	Quantidade permeada
Rh	Raio hidrodinâmico
SF	Separação fases
EE	Eficiência de encapsulação
UV-VIS	Ultravioleta – visível
η	Viscosidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da molécula do diclofenaco	3
Figura 2. Fórmula estrutural do diclofenaco de dietilamônio	4
Figura 3. Diagrama simplificado da estrutura da pele	9
Figura 4. Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (via intercelular e transcelular) através do estrato córneo	13
Figura 5. Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (via transepidérmica e via apêndice) através da pele humana, 1 = glândula sebácea, 2 = via transepidérmica e 3 = folículo piloso	13
Figura 6. Estrutura de uma gotícula dispersa em um sistema a/o e o/a, respectivamente	20
Figura 7. Representação esquemática de um diagrama ternário de fases	23
Figura 8. Fotografia da solubilização do DDA nas NE desenvolvidas	32
Figura 9. Fotografia do aparato de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado no desenvolvimento e validação do método	36
Figura 10. Figura ilustrativa de uma célula de difusão tipo Franz	42
Figura 11. Fotografia do método de preparação da pele da orelha de porco para estudo de permeação e retenção cutânea. a) lavagem da orelha; b) corte da pele da cartilagem; c) retirada da pele; d) remoção do tecido gorduroso	43
Figura 12. Representação esquemática da separação do EC e do ED pela técnica do <i>tape stripping</i>	45
Figura 13. Espectro de absorção do DDA na NE sem DDA e na NE-DDA na região de 250-350 nm em solução metanólica 20 µg mL ⁻¹	52
Figura 14. Representação do cromatograma do DDA para obtenção da seletividade do método em pele humana por CLAE-UV	53

Figura 15. Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo (Labrasol®)/poligliceril 6-dioleato (Plurol oleico®), miristato de isopropila e água para as proporções T:CO 1:1.	60
Figura 16. Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo (Labrasol®)/poligliceril 6-dioleato (Plurol oleico®), miristato de isopropila e água para as proporções T:CO 2:1.	61
Figura 17. Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo (Labrasol®)/poligliceril 6-dioleato (Plurol oleico®), miristato de isopropila e água para as proporções T:CO 3:1.	61
Figura 18. Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo (Labrasol®)/poligliceril 6-dioleato (Plurol oleico®), miristato de isopropila e água para as proporções T:CO 4:1.	62
Figura 19. Representação da classificação de Winsor, representados respectivamente da esquerda para a direita por Winsor I, Winsor II, Winsor III e Winsor IV	63
Figura 20. Monitoramento da condutividade elétrica (σ) da formulação NE- F1 sem DDA	69
Figura 21. Comportamento reológico do sistema NE-F1	72
Figura 22. Comportamento reológico do sistema NE-F7	73
Figura 23. Comportamento reológico do sistema NE-F10	73
Figura 24. Fotomicrografia obtida a temperatura de 25°C utilizando microscopia de luz polarizada da formulação NE-DDA F1, objetiva de 32, mostrando líquido isotrópico composto de 45% da mistura tensoativo/co-tensoativo, 5% fase oleosa e 50% fase aquosa.....	75
Figura 25. Fotomicrografia obtida a temperatura de 25°C utilizando microscopia de luz polarizada da formulação NE-DDA F10, objetiva de 32, mostrando gel isotrópico composto de 52,9 % da mistura tensoativo/co-tensoativo, 5,9 % fase oleosa e 41,2 % fase aquosa	75

Figura 26. Liberação in vitro do DDA na NE-DDA F10 gel e das formulações comerciais emulgel genérico e referência usando membrana artificial de acetato de celulose	77
Figura 27. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele da orelha de porco das NE-DDA F1 e F10 gel, referência e genérico	83
Figura 28. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele humana das NE-DDA F1 e F10 gel, referência e genérico.....	83
Figura 29. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele da orelha de porco da NE-DDA F1.	88
Figura 30. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele humana da NE-DDA F1.....	89
Figura 31. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele humana usando o modelo Higuchi da NE-DDA F1.....	89
Figura 32. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele da orelha de porco usando o modelo Higuchi da NE-DDA F1.....	90
Figura 33. Distribuição do DDA nas camadas da pele de orelha de porco após 24 horas de cinética	94
Figura 34. Distribuição do DDA nas camadas da pele humana após 24 horas de cinética	94
Figura 35. Atividade antiinflamatória das NE-DDA F1, NE-DDA F10 gel e emulgel referência pela técnica edema de pata induzido por carragenina 1%	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tamanho de agregados e das gotículas dispersas e diafanidade do meio.....	19
Tabela 2. Quantidades de solução padrão de DDA em metanol adicionadas nas fitas adesivas contendo o EC e na pele sem o EC para estudo de recuperação do fármaco	45
Tabela 3. Linearidade do método espectrofotométrico a partir de uma solução padrão de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol com as suas respectivas médias, precisão e exatidão	54
Tabela 4. Repetibilidade e precisão intermediária (precisão intra-corrida e a precisão inter-corrida entre analistas e dias diferentes da NE-DDA do método espectrofotométrico com suas respectivas médias, precisão e exatidão	55
Tabela 5. Linearidade do método por CLAE-UV a partir de uma solução padrão de 1 mg mL^{-1} em metanol com as suas respectivas médias, precisão e exatidão	57
Tabela 6. Precisão intermediária (precisão inter-corridas) entre analistas e dias diferentes da NE-DDA do método por CLAE-UV com suas respectivas médias, precisão e exatidão	58
Tabela 7. Composição centesimal das NE líquidas e gel obtidas nos diagramas pseudo-ternário	65
Tabela 8. Eficiência de encapsulação nas formulações selecionadas de NE-DDA	66
Tabela 9. Resultados da caracterização físico-química das NE-F1, NE-F7 e NE-F10	70
Tabela 10. Recuperação do DDA no EC e na ED em pele da orelha de porco	79
Tabela 11. Recuperação do DDA no EC e na ED em pele humana	79

Tabela 12. Quantidade permeada, fluxo e coeficiente de permeabilidade das formulações utilizadas no ensaio <i>in vitro</i> utilizando membrana da orelha de porco e da pele humana (n = 4, média ± DP)	82
---	----

Tabela 13. Retenção cutânea do DDA nas membranas da orelha de porco e pele humana.....	93
---	----

RESUMO

As nanoemulsões (NE) 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, pelas propriedades de solubilizar drogas hidrofílicas em meio lipofílico ou lipofílicas em meio aquoso e anfifílicas na interface óleo/água. O diclofenaco de dietilamônio (DDA) é um anti-inflamatório não esteroidal (AINEs), potente inibidor da síntese das prostaglandinas, que quando administrado topicamente, penetra na pele em quantidade suficiente para atingir de forma profunda o local de ação, apresenta metabolismo hepático, curto tempo de meia-vida biológica e um bom coeficiente de partição, além de serem capazes de formarem micelas e cristais líquidos liotrópicos em água. Devido à toxicidade gastrointestinal do diclofenaco, atualmente, existe uma grande motivação por parte da comunidade científica em desenvolver novas formas farmacêuticas, em sistemas dispersos, entre elas encontram-se as NE, com o objetivo de reduzir esses efeitos colaterais. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver e caracterizar formas farmacêuticas nanoemulsionadas para veiculação do DDA, através da cinética de permeação cutânea em pele suína e humana. As formulações obtidas, a partir dos diagramas de fase, foram caracterizadas e avaliadas quanto aos aspectos macroscópicos, eficiência de encapsulação, condutividade elétrica, pH, reologia, índice de refração, densidade, potencial zeta, microscopia por espalhamento de luz e microscopia de luz polarizada. O estudo *in vitro* de permeação e retenção cutânea foi realizado utilizando o modelo de Franz e a atividade antiedematogênica *in vivo* foi determinada, em modelo animal, utilizando a técnica de edema de pata induzido por carragenina. A técnica empregada para a determinação do diagrama de fases destes sistemas mostrou-se simples e reprodutível. As NE obtidas apresentaram a mesma limpidez, transparência e isotropia após a incorporação do DDA, mostrando que o fármaco não influenciou a tensão interfacial entre a fase aquosa e a oleosa, não perturbando a estabilidade termodinâmica dos sistemas. Os sistemas estudados na caracterização se comportaram como fluidos newtoniano tempo-independente, pois mantiveram a viscosidade constante, com a velocidade de cisalhamento aplicada. Os métodos analíticos propostos neste trabalho foram desenvolvidos a fim de disponibilizar procedimentos analíticos para quantificação do DDA na forma farmacêutica nanoemulsionada e em pele humana, devido à inexistência de

métodos oficiais destinados a estes tipos de ensaios e, por isso, os mesmos, podem ser considerados como metodologias alternativas para doseamento do DDA em formas farmacêuticas. Os métodos foram simples e apresentaram confiabilidade e segurança necessárias em procedimentos analíticos. Os parâmetros verificados garantiram rapidez, seletividade, linearidade, exatidão e precisão, apresentando-se, portanto, validado conforme a RE 899/2003 (ANVISA). Com o estudo de permeação percutânea, foi possível entender os fenômenos cinéticos de ordem zero e de pseudo-primeira ordem (modelo Higuchi) tanto em pele suína como humana. Finalmente, estes sistemas apresentaram grande estabilidade termodinâmica para o DDA, promovendo alta solubilidade em meio aquoso, além de apresentarem gotículas de tamanho adequado para sistemas transdérmicos de liberação controlada. Já o estudo *in vivo* em modelo animal mostrou que as NE apresentaram atividade antiedematogênica capazes de inibirem a inflamação. Desse modo, pode-se concluir que as nanoemulsões desenvolvidas seguem as normas de segurança e eficácia necessária para utilização pela via transdérmica.

Palavras-chave: Nanoemulsões, diclofenaco dietilamônio, diagrama fases, caracterização, cinética de permeação.

ABSTRACT

The nanoemulsions (NE) are transparent, isotropic and thermodynamically stable systems, formed spontaneously under a specific set of experimental conditions from mixtures of water and oil phases stabilized by a surfactant or a mixture of surfactant and cosurfactant. Because of their properties, especially the ability to carry lipophilic and hydrophilic drugs into their lipophilic and hydrophilic phases, respectively; and amphiphilic drugs into their oil/water interface, they present a large potential as a drug delivery system. Diclofenac diethylamine (DDA) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (AINEs), powerful inhibitor of prostaglandin synthesis which when is managed topically, penetrates an enough amount into skin for reaching the local. DDA presents hepatic metabolism, a short life span, and a low partition coefficient, and besides, is able to form micelles and lyotropic liquid crystals in water. In reason for diclofenac gastrointestinal toxicity, nowadays, there is a great motivation by the scientific community in developing new pharmaceutical ways in dispersed systems, among them, is found NE with the objective to reduce these collateral effects. The aims of this research were develop and characterize nanoemulsions pharmaceutical forms for propagation of the DDA, through cutaneous kinetic permeation in swine and human being. The resulted formula from the pseudo-ternary phase diagrams, had been characterized and evaluated such its macroscopic aspects, efficiency of encapsulation, electric conductivity, pH, rheology, refractive index, density, zeta potential, microscopy for light scattering and microscopy of polarized light. The study *in vitro* of cutaneous permeation and retention was made through the Franz model and the antiedematogenic activity *in vivo* was determined by an animal model, using paw's edema induced technique by carrageenan. The used technique to determine the pseudo-ternary phase diagram of these systems showed simple and reproducible. The gotten NE samples had presented the same limpidity, transparency and isotropy after the incorporation of the DDA, showing that the pharmaco did not influence the interfacial tension between the aqueous phase and the oily one, not disturbing the thermodynamic stability of the systems. The systems studied in the characterization behaved as Newtonian time-independent fluid, therefore they had kept constant viscosity, with the applied speed of shear. The analytical methods proposed in this paper had been developed in order to expose analytical procedures for DDA quantification in nanoemulsion pharmaceutical form and in human being skin, for this reason, the absence of official methods destined to

these types of assays, the same could be considered as a methodological alternative for DDA dosage in pharmaceutical forms. The methods had been simple and presented trustworthiness and security in analytical procedures. The verified parameters had guaranteed speedy, selectivity, linearity, accuracy and precision, presenting this way, validate according to RE 899/2003 (ANVISA). It was possible to understand the kinetic phenomena of order and pseudo-first order (Higuchi model) in swine skin such as human being as well. Finally, these systems had presented great thermodynamic stability for the DDA, promoting high solubility in aqueous way, besides presenting droplets of water in appropriate size to transdermical systems of controlled discharging. On the other hand, the *in vivo* study in animal model, showed that the NE had presented antiedematogenic activity able to inhibit the inflammation. This way, it can be concluded that the developed NE follow the safety and effectiveness requested norms for utilization in transdermic way.

Key–Words: Nanoemulsion, Dicoflenac diethylamine, pseudo-ternary phase diagrams, characterization, permeation kinetic.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A constante busca por novos conhecimentos e a necessidade de dominar novas tecnologias, principalmente num mercado globalizado, está rapidamente impelindo a humanidade para a próxima revolução tecnológica, ou seja, o domínio dos materiais em escala nanométrica (região entre o universo dos átomos e das moléculas).

A nanotecnologia e a nanociência vêm dando um impulso extraordinário à inovação e evolução do conhecimento, marcando presença em quase todas as revistas científicas da atualidade. Essa mudança, que tem sido crescente desde a última década, já está sendo assimilada pela cultura científica universal, e agora, permeia as Ciências Farmacêuticas através da abordagem dos novos sistemas para liberação de drogas e propriedades na escala nanométrica das nanoemulsões (TOMA, 2005). Existe uma discrepância na terminologia dos sistemas coloidais na escala nanométrica, sendo que muitos autores designam estes sistemas como microemulsões e outros como nanoemulsões. Portanto, neste trabalho, iremos obedecer à citação de SINTOV & SHAPIRO (2004) quando ele afirma *“quando o tamanho das gotículas nas microemulsões está usualmente entre 10 e 150 nm, estes sistemas podem ser denominados como nanoemulsões (NE)”*.

O carregamento de drogas por sistemas NE é considerado uma valiosa técnica para otimizar a liberação controlada de drogas, pois um sistema carreador de drogas na escala nanométrica permite boa estabilidade, absorção e excelente transferência tissular quantitativa, bem como, a esperada atividade farmacodinâmica (LACAVA, 2006).

Apesar das dificuldades, atualmente vários produtos nanotecnológico já se encontram no mercado na área farmacêutica, entre os quais temos as

nanopartículas e nanocápsulas que melhoraram as características de biodisponibilidade, controle da cinética de liberação e estabilidade (ARAKI, 2007). A nanotecnologia, mais especificamente as NE, se apresenta como um notável desafio para as ciências farmacêuticas, visto que o farmacêutico está acostumado a lidar com a tecnologia farmacêutica de forma condensada, cujas propriedades são expressas em termos micrométricos, deixando de lado o mundo nanométrico.

O diclofenaco {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil-acetato}, Figura 1, é um anti-inflamatório não esteroide (AINEs), potente inibidor da síntese das prostaglandinas, que quando administrado topicamente, na forma dietilamônio, penetra na pele em quantidade suficiente para atingir o local de ação de forma profunda, porém minimizando a toxicidade sistêmica (MAGNETTE; KIENZLER; SALLIN, 2004).

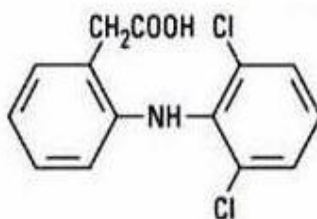


Figura 1. Fórmula estrutural da molécula do diclofenaco

Embora os AINEs constituam uma das classes de fármacos mais prescrita no mundo, seu uso como antiinflamatório continua sendo limitado pela incidência de seus efeitos indesejados, principalmente sobre o trato gastrointestinal, que incluem irritação, sangramento, ulceração e, eventualmente, perfuração da parede gastrointestinal (RODRIGUES, 1998). Devido à toxicidade gastrointestinal do diclofenaco, atualmente, existe uma grande motivação por parte da comunidade científica em desenvolver novas formas farmacêuticas, em sistemas dispersos, com

o objetivo de reduzir esses efeitos colaterais (MULLER; HAAS, 2004), entre elas encontram-se as NE.

O diclofenaco de dietilamônio (DDA), Figura 2, é uma molécula anfifílica que tem a capacidade de interagir com a porção lipídica da pele de forma distinta e quando veiculado em sistemas coloidais pode ocasionar uma transição de fases (KRIWET; MULLERGOYMANN, 1995) com formação de micelas e cristal líquido liotrópico em água (KRIWET; MULLERGOYMANN, 1993) e, de acordo com ESCRIBANO et al. (2003) essa interação com os fosfolipídeos da pele, contribui para aumentar a fluidez do DDA no estrato córneo (EC), fazendo com que os lipídios passem de uma forma cristalina ordenada para uma forma líquida desordenada, aumentando, portanto, a permeabilidade cutânea.

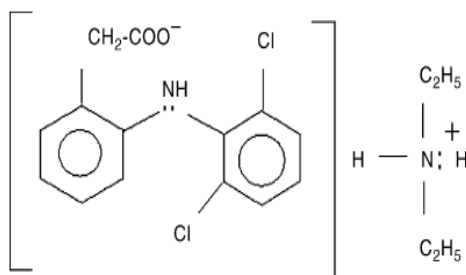


Figura 2. Fórmula estrutural do diclofenaco de dietilamônio

As NE 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, pelas propriedades de solubilizar drogas hidrofílicas em meio lipofílico ou lipofílico em meio aquoso e anfifílicas na interface óleo/água (KE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004; DJORDJEVIC et al., 2004; ESCRIBANO et al., 2003; MENDONÇA; BICA; PIATNICKI, 2003; PAOLINO et al., 2002; TAHA et al., 2002; SILVA, 2001; CANDAU; PABON, 1999; CONSTATINIDES;

SCALART, 1997; TROTA; GASCO, 1994; LEUNG; SHA, 1989). Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre dispersões instáveis e sistemas tradicionais de liberação tópica e transdérmicas, pois é possível a incorporação de vários tipos de compostos na fase que apresenta baixa constante dielétrica (fase oleosa), na região interfacial (constante dielétrica intermediária entre o óleo e a água) e ou na fase aquosa em que a constante dielétrica é elevada (KE et al., 2005; CHEN; CHANG, 2004; OLIVEIRA et al., 2004; SHA, 1998; LEUNG; SHA, 1989). Além disso, esses sistemas podem formar-se espontaneamente (SINTOV; BOTNER, 2006; PAOLINO et al., 2002; CANDAU; PABON, 1999) e resultarem em sistemas reservatórios com propriedades particulares (FORMARIZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004) podendo existir sob várias formas estruturais: globular (a/o, o/a), bicontínuas, cúbicas ou lamelares (JURKOVIC; GASPERLIN, 2004; SHA, 1998).

Vários estudos sugerem que as NE possuem o potencial de aumentar a penetração cutânea de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, quando comparadas aos veículos convencionais (CHEN; CHANG, 2004; SINTOV; SHAPIRO, 2004; WU; RAMACHANDRAN, 2001; DELGADO-CHARO et al., 1997; DREHER; WALDE; WEHRLI, 1997; KRIWET; MULLERGOYMANN, 1995; TROTA; GASCO, 1994;). Essa penetração se deve, basicamente, a dois mecanismos distintos: 1) aos altos gradientes de concentração de tensoativos promovidos pelo seu alto poder solubilizante de fármacos sem, contudo, aumentar a afinidade do veículo pelo fármaco; 2) e ao potencial promotor de penetração cutânea dos seus constituintes individuais (KREILGAARD, 2002). As NE são superiores às soluções micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, por isso, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos (FORMARIZ, 2004).

A microestrutura desses sistemas pode ser influenciada por interações moleculares de forma significativa, principalmente se a droga a ser incorporada tiver características anfifílicas como o DDA (OLIVEIRA et al., 2004). Portanto, atenção tem sido dada a esses sistemas, nos últimos anos, por sua capacidade em aumentar a eficácia terapêutica de diversos fármacos, permitindo a redução da dose administrada, minimizando os seus efeitos colaterais (FORMARIZ, 2004). Além disso, estes sistemas são capazes de compartimentalizar fármacos, com dimensões nanométricas, as quais possuem propriedades físico-químicas peculiares e diferentes do meio dispersante (ABOOFAZELI et al., 2000; BHARGAVA et al., 1987), o que pode ocasionar uma mudança na permeabilidade das membranas biológicas (CRUZ; UCKUM, 2001).

Nesse contexto, nos propomos neste trabalho de tese de doutorado a desenvolver uma forma farmacêutica de uso externo nesta escala, onde esperamos provocar um grande impacto científico e tecnológico, principalmente tendo em vista suas excepcionais propriedades físico-químicas, abrindo, portanto, novas possibilidades de aplicações nas mais diversas áreas da farmácia, pesquisa e desenvolvimento.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A pele

A pele não é apenas o maior órgão do corpo humano, mas é também um dos mais complexos, pois apresenta diferentes tipos celulares na sua estrutura (HADGRAFT, 2001), desempenhando diversas funções como: defesa, função sensorial (calor, frio, pressão, dor e tato), excreção e controle da temperatura (CHORILLI et al., 2007; HARDING, 2004; MENON, 2002); atua como barreira contra ataques físicos, químicos, microbiológicos e de raios ultravioletas, além de manter a temperatura corporal, impedindo a perda de água (BEMVINDO, 2006). Além disso, ela constitui uma via potencial de administração de fármacos devido ao fácil acesso e à sua grande superfície (LIRA, 2007). Sua área superficial é de aproximadamente 1,73 m² sendo irrigado por 1/3 do sangue, o que corresponde a 5 % da massa corporal (BARRY, 1983).

Possui alta resistência, fator essencial para sua função de proteção e é constituída por três camadas, do exterior para o interior: epiderme, derme, e uma terceira camada variável, a subcutânea ou hipoderme, Figura 3 (LIRA, 2007; REICHLING et al., 2006).

A epiderme é a camada que protege a pele contra o ambiente externo, ela apresenta em sua superfície epitelial externa uma camada de células mortas, queratinosas, que recebe o nome de estrato córneo (EC), na qual funciona como uma barreira eficaz contra microorganismos patogênicos, além de controlar a permeação de componentes pela pele (CHORILLI, 2007). O EC possui uma estrutura estratificada, hidrófila-lipófila, formada por células sem vitalidade chamada corneócitos (WILLIAMS; BARRY, 1992), que são achatadas de formato hexagonal, composta de queratina e água, envolvida por um envelope protéico e uma bicamada

lipídica sobreposta (BUCK, 2004), sendo responsável pela descamação da pele (MENON, 2002).

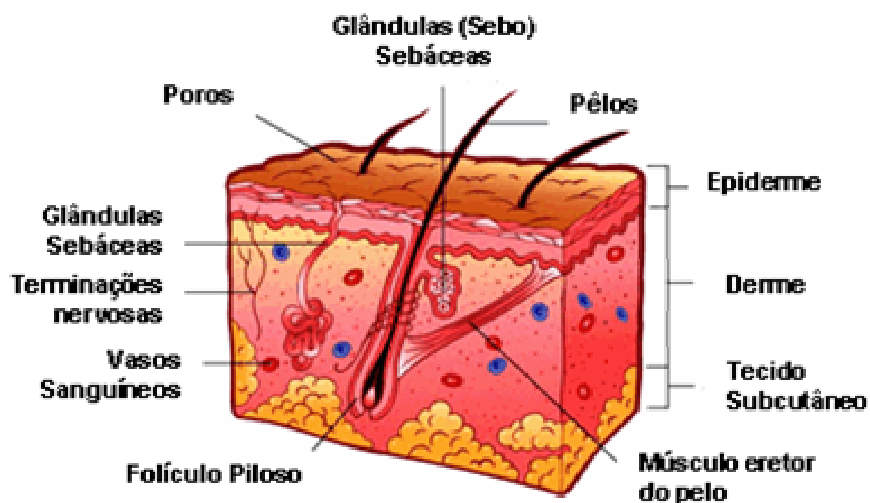


Figura 3. Diagrama simplificado da estrutura da pele (disponível em http://kidshealth.org/kid/body/images_45364/skin325.gif – acesso em 06/03/2007).

O EC pode ser descrito como uma “parede de tijolos” (ELIAS, 1991), onde as células queratinizadas são embebidas em uma matriz lipídica, organizada em bicamadas e compostas por ceramidas (45-50 %), colesterol (25 %), ácidos graxos (10-15 %) e uma pequena fração de outros lipídios (5 %) (MADISON, 2003). A composição e a disposição das células e lipídios no EC criam um caminho tortuoso e fazem dele uma importante barreira que controla a saída de compostos e água do organismo, assim como a entrada de compostos acidental ou deliberadamente na pele, representando assim, o principal obstáculo à penetração cutânea de fármacos (MADISON, 2003), ou seja, o EC, com uma espessura de até 15 μm , é a principal barreira física à entrada da maioria das substâncias na pele e a perda de água (ELIAS, 1991).

A derme, segunda camada da pele, possui espessura entre 2 e 4 mm, sendo constituída de uma matriz de proteínas fibrosas imersas num tecido coloidal amorfo (LIRA, 2007). Apresenta-se como uma camada de sustentação que contém os anexos cutâneos, os capilares sanguíneos, canais linfáticos, os nervos e os terminais nervosos, além de conter os segmentos inferiores das glândulas sebáceas e folículos pilosos (CHORILLI, 2007). A derme contém também fibroblastos, macrófagos, mastócitos e leucócitos, sendo dividida em duas partes: derme papilar ou tecido conjuntivo frouxo e derme reticular ou tecido conjuntivo denso (MOSER et al., 2001).

A camada subcutânea ou hipoderme é a mais profunda, que varia em tamanho e em conteúdo sendo, em geral, composta principalmente de tecido adiposo, sendo responsável pelo isolamento térmico e proteção mecânica (CHORILLI, 2007; WILLIAMS; BARRY, 1992).

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), no qual o pêlo insere-se, por uma bainha que o circunda, por onde escoia o sebo secretado pela glândula sebácea (LIRA, 2007).

2.2. A função barreira da pele

A pele pode ser vista como um desafio, devido a sua função barreira, e também como uma oportunidade para administração de fármacos, devido à sua longa extensão e possibilidade de modular a função barreira (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004; BARRY, 2004; KARANDE; JAIN; MITRAGOTRI, 2004). Essa função é atribuída, principalmente, ao EC que apresenta

permeabilidade à água 1000 vezes menor que a maioria das outras membranas biológicas (LIRA, 2007).

Pode-se tratar a pele em termos de um laminado na qual cada camada (EC, epiderme e derme) contribui com uma resistência difusional, a qual é diretamente proporcional a sua espessura e, de maneira indireta, proporcional ao produto da difusividade da camada e ao coeficiente de partição do fármaco (AULTON, 2005).

Embora o EC represente a principal barreira da pele, sabe-se que na sua ausência outra barreira a permeação de fármacos permanece em outra camada da pele, a epiderme viável, cuja função barreira está relacionada aos canais lipídicos intercelulares e aos vários fenômenos de partição (FOLDVARI, 2000; ASBILL; MICHNIAK, 2000).

Assim sendo, técnicas físicas, compostos químicos e sistemas de liberação tem sido utilizado na tentativa de modular a função barreira do EC e facilitar o transporte de fármacos e macromoléculas na pele (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004).

2.3. Penetração cutânea

A pele pode ser mais ou menos permeável às substâncias químicas, permitindo a passagem de fármacos em certas condições, podendo ser considerada como uma interface terapêutica (LIRA, 2007). Apenas compostos dotados de certa lipofilia, não ionizados e de baixo peso molecular podem penetrar passivamente a pele, a ponto de sofrerem absorção cutânea (BEMVINDO, 2006).

A permeação de um fármaco pela pele ocorre, geralmente, por difusão passiva através de três vias: transcelular (entre os lipídios do EC), intercelular (pelos lipídios do EC) e a transpedicular (através de glândulas e folículos), Figura 4

(HADGRAFT, 2001). No entanto, tem havido grande discussão nas últimas décadas sobre qual via apresentaria ação predominante na penetração de substâncias na pele, mas evidências experimentais sugerem que a via predominante é a intercelular, ou seja, difundindo-se pela bicamada lipídica entre as células (HADGRAFT, 2004). Para moléculas mais polares (hidrofílicas), a via intercelular é predominante, pois os componentes celulares são de natureza aquosa (BUCK, 2004) e neste caso a barreira limitante são as bicamadas lipídicas que também devem ser atravessadas (LIRA, 2007).

A via transcelular, entre os lipídios do EC, constitui a principal via para moléculas pequenas e não carregadas, pois evidências sugerem que a distância difusional percorrida por essas moléculas nesta via (500 μm) é muito maior que a espessura do EC (10-20 μm). Além disso, esse espaço intercelular contém lipídios estruturados, por isso o fármaco permeante tem que atravessar uma variedade de domínios hidrofílicos e lipofílicos antes de alcançar a epiderme viável (HADGRAFT, 2004). Já a via apêndice (Figura 5) possui área superficial bastante pequena (0,1 % da superfície da pele), contribuindo de forma insignificante para a penetração das substâncias na pele (BARRY, 2001).

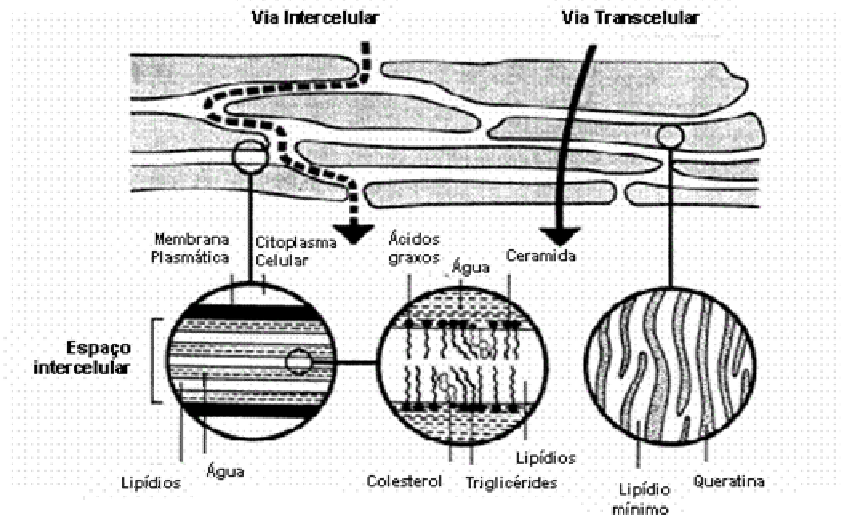


Figura 4. Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (vias intercelular e transcelular) através do estrato córneo (adaptado de BARRY, 2001).

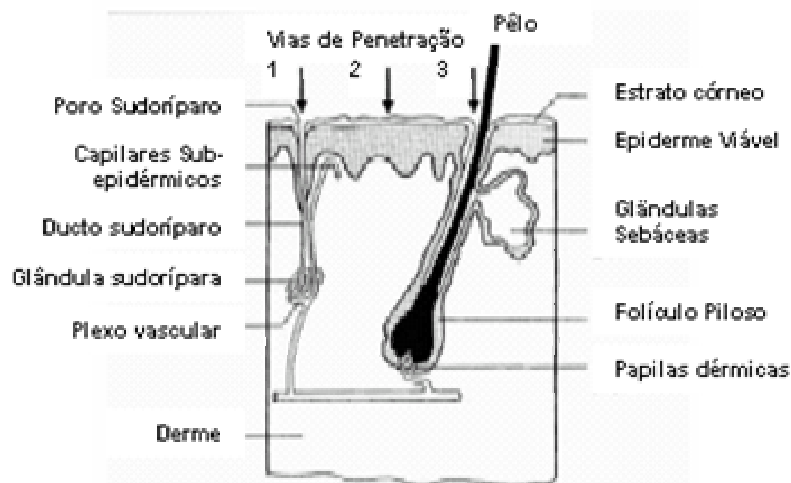


Figura 5. Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias (via transepidérmica e via apêndice) através da pele humana, 1 = glândula sebácea, 2 = via transepidérmica e 3 = folículo piloso (adaptado de BARRY, 2001).

Embora seja difícil estabelecer princípios gerais que afetam a penetração cutânea, a literatura (PAPARELLA; VALLEY, 2005; SIMONSEN; PETERSEN;

GROTH, 2002) relata que as combinações possíveis de fármacos, veículos e condições da pele acabam sendo consensos, portanto podemos citar os principais: concentração de fármaco, área de aplicação, afinidade do fármaco com a pele, hidratação cutânea, tempo de permanência do medicamento sobre a pele e intensidade de massagem, local de aplicação.

Segundo MOSER et al. (2001) existe três estratégias que podem ser utilizada para aumentar a penetração de fármaco na pele, o aumento do coeficiente de difusão do composto, aumento da solubilidade do composto na membrana e o aumento da razão da concentração do composto no veículo versus a solubilidade do composto no veículo. Sendo que esta última estratégia é a alternativa mais simples, pois consiste na supersaturação do veículo com o fármaco, de modo a aumentar sua atividade termodinâmica (LOPES, 2005).

Embora a pele constitua uma barreira muito eficaz, como já foi relatado antes, ela pode ser atravessada por pequenas quantidades de substâncias capazes de penetrar nas camadas córneas e, em alguns casos, chegar à absorção sistêmica (LIRA, 2007). As doses diárias possíveis de absorção pela pele são bastante baixas, o que requer a administração de fármacos de grande potência para obtenção do efeito desejado, visto que um bom fármaco para administração cutânea deve possuir baixa massa molecular, solubilidade em água e em óleo e não deve ser irritante ou sensibilizante cutâneo (LIRA, 2007).

2.4. Diclofenaco de dietilamônio (DDA)

2.4.1 Propriedades físico-químicas e farmacológicas do DDA

O diclofenaco {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil-acetato}, Figura 1, associado a um cátion dietilamônio, é um anti-inflamatório não esteroideal (AINEs), potente inibidor da síntese das prostaglandinas, que quando administrado topicamente, penetra na pele em quantidade suficiente para atingir o local de ação de forma profunda, porém minimizando a toxicidade sistêmica (MAGNETTE; KIENZLER, 2004).

Embora os AINEs constituam uma das classes de fármacos mais prescrita no mundo, seu uso como antiinflamatório continua sendo limitado pela incidência de seus efeitos indesejados, principalmente sobre o trato gastrointestinal, que incluem irritação, sangramento, ulceração e, eventualmente, perfuração da parede gastrointestinal. Devido à toxicidade gastrointestinal do diclofenaco, atualmente, existe uma grande motivação por parte da comunidade científica em desenvolver novas formas farmacêuticas, em sistemas dispersos, com o objetivo de reduzir esses efeitos colaterais (MULLER; HAAS, 2004), entre estas encontram-se as NE.

A eficácia clínica da absorção percutânea dos AINEs tem sido largamente investigada nos últimos anos, porém cuidados devem ser tomados ao se comparar resultados *in vitro* com estudos em seres humanos. No entanto, existe uma boa relação entre os níveis plasmáticos com estudos *in vitro* de IC₅₀ (concentração inibitória média) e fluxo (CORDERO et al., 2001).

O DDA (Figura 2) é uma molécula anfifílica que tem a capacidade de interagir com a porção lipídica da pele de forma distinta e quando veiculado em sistemas coloidais pode ocasionar uma transição de fases (KRIWET; MULLERGOYMANN, 1995) com formação de micelas e cristal líquido liotrópico em água (KRIWET;

MULLERGOYMANN, 1993), e essa interação com os fosfolípidos da pele, contribui para aumentar a fluidez do DDA no EC, fazendo com que os lipídios passem de uma forma cristalina ordenada para uma forma líquida desordenada, aumentando, portanto, a permeabilidade cutânea (ESCRIBANO et al., 2003). Além disso, o DDA apresenta metabolismo hepático, tempo de meia-vida curto, não sofre metabolismo na pele, não induz tolerância (MARTINS, 2002) e têm bom coeficiente de partição (DJORDJEVIC, 2005).

2.5. Microemulsões (ME) ou nanoemulsões (NE)

O termo ME foi introduzido por Hoar e Shulman em 1943, os quais descrevem esses sistemas como transparentes ou translúcidos, obtidos por titulação a partir de uma emulsão comum, a qual apresenta aspecto leitoso e quando adicionado um álcool de cadeia média, este sistema se clarifica (GARTI; ASERIN, 1996). Mas foi em 1959, por Jack Shulman, que o termo foi primeiramente proposto, na ocasião foi formulado um sistema estável, homogêneo e translúcido após a adição de um álcool de cadeia curta numa mistura quaternária de água, benzeno, hexanol e oleato de potássio. As ME estudadas por Schulman foram reversíveis, podendo se inverter do tipo óleo em água (o/a), para o tipo água em óleo (a/o), através da troca do tensoativo ou a adição de maior quantidade de uma fase (ROSSETI, 2006).

Nos últimos anos, atenção tem sido dada a esses sistemas, por sua capacidade em aumentar a eficácia terapêutica de fármacos, permitindo a redução da dose administrada, minimizando os seus efeitos colaterais (FORMARIZ, 2004). Estes sistemas são capazes de compartimentalizar fármacos, com dimensões nanométricas, as quais possuem propriedades físico-químicas peculiares e

diferentes do meio dispersante (BHARGAVA et al., 1987; ABOOFAZELI et al., 2000), melhorando a solubilização de diversos fármacos e aumentando o potencial de absorção devido ao uso do tensoativo, causando uma mudança na permeabilidade das membranas biológicas (CRUZ; UCKUM, 2001).

Vários estudos sugerem que as NE possuem o potencial de aumentar a penetração cutânea de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, quando comparadas aos veículos convencionais (CHEN; CHANG, 2004; SINTOV; SHAPIRO, 2004; WU; RAMACHANDRAN, 2001; DELGADO-CHARO et al., 1997; DREHER; WALDE; WEHRLI, 1997; KRIWET; MULLERGOYMANN, 1995; TROTA; GASCO, 1994;). Essa penetração se deve, basicamente, a dois mecanismos distintos: 1) aos altos gradientes de concentração tensoativos promovidos pelo seu alto poder solubilizante de fármacos sem, contudo, aumentar a afinidade do veículo pelo fármaco; 2) e ao potencial promotor de penetração cutânea dos seus constituintes individuais (KREILGAARD, 2002). As NE são superiores às soluções micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, por isso, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos (FORMARIZ, 2004).

As NE apresentam grande potencial como sistemas de liberação e de direcionamento de fármacos, pelas propriedades de solubilizar drogas hidrofílicas em meio lipofílico ou lipofílicas em meio aquoso e anfifílicas na interface óleo/água (KE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004; DJORDJEVIC et al., 2004; ESCRIBANO et al., 2003; MENDONÇA; BICA; PIATNICKI, 2003; PAOLINO et al., 2002; TAHA et al., 2002; SILVA, 2001; CANDAU; PABON, 1999; CONSTATINIDES; SCALART, 1997; TROTA, 1994; LEUNG; SHA, 1989). Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre dispersões instáveis e sistemas tradicionais de liberação tópica e transdérmicas, pois é possível à incorporação de vários tipos de compostos na fase

que apresenta baixa constante dielétrica (fase oleosa), na região interfacial (constante dielétrica intermediária entre o óleo e a água) e ou na fase aquosa em que a constante dielétrica é elevada (KE et al., 2005; CHEN; CHANG, 2004; OLIVEIRA et al., 2004; SHA, 1998; LEUNG; SHA, 1989) além de se formarem de forma espontânea (SINTOV; BOTNER, 2006; PAOLINO et al., 2002; CANDAU; PABON, 1999) e serem sistemas reservatórios com propriedades particulares (FORMARIZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004) podendo existir sob várias formas estruturais: globular (a/o, o/a), bicontínuas, cúbicas ou lamelares (JURKOVIC; GASPERLIN, 2004; SHA, 1998;).

A estabilidade termodinâmica das NE é um fator de suma importância para os sistemas tópicos, pois estas características resultam numa formulação cujas propriedades não dependem do processo de fabricação, ou seja, velocidade de rotação e esfriamento forçado, e que não sofrerá separação de fases, desde que a pressão e a temperatura permaneçam razoavelmente constantes (OSBORNE; WARD, 1990).

A transparência observada neste sistema é devido ao fato de que o tamanho máximo das gotículas da fase dispersa raramente ultrapassa $\frac{1}{4}$ do comprimento de luz visível que é aproximadamente 150 nm (ROSSETI, 2006), o qual as gotículas não espalharão luz, resultando em um sistema opticamente transparente com diâmetros menores que $\approx 1400 \text{ \AA}$, geralmente $100 \text{ \AA}$ (OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA; SCARPA, 2001). O tamanho das gotículas nas NE está usualmente entre 10 e 150 nm, sendo que estes sistemas também podem ser denominados como sendo nanoemulsões (SINTOV & SHAPIRO, 2004), e quando esses sistemas são caracterizados por técnicas de Raios X (*Small Angle X-Ray Scattering*) mostra-

se que elas não são dispersões moleculares e sim dispersões grosseiras (LINDMAN; FRIEBERG, 1999).

Nos estudos realizados por SILVA (2001) e FORMARIZ (2004) foi proposto que o fenômeno de dispersão da luz pelas NE pode ser avaliado de maneira eficiente através da técnica *Ligth Scattering*, já a diafaneidade de um meio pode ser utilizada para identificar e estimar de forma grosseira o tamanho das partículas de uma NE, como mostrado na Tabela 1. A técnica “*Ligth Scattering*” fornece informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas da NE e permite o cálculo do tamanho da gotícula através de relações empíricas (ABOOFAZELI et al., 2000).

Tabela 1. Tamanho de agregados, gotículas dispersas e diafaneidade do meio

Agregados	Diâmetro das partículas (Å)	Diafaneidade
Moléculas de água	2,7	Transparentes
Micelas	35 – 75	Transparentes
Soluções micelares	50 – 150	Tranparentes/Translúcidas
Nanoemulsões	100 – 2000	Translúcidas
Emulsões	2000 – 100000	Opaca/Branca
Suspensões	500000	Discretos agregados

Fonte: (SILVA, 2001; FORMARIZ, 2004)

As NE usualmente comportam-se como fluidos newtonianos, sua viscosidade é comparada à da água, até mesmo em elevadas concentrações de gotículas, muito provavelmente devido à coalescência reversível das mesmas (DAMASCENO, 2005; LANGEVIN, 1988;).

As NE apresentam uma grande diversidade estrutural em função da sua composição. Um modelo estrutural proposto por SCHULMAN & ROBERTS (1982)

mostra-se adequado para estes sistemas, onde apresenta uma camada monomolecular de anfifilas, tensoativo e co-tensoativo, envolvendo-se uma membrana, podendo ser do tipo a/o ou o/a conforme Figura 6.

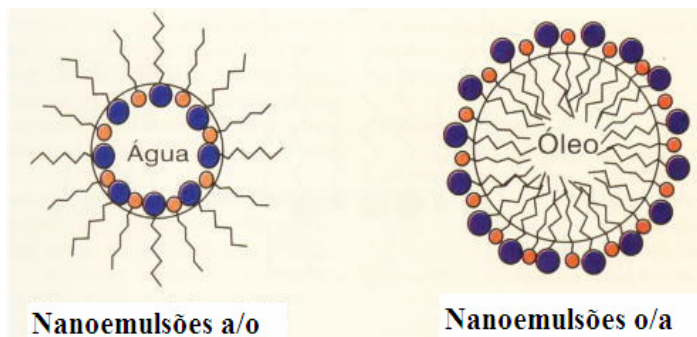


Figura 6. Estrutura de uma gotícula dispersa em um sistema a/o e o/a, respectivamente.

2.5.1. Formação e componentes das NE

As NE são passíveis de serem formadas numa ampla gama de composição entre óleo/água/tensoativo, dependendo das propriedades dos componentes envolvidos (KREILGAARD, 2002). A região de sua existência é tipicamente apresentada em um diagrama de fase pseudo-ternário, como razão entre óleo, água e uma mistura fixa de tensoativo/co-tensoativo (OLIVEIRA et al., 2004).

O principal determinante para a formação das NE são as propriedades físico-químicas das suas fases (aquosas, oleosas e tensoativo), onde as interações físico-químicas entre estes componentes são muito complexas para prevê a sua formação. No entanto, algumas condições essenciais são descritas por ROSSETI (2006): produção de uma tensão superficial bastante baixa na interface a/o; formação de um filme de tensoativos interfacial altamente fluido; penetração e associação das moléculas da fase oleosa com o filme interfacial de tensoativo.

A redução da tensão superficial e fluidificação do filme interfacial de tensoativo são usualmente feitas pela introdução de um co-tensoativo de cadeia pequena (KREILGAARD, 2002), sendo que o mesmo pode ser um álcool de cadeia média, mas estes são na maioria das vezes irritantes para a pele e olhos, tendo seu uso limitado (OLIVEIRA et al., 2004). Com isso, busca-se o desenvolvimento de NE livres de álcool que sejam mais seguras do ponto de vista toxicológico. A função do co-tensoativo, é aumentar a fluidez interfacial através da penetração no filme de tensoativo e conseqüentemente criar um filme desordenado devido a um espaço entre as moléculas do mesmo (OLIVEIRA et al., 2004; CONSTANTINIDES; LANCASTER, 1995). Segundo DAMASCENO (2005) o uso de co-tensoativos em NE não é obrigatório, visto a possibilidade de formação de sistemas de NE auto-emulsificadas livres de álcool.

Além dos álcoois, existe uma grande variedade de moléculas que podem funcionar como co-tensoativos, incluindo os tensoativos não-iônicos, derivados da lanolina, colesterol e glicóis (LIN, 1990). Os tensoativos utilizados para estabilizar as NE podem ser: não-iônicos, zwitterionicos, catiônicos ou aniônicos. A combinação entre os iônicos e não-iônicos, pode ser eficaz no aumento da região de obtenção de NE no diagrama de fases (LAWRENCE; REES, 2000) e que o óleo, destes sistemas, não deve ter uma molécula muito grande, pois esta característica irá dificultar a penetração e a associação das moléculas da fase oleosa com o filme interfacial de tensoativo (KREILGAARD, 2002).

Os componentes de uma NE devem, além de não-tóxicos, preencherem as exigências de um veículo adequado à absorção cutânea, isto é, possuir alta solubilidade e permitir atividade termodinâmica do fármaco durante o

desenvolvimento da formulação, bem como sua posterior liberação (KREILGAARD, 2002).

2.5.2. Diagramas de fase

A construção de diagramas de fase é uma ferramenta ideal para caracterizar o domínio das regiões de emulsões e NE, cuja interpretação descreve as estruturas presentes contidas neles, podendo-se escolher a região cuja viscosidade é mais apropriada para o fármaco ser incorporado (FORMARIZ, 2004). Dahl em 1946, em seu estudo sobre cristalização foi um dos primeiros pesquisadores a estudar e interpretar os diagramas de fase (MACEDO, 2005).

Os diagramas são construídos em três dimensões a partir de dados obtidos por titulação ou pela preparação de um amplo número de amostras de diferentes composições. A vantagem do primeiro método é que este pode ser usado para estudar um amplo número de amostras de diferentes composições de uma maneira mais rápida, indicando as proporções nas quais os componentes devem ser misturados (LAWRENCE; REES, 2000) e as várias formas encontradas no sistema podem ser identificadas qualitativamente pela comparação com estudos prévios na literatura (BAKER; FLORENCE, 1984).

Segundo CERA (2001) as propriedades dos triângulos equiláteros devem ser extremamente exploradas, ou seja, a soma dos lados perpendiculares de um determinado ponto no triângulo é igual a sua altura. A Figura 7 mostra um triângulo equilátero onde cada lado (dividido em 100 partes correspondente a composição centesimal de cada ponto) é representado por um dos componentes da fórmula. O ponto A representa o tensoativo, o ponto B a água e o C o óleo (MACEDO, 2005). Na escolha de um ponto do diagrama, para obter uma formulação, é importante

evitar regiões limites, caso contrário, haverá o perigo de indesejáveis de transições de fase (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

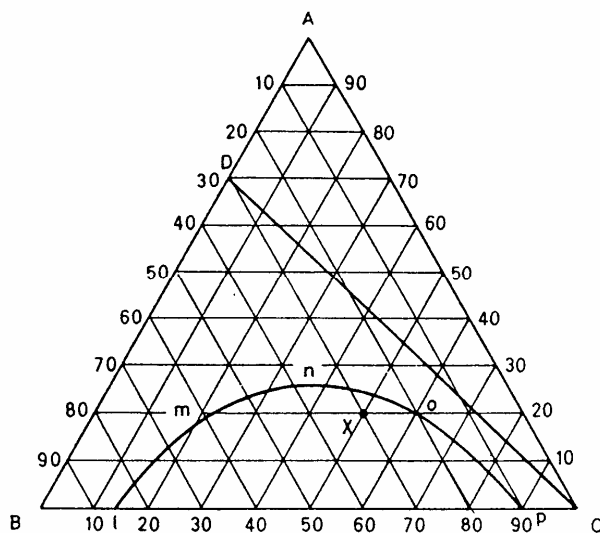


Figura 7. Representação esquemática de um diagrama ternário de fases.

2.5.3. Termodinâmica e teoria de formação das NE

Diversas teorias foram propostas na tentativa de explicar, em bases termodinâmicas, a estabilidade das NE e a sua formação espontânea (SILVA, 2001). Uma dessas teorias citada e relatada por (OLIVEIRA et al., 2004) descreve que quando dois líquidos imiscíveis são misturados, mantendo-se agitação constante, as duas fases tendem, inicialmente, a formar gotículas dispersas de um dos líquidos no interior do outro, sendo que quando a agitação cessa, as gotículas tendem a coalescer e os líquidos separam-se novamente. Assim, o processo de emulsificação implica num grande aumento de área interfacial ($S_1 \rightarrow S_2$) a qual leva a aumento brusco de energia livre de superfície ($G_1 \rightarrow G_2$), e este fenômeno pode ser descrito pela equação 1, onde γ_i representa a tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa.

$$\Delta G = G_2 - G_1 = \gamma_i \times \Delta S \quad (1)$$

Se considerarmos que o aumento da área interfacial ($S_1 \rightarrow S_2$) é imprescindível do ponto de vista tecnológico, uma das alternativas para a estabilização do sistema seria fornecer energia mecânica, continuamente, de modo a manter a área interfacial aumentada, e isso, embora necessário, por si só não é suficiente, pois vence a barreira da tensão superficial apenas temporariamente, enquanto durar a agitação (SHA, 1998). No caso das NE a diminuição da tensão interfacial é devido à presença de grande quantidade de tensoativos incorporados na interface a/o, geralmente, associado a um co-tensoativo, cuja função é diminuir a tensão interfacial para valores abaixo dos limites proporcionados pelos agentes emulsificantes comuns (LAWRENCE; REES, 2000; OLIVEIRA; SCARPA, 2001). Assim, o sistema forma-se espontaneamente quando a energia remanescente da interface é muito próxima de zero, conforme descrito pela equação 2 (FORMARIZ, 2004).

$$\Delta E = E_2 - E_1 = 0 \quad (2)$$

Segundo HO & HSIAO (1996) uma tensão interfacial (γ_i) muito baixa ($\gamma_i < 10^{-3}$ dina) é um pré-requisito para formação das NE, e a absorção do tensoativo na área interfacial causa uma pressão bidimensional (π) que aumenta a pressão interfacial, ou seja, quando $(\gamma_{a/o})_a$ é menor do que π , γ_i é negativo, conseqüentemente a NE se forma-se espontaneamente (equação 3)

$$\gamma_i = (\gamma_{a/o})_a - \pi \quad (3)$$

Onde $(\gamma_{a/o})_a$ é a tensão interfacial o/a, após o potencial químico do tensoativo em cada fase ter sido equalizado por partição. O resultado disso indica que os tensoativos de caráter muito hidrofílico ou lipofílico são inapropriados para a formulação de NE, mesmo com a ajuda de co-tensoativos.

A posição geométrica dos tensoativos na interface pode ser outro fator de influência a ser considerado em termos de seus efeitos na curvatura e na fluidez da interface. Como consequência, a adição de um co-tensoativo é capaz de reduzir a energia livre na interface e a tensão através da sua incorporação na camada interfacial, formando filmes flexíveis, atuando, também, modificando o valor do EHL do sistema de tensoativos para um valor ótimo e adequado para a formação das NE (DAMASCENO, 2005). O EHL requerido para formar NE situa-se entre 12 e 18 (KAWAKAMI et al., 2002).

2.5.4. Caracterização das NE

A caracterização de um sistema NE pode ser feita por diversos métodos, mas para a elucidação da sua nanoestrutura devem-se levar em consideração os resultados de mais de um método. A literatura postula que técnicas experimentais diferentes podem ser usadas para obter informações sobre a dinâmica e estrutura das NE (KAHLWEIT; STREY, 1987). Entre as técnicas mais difundidas tem-se a microscopia de luz polarizada para verificar a isotropia do sistema, o espalhamento de luz para medir o diâmetro da gotícula ou fase dispersa, métodos espectroscópicos, como ressonância magnética nuclear, para determinar a estrutura interna (ROSSETI, 2006), e outros métodos mais tradicionais, como densidade, viscosidade (η), índice de refração (IR) e condutividade elétrica (σ) são importantes para determinar o tipo de NE e caracterizá-la fisicamente (CONSTANTINIDES; LANCASTER, 1995).

O método mais utilizado para a caracterização de NE é o espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*). Trata-se de uma técnica não invasiva para a medição do tamanho das gotículas, com tamanho menor que 1 μm .

Quando essas gotículas são iluminadas por um feixe de luz laser, ocorre o espalhamento da luz, sendo que essa intensidade de luz espalhada, detectada num ângulo determinado, varia numa taxa dependente da velocidade de difusão das gotículas, as quais, por sua vez, são governadas pelo seu tamanho (ROSSETI, 2006) fornecendo informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas (SILVA, 2001), permitindo o cálculo do seu tamanho através de relações empíricas adequadas. Caso o sistema disperso esteja em elevadas concentrações, a interpolação torna-se dificultada em razão das interações intergotículas, sendo necessário, nestes casos, fazer uma diluição do sistema nanoemulsionado (FORMARIZ et al., 2005).

Em equipamentos convencionais de DLS a luz é espalhada pelas gotículas em todos os ângulos, porém são detectadas apenas em 90° , convencionalmente, as variações na medição da intensidade da luz espalhada são convertidas em pulsos elétricos, os quais são armazenados em um correlacionador digital, onde as informações sobre o tamanho das gotículas são geradas a partir destes dados (MENDONÇA; BICA; PIATNICKI, 2003).

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolvimento e caracterização de forma farmacêutica tópica nanoemulsionada para veiculação do DDA e estudo de cinética de permeação percutânea em modelo de pele suína e humana.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e utilizar diagramas pseudo-ternário para obtenção e identificação de regiões de NE;
- Identificar, na região onde for possível a obtenção de sistemas opticamente transparentes e estáveis, o domínio da existência de NE líquidas ou NE géis;
- Explorar os sistemas NE opticamente transparentes biocompatíveis com o DDA;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para o doseamento do DDA nas NE por espectrofotometria no ultravioleta – visível (UV-VIS) para estudo de caracterização e por CLAE-UV para estudo de retenção e permeação cutânea em pele suína e humana;
- Criar um protocolo de caracterização dos sistemas obtidos:
Eficiência de encapsulação do DDA, condutividade elétrica, reologia, pH, índice de refração, densidade relativa, potencial zeta, microscopia de luz polarizada, tamanho e distribuição de tamanho das gotículas pela técnica de espalhamento de luz;
- Estudar a liberação *in vitro* do DDA usando membranas sintéticas de acetato de celulose em modelo de células de difusão de Franz;
- Estudar *in vitro* a permeação e retenção cutânea em pele animal (suína e humana);

- Avaliar *in vivo* a atividade antiedematogênica por edema de pata induzido por carragenina em modelo animal.

4. Materiais e métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Acetonitrila, grau cromatográfico (J. T Baker); diclofenaco de dietilamônio (lote CDD 0045, Nortec Química); emulgel de diclofenaco dietilamônio (Referência e genérico); fosfato de sódio monobásico anidro (PA, Merck); hidróxido de sódio (PA, Merck); miristato de isopropila (lote 0606-195, Henrifarma); PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo (lote 104250, Labrasol[®]-Gattefossé); poligliceril 6-dioleato (lote 101555, Plurol Oleico[®]-Gattefossé); metanol (Synth e F. Maia); metanol (grau cromatográfico, J. T Baker e Merck); membrana sintética de acetato de celulose.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Construção dos diagramas de fase

Os diagramas de fases, desta pesquisa, foram obtidos por inspeção visual das misturas dos ingredientes PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo (T) com poligliceril 6-dioleato (CO) nas proporções 4:1; 3:1; 2:1 e 1:1 e, a esta mistura de T/CO, foi adicionado miristato de isopropila (fase oleosa) nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. As titulações foram feitas com água purificada tipo Milli-Q[®], utilizando uma pipeta automática ajustada 1000 µL, adicionando gota a gota, em temperatura ambiente. Durante a titulação a mistura foi homogeneizada por agitador magnético, por 3 minutos, e as mudanças do aspecto visual contra um fundo preto foram observadas. Considerando-se as proporções dos componentes (T/CO; fase oleosa e fase aquosa) após as titulações aquosas plotou-se os pontos em que se deu a transição de sistema opticamente transparente ou translúcido líquido ou gel (NE) ou de NE para sistema opaco líquido ou semi-sólido (emulsão); dispersão opaca ou ainda separação de fases em cada diagrama (FORMARIZ et al., 2007;

FORMARIZ et al., 2006; FORMARIZ et al., 2005; KE et al., 2005; CHEN; CHANG, 2004; DJORDJEVIC et al., 2004; SINTOV; SHAPIRO, 2004; CONSTANTINIDES, 1997). Os diagramas foram feitos em duplicatas.

4.2.2 Seleção das formulações

Após a construção dos diagramas pseudo-ternários, as formulações NE (líquido e gel) de escolha para a incorporação do DDA foram obtidas a partir de uma determinada região dos diagramas pseudo-ternário. O DDA foi incorporado nas NE, por simples solubilização (Figura 8), na concentração de 1 % p/v para estudo de caracterização e 1,16 % p/v para estudo de cinética de permeação cutânea. As NE foram preparadas 48 horas antes dos testes, para garantir a estabilização termodinâmica das micelas na temperatura ambiente (MORAIS; REZENDE, 2004), as quais foram preparadas e caracterizadas no Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

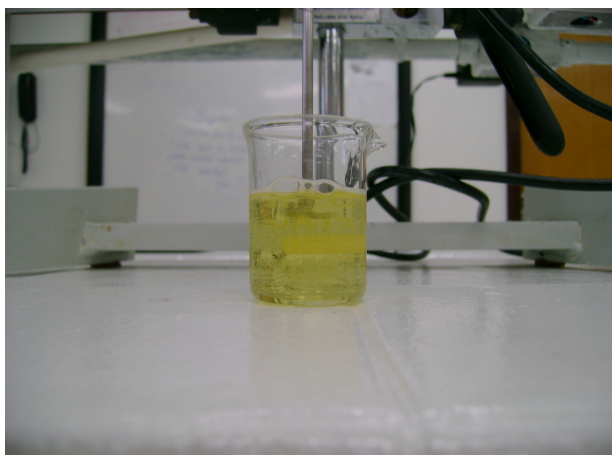


Figura 8. Fotografia da solubilização do DDA nas NE desenvolvidas

4.2.3 Padronização e validação das metodologias analíticas para doseamento do DDA

A padronização e a validação das metodologias analíticas foram conduzidas segundo Resolução da ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), na qual determina que os parâmetros seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão e robustez devem ser analisados.

4.2.3.1 Validação por espectrofotometria

Seletividade ou especificidade

A seletividade do método espectrofotométrico foi determinada, após varredura no espectro de 250-350 nm, comparando a matriz isenta da substância de interesse, sem o DDA e a matriz NE-DDA, fazendo-se análises espectrofotométricas em 282 nm, sendo que nenhum interferente da matriz sem o DDA deve ser absorvido neste comprimento de onda (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

Curva analítica e linearidade

Para este ensaio foi preparado uma curva de calibração, em triplicata, dissolvendo-se, exatamente, 10 mg de DDA em 100 mL de metanol. Diluições foram efetuadas de modo a obter concentrações de 5; 10; 15; 20; 25; 30 e 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DDA, e as análises espectrofotométricas foram determinadas em 282 nm.

Precisão

A precisão do método espectrofotométrico (precisão intra-dia e inter-dia) foi determinado, em sextuplicata, e de cada vez, fazendo-se uma diluição de 1:500 da NE-DDA de forma a obter uma concentração de leitura de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Exatidão

A exatidão descreve a proximidade da média dos resultados obtidos em um teste, numa determinada concentração em relação ao valor real, ou seja, é a relação entre o valor encontrado pelo método e o valor aceito como verdadeiro ou de referência, sendo, normalmente, determinada por intermédio de, no mínimo, análises em triplicata de três diferentes concentrações, sendo uma em baixa, uma em média e outra em alta concentração, respectivamente (BRASIL, 2003; CASS; DEGANI, 2001).

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 detectado, porém não necessariamente quantificado, 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 de acordo com as equações (5) e (6) respectivamente, (NUNES et al., 2005; BRASIL, 2003; USP, 1995).

$$\mathbf{LD = DP_a \times 3/IC} \quad \mathbf{(5)}$$

$$\mathbf{LQ = DP_a \times 10/IC} \quad \mathbf{(6)}$$

Onde, DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. IC é a inclinação da curva de calibração.

Robustez

A robustez do método espectrofotométrico foi observada mediante variações da marca do metanol (fornecedores diferentes) e a técnica de preparação das amostras (agitação manual e banho de ultra-som por 5 minutos).

4.2.3.2 Validação por CLAE-UV

Para o desenvolvimento do método por CLAE-UV foi utilizado um aparato de Cromatografia Líquida de alta Eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por - 2 bombas modelo LC-10ADvp, Detector UV/Visível modelo SPD-10AVvp configurado em 280 nm; Auto injetor de amostra modelo SIL-10ADvp, Interface de controle modelo SCL-10Avp, forno de coluna (CTO 10Avp) Figura 9. A separação cromatográfica foi conseguida usando uma coluna analítica tipo C18 150 x 4,6 mm, 5 µm Shimpack[®] acoplada a uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato hidróxido de sódio 20 mM (70:30, v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido fosfórico, na qual foi filtrado e degaseificado e bombeado em um fluxo de 1,2 mL min⁻¹. O forno da coluna foi ajustado para 40 °C e o volume de injeção foi 30 µL, com tempo de corrida total de 3,5 minutos.

Seletividade ou especificidade

A seletividade do método por CLAE-UV foi determinado a partir de soluções do homogeneizado da pele, suína e humana, com e sem o EC conforme descrito na seção 5.7.1.



Figura 9. Fotografia do aparato de Cromatografia Líquida de alta Eficiência utilizado no desenvolvimento e validação do método.

Curva analítica e linearidade

A curva analítica do método por CLAE-UV foi preparada a partir de uma solução padrão de DDA em metanol na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (dissolvendo 10 mg de DDA em 10 mL de metanol). A partir desta, diluições foram efetuadas, em triplicatas, de modo a obter uma concentração final de 0,05; 0,1; 0,4; 0,8; 1; 5; 10; 15 e $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de DDA, e analisadas por CLAE-UV em 280 nm.

Precisão

Para o método por CLAE-UV, a precisão foi determinada da mesma forma que o método por espectrofotométrico, sendo que o ponto médio da curva de calibração foi $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Exatidão

A exatidão foi determinada da mesma forma que o método por espectrofotométrico.

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

Idem ao método espectrofotométrico.

Robustez

A robustez do método por CLAE-UV foi observada mediante variações da marca do metanol (fornecedores diferentes) e a temperatura do forno da coluna 30 e 40°C (BRASIL, 2003).

4.2.4 Caracterização das NE

4.2.4.1 Doseamento do DDA nas NE

Para o doseamento do DDA nas NE foi preparada uma solução de forma a obter uma solução de $\approx 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DDA (50 μL de NE-DDA diluídos em 24,95 mL de metanol). As concentrações de DDA nas NE foram medidas a partir dos valores de absorvância, tendo como valor exato o valor correspondente ao padrão diário contendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (10 mg de DDA em 100 mL de metanol). A partir desta solução, foi realizada uma diluição com metanol de forma a obter uma solução de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. As leituras foram feitas em 282 nm segundo protocolo adotado no desenvolvimento e validação de metodologia analítica (seção 4.2.3.1).

4.2.4.2 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação do DDA nas NE selecionadas foi determinada utilizando-se 1 mL de cada formulação NE-DDA, as quais foram submetidas à

centrifugação (11000 $g \approx 14000$ rpm) por 30 minutos. Ao término do ciclo de centrifugação, uma alíquota de 50 μL do sobrenadante de cada sistema foi cuidadosamente extraída e diluída em 24,95 mL de metanol o que corresponde a uma concentração de $\approx 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DDA. A eficiência de encapsulação foi calculada conforme equação 7 sugerida por DAMASCENO (2005).

$$EE = \text{Abs}_{\text{sob}} / \text{Abs}_{\text{NE-DDA}} \times 100 \quad (7)$$

Onde: **EE** = eficiência de encapsulação; **Abs_{sob}** = Absorvância do DDA no sobrenadante no $\lambda = 282$ nm; **Abs_{NE-DDA}** = Absorvância do DDA na NE-DDA no $\lambda = 282$ nm.

4.2.4.3 Centrifugação

As NE-DDA e NE sem DDA foram centrifugadas em centrífuga 5410 – Eppendorf, durante 30 min a 11000 $g \approx 14000$ rpm e no final foi observado a ocorrência ou não de separação de fases (MACEDO, 2005).

4.2.4.4 Condutividade elétrica (σ)

A σ bem como o seu monitoramento, foi determinada em condutivímetro modelo Cambo HI 98129 (Hanna). O equipamento foi calibrado com uma solução de calibração de condutância específica de $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$, à temperatura de 25°C (DJORDJEVIC, 2005).

4.2.4.5 Determinação da reologia

A reologia dos sistemas foi realizada em triplicatas a partir das NE-DDA selecionadas. O viscosímetro utilizado foi o Brookfield da marca Rheology

International, o qual permite medir eletronicamente a força de torção já convertida em viscosidade.

Para as determinações das viscosidades foram utilizados 12 mL da NE-DDA e o comportamento reológico das amostras foram analisado aumentando gradativamente a velocidade de rotação do “spindle” (0 a 100 rpm), em sala com temperatura de 25 ± 2 °C obtendo-se os vários valores de viscosidades. Foi elaborado o gráfico da medida da área de histerese formada entre a curva ascendente e descendente de um reograma, relacionando-se as viscosidades obtidas em função da velocidade de cisalhamento.

4.2.4.6 Determinação do pH

O pH das formulações foi avaliado utilizando um potenciômetro digital com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, modelo Cambo HI 98129 (Hanna), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. O eletrodo de vidro foi introduzido diretamente no interior da NE (≈ 15 mL) acondicionado em frasco de cintilação.

4.2.4.7 Índice de Refração (IR)

O IR foi determinado utilizando-se Refratômetro de Abbé, Carl Zeiss-Jena, aferido com água deionizada Milli-Q® (índice de refração 1,3325), à temperatura de $25 \pm 0,5$ °C, e em triplicata (FORMARIZ et al., 2007).

4.2.4.8 Determinação da densidade relativa (DR)

A DR das amostras foi determinada pelo método do picnômetro, seguindo-se a metodologia descrita na Farmacópeia Brasileira 4^a ed., utilizando-se como

referência água deionizada Milli-Q®. Os picnômetros utilizados foram de 5 mL de capacidade e para retirar as bolhas de ar formada nos sistemas foi utilizado o ultra-som (UltraSonic – USC 1400). A densidade foi obtida em ambiente com temperatura de $20 \pm 0,5$ °C e em triplicata.

4.2.4.9 Determinação do potencial zeta (ζ mV)

As medidas do ζ mV foram determinadas com auxílio de um zetâmetro [Particle Sizing System by *Light Scattering* – Brookhaven Instruments Corporation, model EMI 9863 (Holtsville, NY, USA)], submetendo as gotículas das NE a uma voltagem fixa e utilizando os valores fornecidos pelo aparelho para calcular o ζ mV. Para cada amostra foram realizadas 15 medidas de mobilidade eletroforética para cada amostra (VERÍSSIMO, 2007).

4.2.4.10 Aspecto macroscópico das NE

As NE foram examinadas a olho nu, sendo observado o aspecto, cor e odor assim como uma possível cremagem, gotículas de óleo ou uma eventual separação de fases.

4.2.4.11 Determinação do tamanho das gotículas das NE por espalhamento de luz dinâmico

A análise do tamanho das gotículas sub-microscópicas foi determinada através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, também denominada espectroscopia de correlação de fótons (PCS), cuja técnica fornece o raio hidrodinâmico das gotículas coloidais, o qual é calculado pela equação Stokes-Einstein onde é determinado o coeficiente de difusão das gotículas através da

variação do espalhamento de luz causado pelo movimento browniano das gotículas (FORMARIZ et al., 2006). O cálculo foi obtido pela equação 8 de Stokes-Einstein:

$$R_h = KT/6\pi\eta D \quad (8)$$

Onde: R_h = raio hidrodinâmico; K = constante de Boltzmann; T = temperatura absoluta; η = viscosidade do meio; D = coeficiente de difusão das gotículas.

As NE sem DDA e as NE-DDA foram cuidadosamente filtradas em membranas de 0,22 μm , Corning® e analisadas em um analisador de gotículas. As amostras foram colocadas na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A temperatura do sistema foi mantida a 20 °C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração foi de acordo com o índice calculado de cada amostra analisada. Foram realizadas 10 determinações do diâmetro e índice de polidispersidade das gotículas, com a duração total de 5 minutos.

4.2.4.12 Microscopia de luz polarizada

A isotropia das NE foram realizadas por microscopia de luz polarizada (ZEISS) e Software analisador de imagem (ZEISS), após percorrido o tempo de 5 dias para o equilíbrio dos sistemas (ROSSETI, 2006).

4.2.5 Estudo de liberação *in vitro* do DDA em membranas sintéticas

O estudo de liberação *in vitro* do DDA em membranas sintéticas foi realizado como método de triagem, para testar a metodologia por CLAE-UV, cujo objetivo seria utilizá-la na permeação e retenção cutânea em membranas de modelo animal (suína e humana). O referido ensaio foi conduzido utilizando-se células de difusão tipo Franz com área difusional de 1,15 cm^2 , volume de ± 6 mL e usando membranas

artificiais hidrofílicas de acetato de celulose 0,45 μm (Figura 10). O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato pH 7,4 num sistema composto de seis células individuais conectados a um banho termostatzado à $37 \pm 0,5$ °C sob agitação constante de 100 rpm em agitador magnético por um período de 12 horas. As membranas foram colocadas na parte superior da célula receptora. No compartimento doador, foram aplicados 300 μL da NE diretamente sobre a membrana e, posteriormente, o sistema foi fechado. As amostras da solução receptora foram coletadas nos seguintes tempos: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10 e 12 horas. O volume total da fase receptora foi substituído a cada amostragem com tampão fosfato pH 7,4 à 37 °C para manutenção das condições sink do sistema (LIRA, 2007). A liberação da NE foi comparada à liberação de 300 mg do medicamento comercial referência e genérico (emulgel de diclofenaco de dietilamônio).

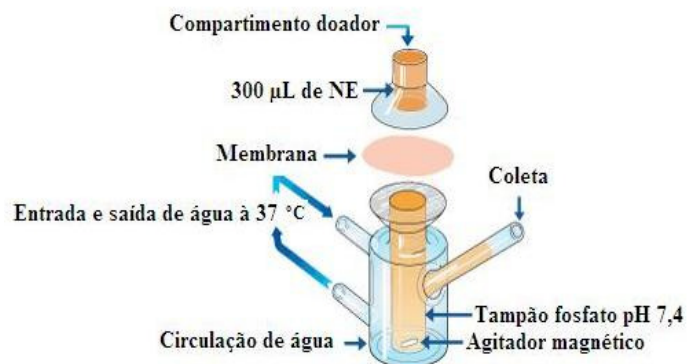


Figura 10. Figura ilustrativa de uma célula de difusão tipo Franz

4.2.6 Estudo *in vitro* de permeação e retenção cutânea

4.2.6.1 Obtenções das peles suína e humana

Pele da orelha de porco

A pele da orelha de porco foi utilizada como modelo nos estudos preliminares de permeação/retenção *in vitro*. Para tal, a pele da parte externa das orelhas provenientes de animais recentemente sacrificados foi retirada da cartilagem com auxílio de pinça e bisturi, seguindo-se a remoção do tecido gorduroso remanescente (Figura 11). As secções de pele foram então congeladas por até um mês antes de serem utilizadas nos ensaios (LIRA, 2007; LOPES, 2005).

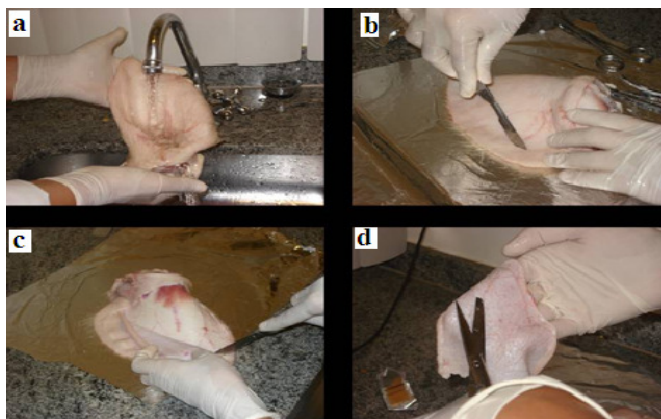


Figura11. Fotografia do método de preparação da pele de orelha de porco para estudo permeação retenção cutânea. a) lavagem da orelha; b) corte da pele da cartilagem; c) retirada da pele; d) remoção do tecido gorduroso.

Pele humana

O desenho consistiu de um estudo, no qual foram utilizadas secções de pele humana oriundas de cirurgia plástica. Estas foram submetidas ao processo de lavagem com solução isotônica e água estéril e em seguida foi retirado a gordura subjacente com a ajuda de uma tesoura cirúrgica. A pele obtida foi fragmentada em peças de 6 cm², seguindo-se a remoção do tecido gorduroso remanescente. As secções de pele foram congeladas em – 70 °C por até um mês antes de serem

utilizadas nos ensaios conforme metodologia adaptada de LIRA (2007). O referido estudo foi conduzido após aprovação prévia do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob Registro CEP/CCS/UFPE nº 333-07 (anexo I), bem como do consentimento livre esclarecido da paciente submetida à cirurgia plástica. Este estudo foi desenvolvido no NUDFAC (Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e de Cosméticos) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, sob a coordenação do Prof. Dr. Davi Pereira de Santana.

4.2.6.2 Determinação da solubilidade do fármaco em tampão fosfato pH 7,4

O coeficiente de solubilidade do DDA no tampão fosfato pH 7,4 foi determinado mediante o preparo de dispersões contendo excesso de DDA em ordem crescente de solubilidade. Nesse procedimento, realizado em triplicata, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 mg de DDA, e de cada vez, foram transferidos para frascos de cintilação com tampa. Em cada frasco foram adicionados 5 mL do tampão fosfato pH 7,4. Essas dispersões foram homogeneizadas por meio de agitação magnética por 2 horas. Em seguida, foram filtradas em filtro Millipore® e analisadas por CLAE-UV (LIRA, 2007).

4.2.6.3 Avaliação da recuperação do DDA em pele da orelha de porco e humana

Para avaliar a recuperação do DDA nas amostras das peles, o estrato córneo (EC) foi retirado de uma área difusional de 1,15 cm² das peles com o uso de 15 fitas adesivas (*tape stripping*) Figura 12. As fitas contendo o EC foram colocadas em tubos de ensaio onde foram adicionados volumes conhecidos (100 µL) de solução padrão de DDA em metanol, em três concentrações diferentes 1000, 400 e 40 µg

mL⁻¹ (Tabela 2). O metanol foi evaporado e em seguida adicionado 5 mL do solvente extrator para extração do DDA das fitas contendo o EC, aos quais foram agitados por 2 minutos e submetidos a banho de ultra-som por 30 minutos, seguindo de filtração em membranas Millipore 0,45 µm e quantificação por CLAE-UV (LIRA, 2007).

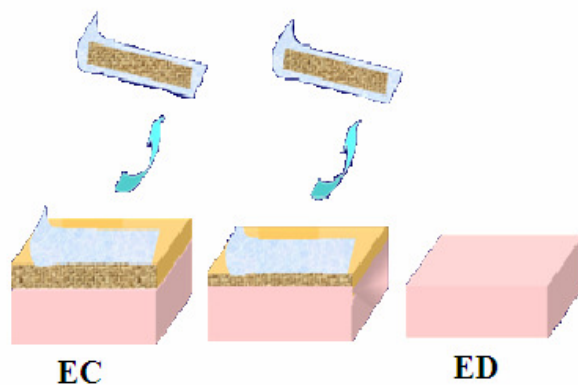


Figura 12. Representação esquemática da separação do EC e do ED pela técnica do *tape stripping*.

Tabela 2. Quantidades de solução padrão de DDA em metanol adicionadas nas fitas adesivas contendo o EC e na pele sem o EC para estudo de recuperação do fármaco

Fármaco	Solução padrão (µg mL ⁻¹)	Volume adicionado (µL)	Quantidade teórica adicionada (µg)
DDA	1000	100	100
DDA	400	100	40
DDA	40	100	4

Os pedaços de pele sem o EC foram picotados e colocados em tubos apropriados. A estes tubos foram adicionados volumes conhecidos (100 µL) de

solução padrão de DDA em metanol, em três concentrações diferentes 1000, 400 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2). O metanol foi evaporado e em seguida adicionado 5 mL do solvente extrator para extração do DDA. Cada tubo foi colocado em homogeneizador de tecidos por 12 minutos, para trituração, e em banho de ultra-som por mais 30 minutos, seguindo de filtração utilizando membranas com poro de diâmetro 0,45 μm e quantificação por CLAE-UV (n=6). Os valores de recuperação (%) foram determinados pela equação 9.

$$\text{Recuperação (\%)} = \text{concentração obtida/concentração real} \times 100 \quad (9)$$

4.2.6.4 Estudo de retenção e permeação *in vitro*

As cinéticas de difusão *in vitro* foram conduzidas utilizando-se células de difusão tipo Franz com área difusional de 1,15 cm^2 , volume de ± 6 mL e usando membrana de pele da orelha de porco e pele humana oriunda de cirurgia plástica. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato pH 7,4 num sistema composto de seis células individuais conectados a um banho termostatizado à $37 \pm 0,5$ °C sob agitação constante de 100 rpm em agitador magnético por um período de 24 horas. As membranas de peles foram colocadas na parte superior da célula receptora, com o EC voltado para o compartimento doador da célula de difusão, e a derme voltada para o compartimento receptor. No compartimento doador, foram aplicados 300 μL da formulação diretamente sobre a membrana e, posteriormente, o sistema foi fechado. As amostras da solução receptora foram coletadas nos seguintes tempos: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10; 12 e 24 horas. O volume total da fase receptora foi substituído a cada amostragem com tampão fosfato pH 7,4 à 37 °C para manutenção das condições sink do sistema. A quantidade de fármaco liberado no compartimento receptor foi quantificada por CLAE-UV.

Ao fim do experimento, as peles foram retiradas da célula de difusão e o excesso de formulação presente na pele foi delicadamente removido com auxílio de água destilada e tampão fosfato pH 7,4 e estas foram, posteriormente, secas com papel absorvente. As peles foram fixadas em uma superfície lisa com o EC voltado para cima, presas com alfinetes e cobertas por fita adesiva, deixando exposta apenas a área de permeação. Foram aplicadas 15 fitas adesivas, sendo a primeira fita desprezada, até total remoção do EC que foi indicado pelo brilho na face exposta da pele, ou seja, atingiu-se a epiderme viável (LIRA, 2008). As fitas foram unidas e colocadas em tubos de extração contendo 5,0 mL de metanol e agitadas em “vortex” por 2 minutos. Em seguida, foram deixadas por 30 minutos em banho de ultra-som e filtradas em membranas com diâmetros de poro de 0,45 μm . O tecido cutâneo restante, epiderme viável + derme (ED) foi picotado e homogeneizado em 5 mL por 12 minutos, em homogeneizador de tecidos, e em seguida deixado por 30 minutos em banho de ultra-som para rompimento das células. A suspensão obtida foi filtrada em membrana de poro 0,45 μm e as concentrações do fármaco presentes no EC e na ED foram quantificadas no filtrado por CLAE-UV.

4.2.6.5 Cálculo do fluxo (J) e do coeficiente de permeabilidade (K_p) do DDA na NE

O J foi calculado no *steady-state* a partir da porção linear da quantidade liberada por área versus tempo conforme dados da literatura (OZGUNEY et al., 2006; PANIGRAHI; PATTNAIK; GHOSAL, 2005).

Já o K_p foi calculado a partir do J no *steady-state* versus a concentração de DDA no compartimento doador (C_{doador}) conforme equação 10 sugerida por OZGUNEY et al. (2006).

$$K_p = J/C_{\text{doador}}$$

(10)

4.2.7. Determinação *in vivo* da atividade antiedematogênica por edema de pata induzido por carragenina em modelo animal

4.2.7.1. Obtenção dos animais

Foram utilizados ratos Wistar, *Rattus norvegicus* var. albinus, machos, entre 3-5 meses de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais receberam água e dieta (Labina[®]) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controles de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). O referido estudo foi realizado após a aprovação prévia, por escrito, do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da Universidade Federal de Pernambuco.

4.2.7.2. Avaliação da atividade antiedematogênica

A avaliação da atividade antiedematogênica foi determinada pelo teste da indução do edema de pata por carragenina 1 %. Os animais, ratos Wistar (*Rattus norvegicus* var. albinus) machos, foram tratados por via tópica e divididos em quatro grupos experimentais de 6 a 8 animais, sendo dois grupos teste (grupos 3 e 4) e dois grupos controle (grupo 1 e 2). O grupo 3 recebeu a NE-DDA F1 e o grupo 4 recebeu a NE-DDA F10. Dos grupos controle (grupo 1 e 2), um deles, negativo (grupo 1), utilizou vaselina sólida e o outro, controle positivo (grupo 2), utilizou emulgel referência de diclofenaco de dietilamônio. Os animais de cada grupo foram tratados antes do experimento e uma hora após o tratamento administrou-se, via subplantar (s.pl.), na pata direita de cada animal de cada grupo 20 µL de uma solução de carragenina 1 % e na pata contralateral foi administrado o mesmo volume de solução salina 0,9 %. Imediatamente após a injeção e nos tempos, pré-

determinados, 60, 120, 180, 240, 300 minutos, após a administração do agente flogístico (carragenina), procedeu-se a leitura do volume das patas dos animais em hidropletismômetro (Ugo Basile 7140). Para isto, as patas dos animais foram imersas, até o maléolo lateral no aparelho, sendo que o volume deslocado foi traduzido de forma digital. O valor do edema foi calculado pela diferença entre o volume (mL) da pata injetada com o agente flogístico e o volume da pata injetada com solução salina 0,9 %. A estatística utilizada para os resultados obtidos foram determinados a partir do programa prisma 5.0. O referido ensaio foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco sob a coordenação do Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley.

5. Resultados e discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento da metodologia e otimização das condições analíticas para quantificação do DDA por espectrofotometria UV-VIS e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)

A validação da metodologia analítica, tanto por espectrofotometria quanto por CLAE-UV, foi conduzida segundo Resolução da ANVISA RE nº 899, na qual determina que os parâmetros seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão e robustez devem ser analisados.

A seletividade ou especificidade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico e, este parâmetro deve ser reavaliado continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Para obtenção de uma metodologia confiável, para quantificação do DDA nas formulações de NE, foi necessário escolher a matriz [NE sem DDA e NE-DDA] a ser utilizada neste ensaio de validação, a qual foi obtida a partir da construção do diagramas de fase. A Figura 13 mostra o espectro de varredura do espectro do DDA na faixa de 250–350 nm, a qual mostra que a matriz NE sem DDA, não apresentou “absorção” em 282 nm, mostrando, desta forma, a especificidade do método.

A seletividade ou especificidade deste método avaliou o grau de interferência das espécies contidas na formulação de NE (PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeos; poligliceril 6-dioleato; miristato de isopropila) e impurezas, bem como outros compostos de propriedades similares que poderiam estar presentes nas NE (BRASIL, 2003), pois alguns excipientes podem sofrer degradação e, gerar compostos que não são observados inicialmente, podendo confundir com a substância de interesse (RIBANI et al., 2004), fato este não observado. Se a

especificidade não fosse assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estariam seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

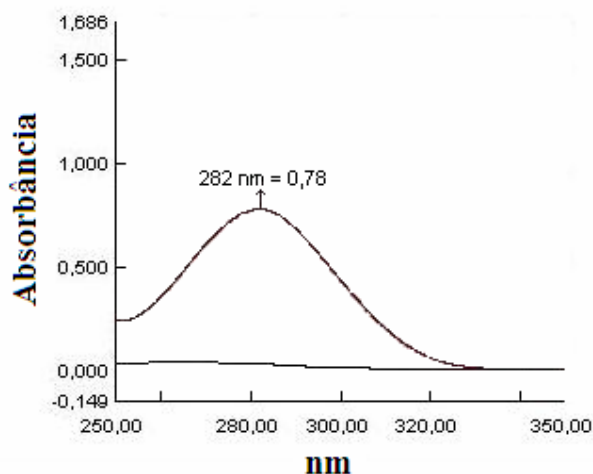


Figura 13. Espectro de absorção do DDA na NE sem DDA e na NE-DDA na região de 250-350 nm em solução metanólica $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O máximo de absorção encontrado para o DDA ocorreu em 282 nm, valor próximo ao encontrado ao método por CLAE-UV (280 nm) e aos citados na literatura (SINTOV; BOTNER, 2006; PARSAEE et al., 2002; KRIWET; MULLERGOYMANN, 1995). Valores ligeiramente diferentes podem ocorrer decorrentes de dissolução, solvatação, clivagem de retículo cristalino, conformações moleculares, pontes de hidrogênio, interação com solvente e temperatura (BERBENNI et al., 2001).

Já a metodologia desenvolvida e validada por CLAE-UV mostrou-se em conformidade com as especificações da legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2003), obtendo-se uma boa resolução com um tempo de corrida de apenas 3,5 minutos, o que é adequado para estudos de permeação cutânea *in vitro* devido ao grande número de amostras. O método se mostrou seletivo, já que os cromatogramas das amostras de pele humana sem o DDA não mostraram nenhum pico no tempo de retenção de 2,9 minutos, Figura 14.

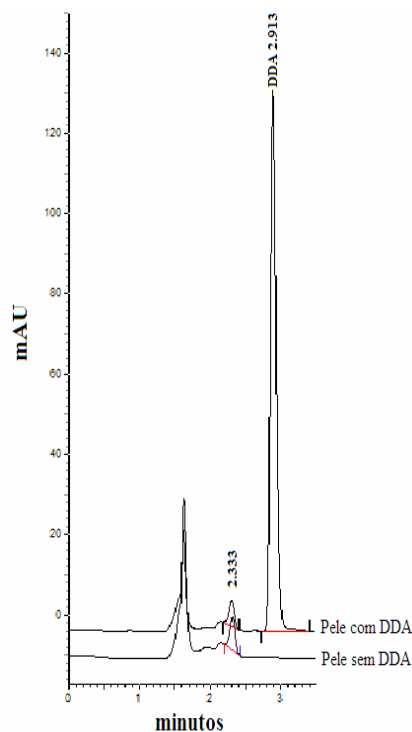


Figura 14. Representação do cromatograma do DDA para obtenção da seletividade do método em pele humana por CLAE-UV.

5.1.1 Validação do ensaio por espectrofotometria

A determinação da linearidade da curva analítica foi realizada empregando a equação da reta ($y = bx + a$), o coeficiente de correlação linear (r), precisão e exatidão. O método espectrofotométrico foi linear de 5 à 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DDA, partindo de uma solução padrão de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com um coeficiente de correlação de 0,995, o qual foi realizado em triplicata Tabela 3.

O coeficiente de correlação permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (CHUI; ZUCCHINI, 2001). Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão e

sua eficiência máxima (CHUI; ZUCCHINI, 2001). Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (NUNES et al., 2005). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003) um valor acima de 0,90. Sendo assim, o valor de r obtido para a análise do DDA estão dentro dos limites estabelecidos.

Tabela 3. Linearidade do método espectrofotométrico a partir de uma solução padrão de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol com as suas respectivas médias, precisão e exatidão

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
5	5,12 ($\pm 0,23$)	4,47	98,27
10	10,42 ($\pm 0,25$)	2,44	100,74
15	15,38 ($\pm 0,57$)	3,72	101,18
20	20,56 ($\pm 0,60$)	2,91	100,59
25	25,32 ($\pm 0,98$)	3,88	99,46
30	30,57 ($\pm 1,04$)	3,39	99,23
35	35,56 ($\pm 1,51$)	4,26	98,85

A reprodutibilidade do método espectrofotométrico foi determinada a partir de medições em sextuplicatas, de soluções de concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a qual foi escolhida por representar o ponto médio do intervalo especificado pelo procedimento (5 à 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da curva de calibração) e expresso pela média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) dos Laboratórios 1 e 2 [(Laboratório 1 – Laboratório de Tecnologia de Medicamentos = 21,29 $\pm 0,47$ $\mu\text{g mL}^{-1}$; CV (%) = 2,18 e Laboratório 2 – Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos =

20,81 $\pm$ 0,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CV (%) = 2,31. Ambos da Universidade Federal de Pernambuco]. Já repetibilidade e a precisão intermediária (precisão intra-corrida e a precisão inter-corrida, respectivamente) foram realizadas com analistas e em dias diferentes (FONSECA et al., 2004; BRASIL, 2003) cujos valores estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Repetibilidade e precisão intermediária (precisão intra-corrida e a precisão inter-corrida entre analistas e dias diferentes da NE-DDA do método espectrofotométrico com suas respectivas médias, precisão e exatidão

Analistas	Dias	Média ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}$) (n=6)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Analista 1	Dia 1	19,652 ($\pm$ 0,763)	3,88	98,26
	Dia 2	19,840 ($\pm$ 0,345)	1,74	99,20
Analista 2	Dia 1	19,300 ($\pm$ 0,828)	4,29	96,50
	Dia 2	20,329 ($\pm$ 0,711)	3,50	101,64

A exatidão do método espectrofotométrico foi determinada após o estabelecimento da linearidade e da especificidade, sendo verificada a partir de 9 (nove) determinações autênticas contemplando o intervalo linear do método, ou seja: 3 (três) concentrações: baixa [(10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ = 9,98 $\pm$ 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CV (%) = 0,42], média [(20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ = 20,60 $\pm$ 0,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CV (%) = 1,85)] e alta [(30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ = 30,66 $\pm$ 0,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CV (%) = 1,30)], com três réplicas cada. Sendo assim, a exatidão encontra-se dentro da faixa esperada, pois o coeficiente de variação (CV) não excedeu 5 % em nenhuma determinação analítica e os valores de $F_{\text{calculado}}$, nas três concentrações [baixa (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ = - 0,38; média (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) = 1,38 e alta (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) = 1,43] foram sempre abaixo dos valores de F_{tabelado} = 4,30 em todas as concentrações.

Foi constatado, também, que o método espectrofotométrico possui robustez intrínseca, pois manteve suas respostas, em triplicata, em meio às variações da marca do metanol, fornecedores diferentes ($20,88 \pm 0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $20,77 \pm 0,93 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente) e a técnica de preparação das amostras, agitação manual e banho de ultra-som por 5 minutos ($20,88 \pm 0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $20,76 \pm 0,86 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente). Segundo RIBANI et al., (2004) se estas mudanças pré-estabelecidas estiverem dentro dos limites de exatidão e precisão aceitáveis, então o método possui robustez e essas variações podem ser incorporadas aos procedimentos analíticos.

Os parâmetros limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o método espectrofotométrico foram $0,6094 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,9233 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. O LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo intervalo de confiança, correspondendo a um teste limite que especifica se a substância em exame está ou não presente na amostra. Enquanto que o LQ representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser quantificada com certo intervalo de confiança pré-estabelecido (BRASIL, 2003).

5.1.2 Validação do ensaio por CLAE-UV

Para o método desenvolvido por CLAE-UV a linearidade foi estudada em 9 níveis de concentrações, em uma faixa de $0,05$ a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicatas, partindo de uma solução padrão de 1 mg mL^{-1} , a qual apresentou um coeficiente de correlação de 0,998 cuja descrição encontra-se na Tabela 5.

A repetibilidade e a precisão intermediária (precisão intra-corrida e a precisão inter-corrida) foi avaliada a partir de injeções em sextuplicatas, cuja concentração

testada de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi escolhida por representar o ponto médio do intervalo especificado pelo procedimento ($0,05$ à $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ da curva de calibração) e expresso pela média, desvio padrão, precisão e exatidão entre analistas e dias diferentes Tabela 6.

Tabela 5. Linearidade do método por CLAE-UV a partir de uma solução padrão de 1 mg mL^{-1} em metanol com as suas respectivas médias, precisão e exatidão

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão (%)	Exatidão (%)
0,05	$0,045 \pm 0,001$	2,18	89,74
0,1	$0,096 \pm 0,004$	4,28	96,02
0,4	$0,394 \pm 0,007$	1,88	98,60
0,8	$0,798 \pm 0,037$	4,64	99,76
1,0	$0,939 \pm 0,046$	4,84	93,99
5,0	$5,084 \pm 0,229$	4,52	101,69
10,0	$10,197 \pm 0,427$	4,19	101,97
15,0	$14,102 \pm 0,445$	3,16	94,02
20,0	$18,762 \pm 0,713$	3,80	93,81

A exatidão foi avaliada, também, após a determinação da linearidade e da seletividade, sendo verificadas, neste caso, 9 determinações contemplando o intervalo linear da curva de calibração, ou seja, 3 concentrações: baixa [$(0,5 \mu\text{g mL}^{-1} = 0,501 \pm 0,052 \mu\text{g mL}^{-1}$; CV (%) = 10,32], média [$(1,0 \mu\text{g mL}^{-1} = 0,919 \pm 0,015 \mu\text{g mL}^{-1}$; CV (%) = 1,64)] e alta [$(1,5 \mu\text{g mL}^{-1} = 1,557 \pm 0,031 \mu\text{g mL}^{-1}$; CV (%) = 1,959)], e em triplicata.

Tabela 6. Precisão intermediária (precisão inter-corridas) entre analistas e dias diferentes da NE-DDA do método por CLAE-UV com suas respectivas médias, precisão e exatidão

Analistas	Dia	Média ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}$; n=6)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Analista 1	Dia 1	$0,948 \pm 0,04$	4,25	100,46
	Dia 2	$0,875 \pm 0,022$	2,49	92,72
Analista 2	Dia 1	$0,956 \pm 0,039$	4,1	101,31
	Dia 2	$0,897 \pm 0,008$	0,9	95,06

O método por CLAE-UV, também, possui robustez intrínseca, pois manteve suas respostas, em triplicata, em meio às variações da marca do metanol, fornecedores diferentes ($0,94 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,93 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente) e a temperatura da coluna 40 e 30 °C, cujos resultados foram: $0,93 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,94 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, com um LD de $0,003 \mu\text{g mL}^{-1}$ e um LQ de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$.

5.2. Diagramas de fase

Durante o processo de produção dos sistemas NE, selecionadas a partir dos diagramas de fase deste estudo, foi possível observar que a energia empregada e as proporções de seus componentes (óleo, água, tensoativo e co-tensoativo) foram apropriadas para reduzir a tensão interfacial até certo ponto e foi capaz de conduzir a formação de um sistema homogêneo, límpido e translúcido tipo Winsor IV que é característico de NE (WINSOR, 1948). Tal observação está em concordância com OSBORNE & WARD (1990), quando afirma que a estabilidade termodinâmica das NE é um fator de suma importância para os sistemas tópicos, pois estas

características resultam numa formulação cujas propriedades não dependem do processo de fabricação, ou seja, velocidade de rotação e esfriamento forçado, e que não sofrerá separação de fases, desde que a pressão e a temperatura permaneçam razoavelmente constantes.

Após a incorporação do DDA nas NE, por solubilização, os sistemas obtidos apresentaram-se com a mesma limpidez e transparência, inclusive na NE gel, mostrando que o DDA não influenciou a tensão interfacial entre a fase aquosa e a oleosa, não perturbando a estabilidade termodinâmica dos sistemas, e a característica Winsor IV (WINSOR, 1948) foi mantida em todas as formulações selecionadas. Os resultados desta manutenção da estabilidade, frente aos ensaios de eficiência de encapsulação podem ser esclarecidos pela concentração de DDA e por sua propriedade anfífila. Desta forma, o DDA adicionado migrou efetivamente para interface óleo/água, visto que o volume da fração lipídica, de cada formulação escolhida, produziu um número de vesículas lipídicas tal que o DDA incorporado não saturou a interface.

A técnica empregada para a determinação dos diagramas de fase, destes sistemas, mostrou-se bastante simples e reprodutível. Após as titulações, foi possível definir as várias regiões do diagrama, como separação de fases (SF), emulsão líquida branca leitosa (ELBL), emulsão opaca (EO), emulsão semi-sólida (ESS), áreas de dispersões turvas (DT) e regiões opticamente transparentes nanoemulsionadas (NE) e NE gel (NEG), como representada nas Figuras 15, 16, 17 e 18. Observa-se uma larga faixa do lado de cima de cada diagrama, cujos destaques são as regiões de NE, para qualquer proporção de tensoativo/co-tensoativo, e NE gel (NEG) que só foi produzido no diagrama 2:1 Figura 16. A partir dessas regiões (NE e NEG) foram selecionadas quatorze formulações para estudo

de eficiência de encapsulação. Além disso, foi verificado também, que a incorporação do DDA não interferiu ou alterou as regiões de NE do sistema, ou seja, elas permanecem isotrópicas, opticamente transparentes, mesmo depois da centrifugação à $11000\text{ g} \approx 14000\text{ rpm}$ por 30 minutos, pois nenhuma sedimentação de sólidos ou separação de fases foram observadas.

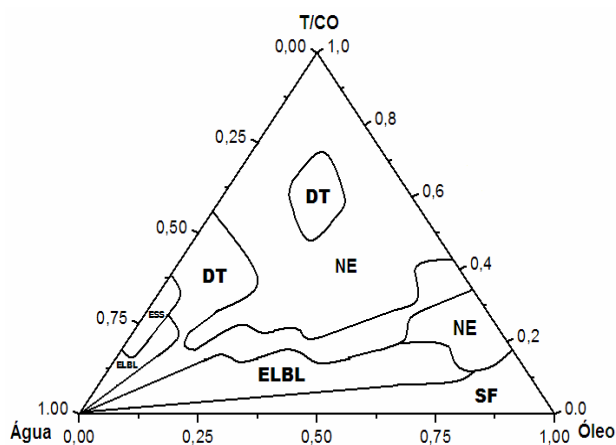


Figura 15. Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema PEG-8 cáprico/caprílico gricerídeo (Labrasol®)/poligliceril 6-dioleato (Plurol oleico®), miristato de isopropila e água para proporções T:CO 1:1. As áreas delimitadas representam: **SF** – separação de fases; **ELBL** – emulsão líquida branca leitosa; **DT** - dispersões turvas; **ESS** – emulsão semi-sólida; **NE** – nanoemulsão.

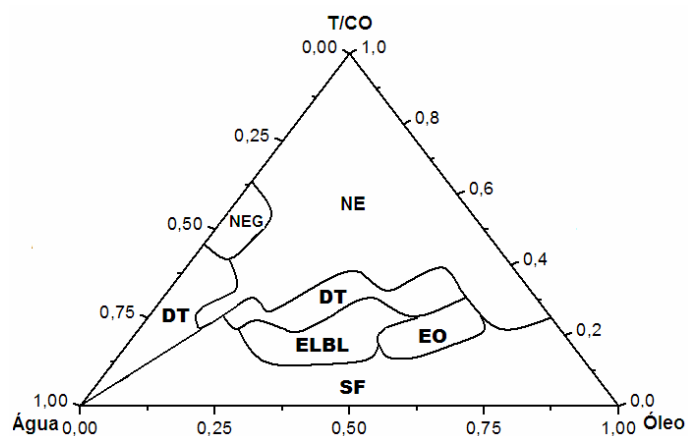


Figura 16. Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema PEG-8 cáprico/caprílico gricerídeo (Labrasol®)/poligliceril 6-dioleato (Plurol oleico®), miristato de isopropila e água para proporções T:CO 2:1. As áreas delimitadas representam: **SF** – separação de fases; **ELBL** – emulsão líquida branca leitosa; **EO** – emulsão opaca; **DT** - dispersões turvas; **NE** – nanoemulsão e **NEG** – nanoemulsão gel.

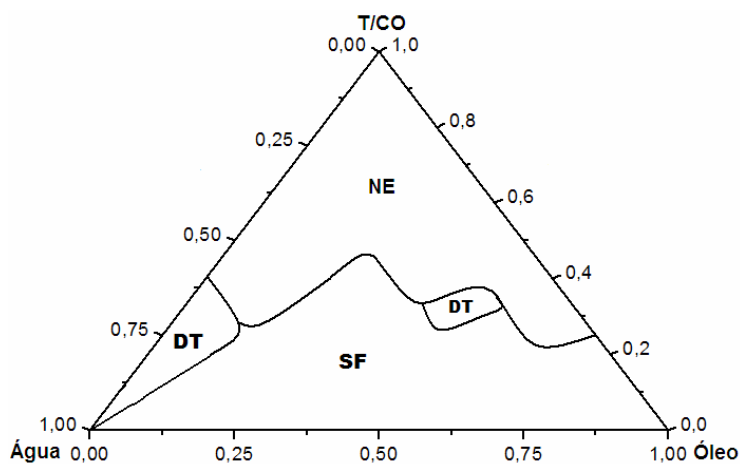


Figura 17. Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema PEG-8 cáprico/caprílico gricerídeo (Labrasol®)/poligliceril 6-dioleato (Plurol oleico®), miristato de isopropila e água para proporções T:CO 3:1. As áreas delimitadas representam: **SF** – separação de fases; **DT** - dispersões turvas; **NE** – nanoemulsão.

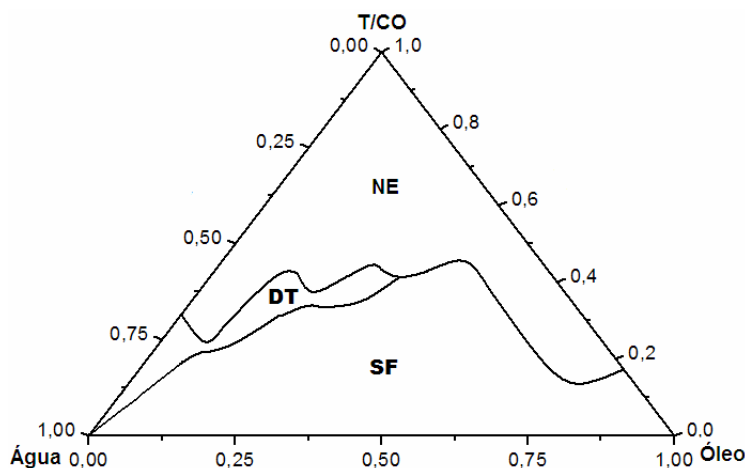


Figura 18. Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema PEG-8 cáprico/caprílico gricerídeo (Labrasol®)/poligliceril 6-dioleato (Plurol oleico®), miristato de isopropila e água para proporções T:CO 4:1. As áreas delimitadas representam: **SF** – separação de fases; **DT** - dispersões turvas; **NE** – nanoemulsão.

5.3 Seleção das NE

Após a construção dos diagramas de fase foram selecionadas 14 formulações, cujas composições centesimais estão descritas na Tabela 7, sendo quatro do diagrama 4:1, três do diagrama 3:1 e 2:1 respectivamente e quatro do diagrama 1:1, as quais foram usadas para a realização dos ensaios de eficiência de encapsulação do DDA nas NE. Todas as formulações selecionadas apresentaram-se como sistemas homogêneos, aspecto límpido e translúcido característico de NE do tipo Winsor IV (Figura 19).



Figura 19. Representação da classificação de Winsor, representados respectivamente da esquerda para a direita por Winsor I, Winsor II, Winsor III e Winsor IV.

5.4 Eficiência de encapsulação do DDA nas NE

O ensaio de eficiência de encapsulação foi utilizado como método de triagem para selecionar qual e ou quais formulações seriam capazes de suportar o fármaco, as quais seriam usadas no estudo de caracterização e cinética de permeação. Para realização deste ensaio foi necessário desenvolver o método espectrofotométrico para realizar o doseamento do DDA nas NE, conforme descrito anteriormente na seção 4.2.4.1.

A concentração nominal do DDA para cada formulação foi confirmada no doseamento, mostrando que a incorporação do fármaco foi completa. Além disso, os resultados demonstraram que durante e após o processo de centrifugação nenhuma mudança, precipitado e/ou separação de fases foi observado. Desta forma, a eficiência de encapsulação revelou um grau de interação entre o DDA e as NE selecionadas, o que pode ser constatado na eficiência de encapsulação média de $89,60 \pm 14,19 \%$ descrito na Tabela 8.

Após o ensaio de triagem eficiência de encapsulação, foram selecionadas três formulações com seus respectivos valores de encapsulação NE-DDA $F1 = 99,56 \pm$

0,59; NE-DDA F7 = $101,83 \pm 3,15$ e NE-DDA F10 gel = $101,16 \pm 0,74$ as quais foram usadas para estudo de caracterização físico-química.

Tabela 7. Composição centesimal das NE líquidas e gel obtidas nos diagramas pseudo-ternário

Componente	Diagrama 4:1 (%)				Diagrama 3:1 (%)			Diagrama 2:1 (%)			Diagrama 1:1 (%)			
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14
Labrasol®	36	40	32	24	37,5	30	22,5	23,3	33,3	35,3	25	15	15	25
Plurol oleico®	9,0	10	8,0	6,0	12,5	10	7,5	11,7	16,7	17,6	25	15	15	25
Miristato isopropila	5,0	15	10	5,0	15	10	5,0	15	15	5,9	20	32	20	15
Água q.s.p	50	35	50	65	35	50	65	50	35	41,2	30	38	50	35
EHL	13,6	13,6	13,6	13,6	13	13	13	11,9	11,9	12,1	10	10	10	10

EHL = equilíbrio hidrófilo-lipofílico; F1 = Formulação usada na validação das metodologias tanto por espectrofotometria como por CLA-UV; NE-DDA F10 = nanoemulsão gel

Tabela 8. Eficiência de encapsulação das formulações selecionadas de NE-DDA

Formulação	Antes da centrifugação	Após a centrifugação	% DDA incorporado
	DDA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DDA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
F1	19,71 $\pm$ 0,07	19,62 $\pm$ 0,09	99,56 $\pm$ 0,59
F2	24,20 $\pm$ 0,78	21,48 $\pm$ 0,05	88,91 $\pm$ 2,76
F3	20,77 $\pm$ 0,49	21,23 $\pm$ 0,39	102,19 $\pm$ 0,70
F4	20,74 $\pm$ 0,07	20,90 $\pm$ 0,17	100,74 $\pm$ 0,75
F5	21,13 $\pm$ 0,44	20,66 $\pm$ 0,07	97,84 $\pm$ 2,15
F6	20,69 $\pm$ 0,22	20,89 $\pm$ 0,13	100,99 $\pm$ 0,49
F7	20,25 $\pm$ 0,48	20,60 $\pm$ 0,19	101,83 $\pm$ 3,15
F8	25,20 $\pm$ 0,42	21,91 $\pm$ 1,20	86,93 $\pm$ 3,43
F9	22,01 $\pm$ 0,15	21,50 $\pm$ 0,14	97,64 $\pm$ 1,28
F10	22,14 $\pm$ 0,36	22,40 $\pm$ 0,28	101,16 $\pm$ 0,74
F11	28,65 $\pm$ 0,16	20,62 $\pm$ 0,33	71,98 $\pm$ 1,39
F12	28,45 $\pm$ 0,09	19,71 $\pm$ 0,55	69,28 $\pm$ 1,72
F13	28,64 $\pm$ 0,25	19,14 $\pm$ 0,49	66,86 $\pm$ 1,63
F14	29,33 $\pm$ 0,33	20,13 $\pm$ 0,13	68,53 $\pm$ 0,49
Media	-	-	89,6 $\pm$ 14,19

5.5 Caracterização físico-química das NE selecionadas

As NE selecionadas foram caracterizadas 48 horas após a fabricação com avaliação dos seguintes parâmetros: aspecto macroscópico, doseamento, pH, σ , DR, análise granulométrica, microscopia de luz polarizada, ζ mV e IR.

Na Tabela 9 encontram-se os resultados da caracterização realizada em três sistemas isotrópicos, sendo dois líquidos NE-F1 e NE-F7 e um gel NE-F10. As NE são física e quimicamente mais estáveis em pH 5,5 a 8,0, este fato está relacionado à taxa de hidrólise dos glicerídeos, que ao se dissociarem, liberam ácidos graxos livres reduzindo o pH da formulação. Este parâmetro é empregado como indicador de perda da estabilidade de NE em diferentes condições de temperatura e armazenamento, e pode influenciar também, a localização e estabilidade do fármaco no sistema (FRONZA; CAMPOS; TEIXEIRA, 2004).

O pH cutâneo da pele oscila entre 5,5 e 7,0, podendo ser tolerado até pH 8,0 (SILVA, 2000). Essa faixa de pH é mantida por um sistema tampão de ácido láctico/lactato, pelos ácidos dicarboxílicos do suor, ácidos graxos das glândulas sebáceas e pelos elementos ácidos da queratina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). O pH ideal de uma formulação é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância da pele. No caso das NE desenvolvida nesta pesquisa foi na faixa de 6,5 a 7,1 mostrando que este parâmetro não foi afetado com a incorporação do DDA nas NE (Tabela 9).

O DDA apresenta um pKa de 4,87 (DJORDJEVIC et al., 2005) e quando disperso em um meio cujo pH é mais elevado do que o seu valor de pKa ele tende a permanecer inserido no sistema na forma molecular, a qual vai formar combinações moleculares com a fase aquosa do sistema, causando desta forma um incremento

nos valores de viscosidade e de σ como pode ser visualizado e comprovado nos dados da Tabela 9.

Para os ácidos fracos com pKa maiores que 7,5 e bases fracas com pKa menores que 5, a absorção cutânea é independente do pH (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). Desse modo, como o pKa do DDA é 4,87 (DJORDJEVIC et al., 2005), o pH do meio não foi fator relevante nas cinéticas de permeação.

Devido à natureza dinâmica e ao pequeno tamanho das gotículas dispersas das NE, o exame direto é muito difícil. Portanto, foi necessário utilizar técnicas indiretas como a medição da σ e determinação da reologia do sistema, para obter informações básicas sobre a estrutura do sistema (KAHLWEIT; STREY, 1987; STREY, 1996).

Observa-se, a partir dos dados da Tabela 10, que a σ dos sistemas foi modificada com a adição do DDA, visto que os valores nas formulações de NE sem o DDA foram sempre inferiores aos valores das NE-DDA. A medida da σ é uma forma para se determinar o tipo de NE quanto às fases o/a ou a/o, assim como também possibilita a monitoração do fenômeno de percolação (Φ_p) ou inversão de fases (LAWRENCE; REES, 2000). A presença de NE o/a na forma de gotículas ocorre quando o volume de óleo é baixo. Diferentemente, NE a/o na forma de gotículas ocorrem quando o volume de água é baixo e, em sistemas onde a quantidade de água e óleo se equivale, resultam-se numa NE bicontinua (LAWRENCE; REES, 2000, ROSSETI, 2006). Desta forma, com base nesses dados da literatura, foi realizado o monitoramento da σ em função da fração volumétrica da fase aquosa (Φ_w) para o sistema F1 com o intuito de determinar o tipo de NE deste sistema a/o, o/a ou bicontinua (Figura 20).

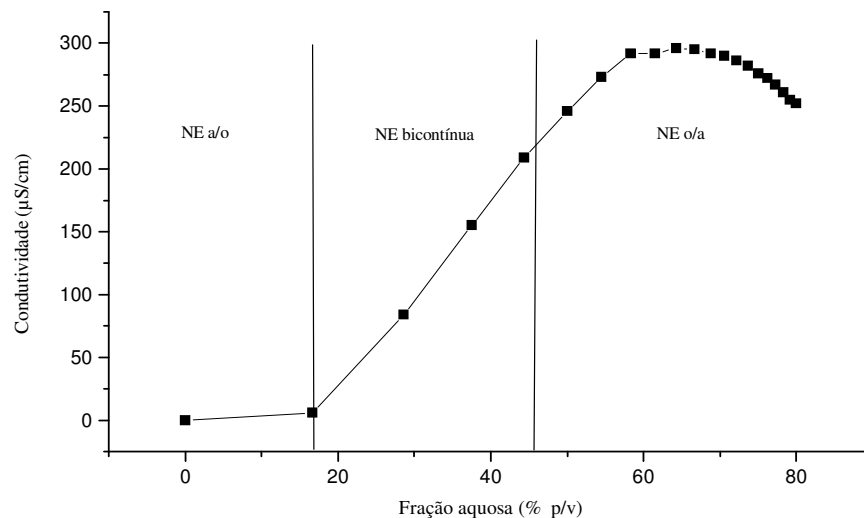


Figura 20. Monitoramento da σ da formulação NE-F1 sem DDA

Segundo DJORDJEVIC et al., (2004) o monitoramento da σ é um dos parâmetros utilizados para caracterizar e identificar as estruturas bicontínuas das NE, pois a σ varia com o aumento da fração aquosa (Φ_w) no meio. Existe uma correlação direta entre, este parâmetro e o tipo de tensoativo usado, na sua estrutura interna (KAHLWEIT; STREY, 1987).

É sabido que NE o/a ou bicontínuas possuem um elevado valor de σ , quando comparadas a NE a/o (BUMAJDAD; EASTOE, 2004). A estrutura interna de NE é bastante difícil de ser determinada, sendo necessária a utilização de mais de uma técnica para sua caracterização, tais como, microscopia eletrônica de criofratura e coeficiente de auto-difusão (HELLWEG, 2002).

Tabela 9. Resultados da caracterização das NE-F1, NE-F7 e NE-F10 gel

Parâmetros	NE-F1		NE-F7		NE-F10	
	NE sem DDA	NE-DDA	NE sem DDA	NE-DDA	NE sem DDA	NE-DDA
Aspecto macroscópico	Límpido	límpido	Límpido	límpido	límpido	límpido
Doseamento ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	--	$20,92 \pm 0,01$	--	$21,07 \pm 0,007$	--	$22,38 \pm 0,03$
pH	$6,55 \pm 0,04$	$7,09 \pm 0,03$	$6,49 \pm 0,02$	$7,12 \pm 0,03$	$6,85 \pm 0,07$	$7,11 \pm 0,01$
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	$294,7 \pm 0,57$	$564,0 \pm 2,0$	$199,85 \pm 2,0$	$431,66 \pm 1,52$	$24,73 \pm 1,6$	$73,55 \pm 0,7$
Densidade relativa (g L^{-1})	$1,0284 \pm 0,01$	$1,0285 \pm 0,01$	$1,0139 \pm 0,02$	$1,0158 \pm 0,01$	$1,0275 \pm 0,003$	$1,029 \pm 0,01$
Índice de refração	$1,399 \pm 0,0$	$1,420 \pm 0,01$	$1,384 \pm 0,01$	$1,385 \pm 0,01$	$1,413 \pm 0,003$	$1,413 \pm 0,004$
Potencial zeta (mV)	$- 18,893 \pm 1,67$	$- 18,777 \pm 0,91$	$- 21,157 \pm 0,35$	$- 21,167 \pm 0,87$	$- 21,083 \pm 1,37$	$- 25,48 \pm 1,46$
Tamanho da gotícula (nm)	$40,1 \pm 3,9$	$61,1 \pm 1,0$	$88,4 \pm 2,6$	$9,9 \pm 0,3$	$94,6 \pm 2,9$	$127,6 \pm 6,7$
IPD	$0,106 \pm 0,014$	$0,299 \pm 0,01$	0,219	0,244	0,273	0,105

IPD = Índice de polidispersidade

A Figura 20 mostra que a σ , no sistema investigado (NE-F1 sem DDA), era quase zero antes de acrescentar água (até $\approx 18\%$ p/v) e durante a titulação aquosa ocorreu um aumento linear até $\approx 45\%$ p/v, após isso ela não mais foi afetada com a adição de água, em seguida, ocorreu uma diminuição da mesma, e isto pode ser explicado pela diminuição da fração lipídica no meio disperso. Deste modo, a curva de σ ilustra a existência de três regiões estruturais: NE a/o com $\Phi_w < 18\%$ p/v; NE bicontínua com $[18\% \text{ (p/v)} < \Phi_w < 45\% \text{ (p/v)}]$ e NE o/a com $\Phi_w > 45\%$ (p/v). Quando a fração aquosa (Φ_w) aumenta, a σ também aumenta linearmente, até certo ponto, e este fenômeno é chamado de percolação crítica (Φ_p), podendo chegar a uma percolação ultracrítica (Φ_{up}) (DJORDJEVIC, 2004).

A reologia consiste no estudo do escoamento, ou deformação do material em estudo quando submetido a uma tensão. O método é aplicável na caracterização de sistemas NE, pois o comportamento do fluido está diretamente relacionada com o tipo e grau de organização do sistema, além de poder ser usado para checar a qualidade durante o processo de produção, permitindo um estudo do efeito da adição do DDA nas formulações (FORMARIZ, 2004).

As formulações NE-F1 e NE-F7 apresentaram-se na forma de um fluido líquido e a formulação NE F10 na forma de fluido viscoso, porém todos apresentaram um comportamento reológico de um fluido newtoniano tempo independente conforme apresentado nas Figuras 21, 22 e 23. O estudo reológico mostrou que os sistemas estudados se comportaram como fluidos newtonianos, pois mantém a viscosidade constante, com a velocidade de cisalhamento aplicada, ou seja, a tensão de cisalhamento e o gradiente de cisalhamento são diretamente proporcionais, originando um único valor de viscosidade. As alterações que ocorreram sobre as propriedades reológicas ao longo do tempo foram determinadas

verificando as viscosidades do sistema em função da velocidade do “Spindle”, de modo ascendente e descendente continuamente, mostrando que os referidos sistemas são fluidos newtoniano tempo-independente, visto a sobreposição das curvas.

Esses resultados de reologia estão em concordância com a literatura, pois segundo diversos autores (DJORDJEVIC et al., 2005; ESPOSITO et al., 2003; SPICLIN et al., 2003; GASCO; GALLARATE; PATTARINO, 1991) as NE apresentam comportamento de fluido newtoniano, ou seja, a viscosidade se mantém constante com a variação da taxa de cisalhamento, independentemente se o sistema é a/o ou o/a (WARR, 1995).

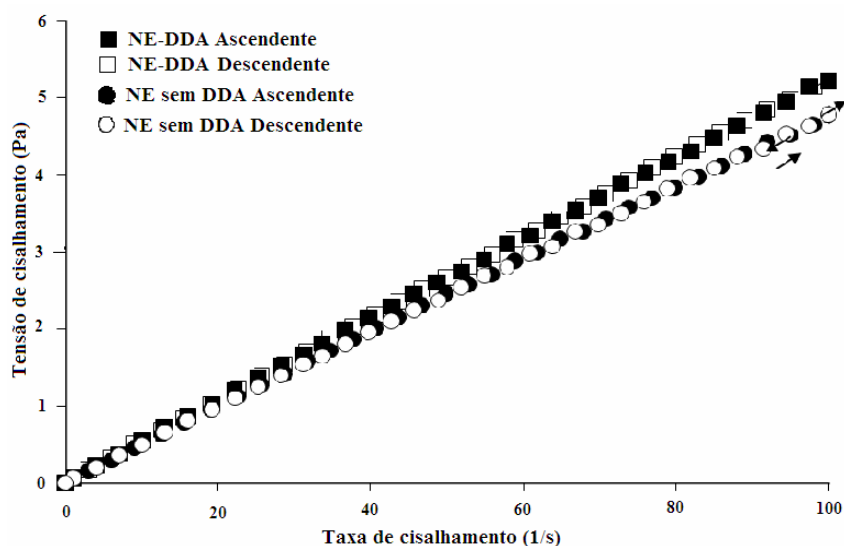


Figura 21. Comportamento reológico do sistema NE-F1

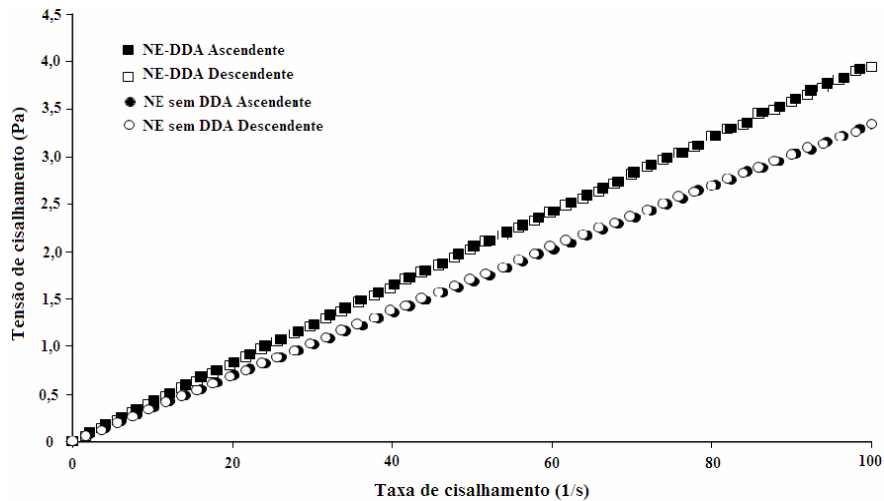


Figura 22. Comportamento reológico do sistema NE-F7

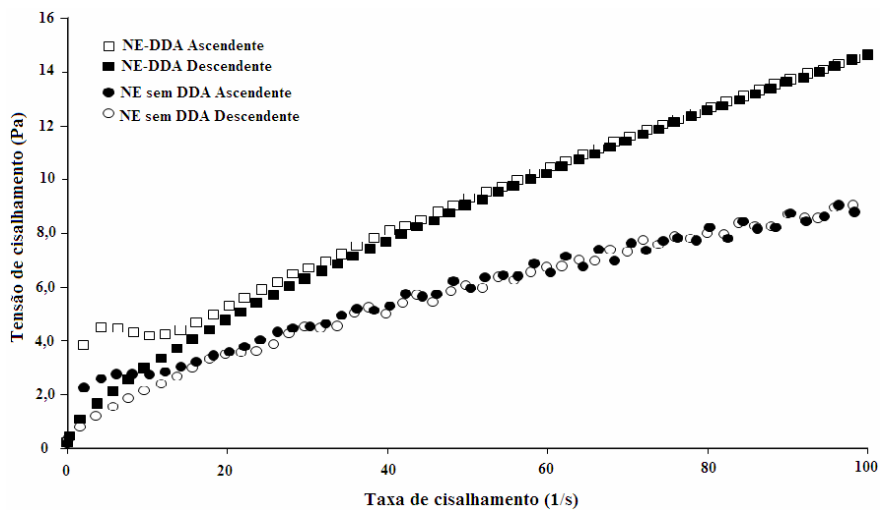


Figura 23. Comportamento reológico do sistema NE-F10 gel

As análises do tamanho das gotículas da fase interna dos sistemas NE-F1, NE-F7 e NE-F10 gel (Tabela 9) demonstraram uma distribuição do tipo monomodal e homogênea das gotículas, a qual foi evidenciada pela baixa polidispersidade (0,2). A literatura (SINTOV; SHAPIRO, 2004; KREILGAARD, 2002; LAWRENCE; REES, 2000; TENJARLA, 1999; FRIBERG, 1990) considera que um sistema disperso para ser considerado NE é necessário que o tamanho de suas gotículas fase interna esteja entre 10 e 150 nm. Por isso, podemos afirmar que os sistemas estudados são

NE, bem como, podemos utilizá-la para realização dos estudos de permeação e retenção cutânea.

A técnica de espalhamento de luz é usada na determinação do tamanho de gotículas de esferas monodispersas diluídas (ABOOFAZELI et al., 2000; LAWRENCE; REES, 2000; FORMARIZ, 2004) e sistemas com elevada viscosidade podem levar a erros experimentais na determinação do seu tamanho (ABOOFAZELI et al., 2000), pois a técnica de determinação é fundamentada no movimento browniano das gotículas em dispersão(FORMARIZ, 2004), sendo o coeficiente de difusão das gotículas no meio o principal parâmetro levado em consideração (ORTHABER; GLATTER, 2000). Desse modo, as medidas de espalhamento de luz, tanto das NE sem DDA como das NE-DDA, foram realizadas diluído com a fase aquosa, a qual representa a fase contínua do sistema conforme normas adotadas por PARK & LEE (1999).

A adição do DDA causou uma diminuição do tamanho das gotículas para o sistema líquido isotrópico NE-F7 e um aumento para os sistemas NE-F1 e gel NE-F10, o que já era esperado, porém todas mantiveram a sua isotropia e homogeneidade com uma pequena polidispersidade. Esta diminuição do tamanho das gotículas para o sistema NE-F7 pode ser consequência da característica anfifílica do DDA, a qual parte das moléculas de DDA incorporada migrou para o filme interfacial, fato confirmado pela elevação da σ .

O diâmetro das gotículas foi menor do que 200 nm, sendo viável sua aplicação por via tópica (LUNDBERG; MORTIMER, 1996). A literatura descreve que sistemas que apresentam gotículas pequenas após a sua aplicação tópica podem ser utilizados como sistemas de liberação prolongada (TROTA, 1999).

A isotropia de um sistema disperso como uma NE pode ser determinada por microscopia de luz polarizada, cujas propriedades são utilizadas para revelar informação sobre sua micro estrutura interna (FORMARIZ et al., 2007). Sendo assim, as NE estudadas apresentaram apenas um índice de refração não havendo, portanto, nenhum desvio ou vibração da luz polarizada, as quais se apresentaram com as mesmas propriedades ópticas em todas as direções (Figuras 24 e 25).



Figura 24. Fotomicrografia obtida a temperatura de 25°C utilizando microscopia de luz polarizada da formulação NE-DDA F1, objetiva de 32, mostrando líquido isotrópico composto de 45% da mistura tensoativo/co-tensoativo, 5% fase oleosa e 50% fase aquosa.



Figura 25. Fotomicrografia obtida a temperatura de 25°C utilizando microscopia de luz polarizada da formulação NE-DDA F10, objetiva de 32, mostrando gel isotrópico

composto de 52,9 % da mistura tensoativo/co-tensoativo, 5,9 % fase oleosa e 41,2 % fase aquosa.

Na Tabela 9 estão apresentados, também, os valores de ζ mV das NE-F1, NE-F7 e NE-F10 gel, podendo observar valores negativos variando de – 18 à – 25 mV. Esses resultados estão em concordância com a literatura (WIACEK; CHIBOWSKI, 2002; WASHINGTON, 1996), os quais relacionaram análise de ζ mV e pH de sistemas dispersos observando que o ζ mV tende a se tornar mais negativo com o aumento do pH. Essa negatividade pode ser atribuída à possível presença de grupos ácido carboxílico na superfície das gotículas, as quais ionizam formando gotículas carregadas negativamente (AUTON, 2005), cuja ionização desses grupos dependem do pH do sistema. Nas NE-DDA isso pode ser confirmado pois segundo AUTON (2005) em sistemas dispersos em que o fármaco inserido possua um pKa (4,87) abaixo do pH do meio ($\approx 7,0$) o grupo amino do DDA não está na forma ionizada e sim na forma molecular, com isso a carga líquida da molécula torna-se negativa por causa da ionização do grupo carboxila.

Os resultados apresentados com o estudo da DR e IR, Tabela 9 mostram que os valores obtidos, entre as formulações NE sem DDA e NE-DDA, não foram estatisticamente significativos, mesmo com uma pequena elevação na NE-DDA.

5.6. Estudo de liberação *in vitro* do DDA em membranas sintéticas

Na avaliação de produtos de ação dermatológica como, por exemplo, uma NE de DDA, testes clínicos devem ser precedidos, e em algumas vezes substituídos, por testes *in vitro*. Estes testes, devido às suas peculiaridades, permitem entender alguns fenômenos que ocorrem entre a aplicação do produto e o efeito medido farmacologicamente, de maneira prática, rápida e sem a interferência de fatores biológicos (SATO et al., 2007).

Para este ensaio foi utilizada a célula de difusão baseada no modelo de Franz, usualmente empregada em estudo de liberação *in vitro*. É sabido que a eleição de uma solução receptora para os experimentos *in vitro* depende da solubilidade do fármaco, pois é necessária a manutenção das condições sink para garantir a obtenção de resultados efetivos (SHAH; MAIBACH, 2003). No caso do DDA, o mesmo mostrou-se muito solúvel em tampão fosfato pH 7,4, com solubilidade superior à 6 mg mL^{-1} e por isso o mesmo foi escolhido.

A literatura relata que já foram feitos inúmeros estudos de investigação sobre a liberação de drogas em NE, porém houve apenas algumas tentativas para estabelecer um modelo matemático adequado descrevendo a cinética de liberação (GRASSI et al., 2000).

A Figura 26 mostra a liberação *in vitro* da NE-DDA F10 gel e das formulações comercial emulgel genérico e referência, usando membranas hidrofílicas de acetato de celulose após 12 horas de cinética.

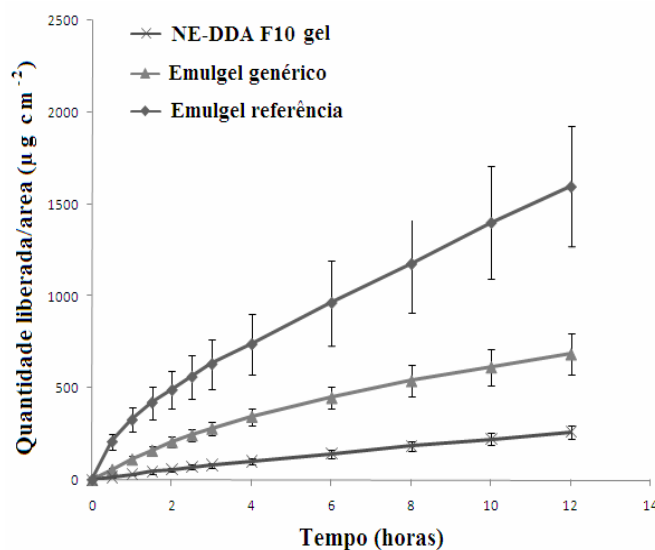


Figura 26. Liberação *in vitro* do DDA da NE-DDA F10 gel e das formulações comerciais emulgel genérico e referência usando membrana artificial de acetato de celulose.

Observa-se que houve uma diferença significativa entre as formulações testadas desde as primeiras horas das cinéticas, cuja ordem foi referência > genérico > NE-DDA F10 gel. O K_p da NE-DDA F10 gel ($5,76 \times 10^{-3} \pm 7,1 \times 10^{-4} \text{ cm h}^{-1}$) foi menor em relação ao medicamento genérico e referência ($1,28 \times 10^{-2} \pm 2,3 \times 10^{-3} \text{ cm h}^{-1}$ e $3,1 \times 10^{-2} \pm 5,4 \times 10^{-3} \text{ cm h}^{-1}$, respectivamente). Nesta triagem, os valores de J da NE-DDA F10 gel, emulgel comercial genérico e referência foram, respectivamente, $20,06 \pm 2,48$; $44,84 \pm 8,01$ e $108,02 \pm 18,78 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. A literatura relata que as NE têm grande capacidade de liberação de fármacos (OZGUNEY et al., 2006; KREILGAARD, 2002). No entanto, neste ensaio, foi encontrado resultado contraditório, pois a NE apresentou um menor J e menor quantidade liberada que os emulgeis comerciais.

5.7. Estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro*

5.7.1. Recuperação do DDA na pele humana e de orelha de porco

A administração de produtos medicamentosos pela via cutânea destina-se à obtenção, tanto de uma ação tópica como sistêmica, sendo primordial que se tenha uma concreta definição de qual destas ações é desejada, visto que os critérios para avaliação destes produtos são conceitualmente diferentes (SATO et al., 2007). Um produto dermatológico destinado ao tratamento de patologias cutâneas, exige-se a retenção do fármaco na pele, com pequeno ou inexistente fluxo através dela (SHAH, 1992).

De acordo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa – RE nº 899, de 29 de maio de 2003) a recuperação é a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras “branco” acrescidas de

padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídos (LIRA, 2007; BRASIL, 2003).

A determinação por CLAE-UV do DDA recuperado da pele da orelha de porco e da pele humana foram realizadas após a extração direta em metanol. Este procedimento apresentou-se adequado, uma vez que o fármaco é solúvel em metanol e os componentes da pele e da fita adesiva, que também foram extraídos, não interferiram no método analítico conforme cromatograma da Figura 14 mostrada no item 5.1.

A Tabela 10 mostra os valores de DDA ($8,0$ e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) extraído do EC e da epiderme + derme (ED) da pele de orelha de porco e a Tabela 11 mostra os valores de DDA ($0,08$; $8,0$ e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) extraído do EC e da ED da pele humana. A literatura (CAUSON, 1997) recomenda que a extração não possa exceder 15 %. Sendo assim, os resultados mostram que os valores de extração do DDA na pele da orelha de porco e humana estão de acordo com os limites estabelecidos.

Table 10. Recuperação do DDA no EC e na ED em pele de orelha de porco

	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	$8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (n=5)			$20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (n=4)		
	Media $\pm$ DP	CV (%)	Extracção (%)	Media $\pm$ DP	CV(%)	Extracção (%)
EC	$7,760 \pm 0,49$	6,29	86,67	$18,05 \pm 3,1$	10,72	90,26
ED	$7,808 \pm 0,19$	2,49	87,21	$17,85 \pm 1,08$	1,22	89,25

Tabela 11. Recuperação do DDA no EC e na ED em pele humana

	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)								
	$0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3)			$8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3)			$20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3)		
	Média $\pm$ DP	CV (%)	Ext. (%)	Média $\pm$ DP	CV (%)	Ext. (%)	Média $\pm$ DP	CV (%)	Ext. (%)
EC	$0,099 \pm 0,015$	14,77	91,93	$7,191 \pm 0,48$	6,68	80,32	$18,47 \pm 1,18$	6,44	85,52
ED	$0,104 \pm 0,01$	6,31	96,89	$8,06 \pm 0,69$	8,67	90,0	$19,72 \pm 1,3$	6,61	91,32
Solução Padrão	$0,107 \pm 0,01$	9,42	-	$8,95 \pm 0,03$	0,33	-	$21,59 \pm 0,07$	0,32	-

Ext = extração

5.7.2. Permeação cutânea *in vitro* do DDA

Para este estudo, conforme descrito na seção 4.2.6.4, foi utilizada a célula de difusão baseada no modelo de Franz, usualmente empregada em estudo de permeação cutânea *in vitro*. É sabido que a eleição de uma solução receptora para os experimentos *in vitro* depende da solubilidade do fármaco, pois é necessária a manutenção das *sink conditions* para garantir a obtenção de resultados efetivos (SHAH, 2003). No caso do DDA, o mesmo mostrou-se muito solúvel em tampão fosfato pH 7,4, com solubilidade superior à 6 mg mL^{-1} e por isso foi o escolhido.

A membrana é outro fator crítico na condução dos experimentos de permeação *in vitro*. As membranas sintéticas não possuem as propriedades anatômicas e fisiológicas da pele e por isso, as mesmas, foram utilizadas como método de triagem neste estudo, pois o ideal é realizar estes estudos com membranas naturais (pele humana e de animais).

A pele da orelha de porco tem sido muito utilizada nos experimentos *in vitro*, apesar de apresentar algumas diferenças anatômicas quando comparada com a pele humana, ao passo que a pele humana decididamente é a mais adequada para estudos *in vitro*. Existem grandes diferenças nas estruturas histológicas das peles dos mamíferos, sendo em geral, a pele humana é a que possui menor permeabilidade (BERROZPE; LANA O; DELFINA, 1998). A viabilidade de aquisição, a melhor uniformidade das amostras, bem como a facilidade de separação do tecido subcutâneo, contribuiu para eleição destes tipos de pele como modelo de membrana para o estudo de permeação da NE-DDA (SATO et al., 2007; SATO; SUGIBAYASHI; MORIMOTO, 1991).

A Tabela 12 mostra a quantidade permeada (QP), fluxo (J) e coeficiente de permeabilidade (K_p), bem como as Figuras 27 e 28 mostram os perfis de liberação *in*

vitro das formulações NE-DDA F1, NE-DDA F10 gel, emulgel referência e o emulgel genérico, utilizadas no estudo de permeação usando membranas da orelha de porco e da pele humana após 24 horas de cinética.

Tabela 12. Quantidade permeada (QP), fluxo (J) e coeficiente de permeabilidade (K_p) das formulações utilizadas no ensaio *in vitro* utilizando membrana da orelha de porco e da pele humana (n = 4, média $\pm$ DP)

Formulações	Orelha de porco			Pele humana		
	QP ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	J ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	K_p (cm h^{-1})	QP ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	J ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	K_p (cm h^{-1})
NE-DDA F1	19,13 $\pm$ 3,14	0,76 $\pm$ 0,18	2,18 $\times 10^{-4}$ $\pm$ 5,23 $\times 10^{-5}$	27,23 $\pm$ 3,81	0,41 $\pm$ 0,11	1,18 $\times 10^{-4}$ $\pm$ 3,11 $\times 10^{-5}$
NE-DDA F10	10,64 $\pm$ 2,02	2,7553 $\pm$ 0,27	1,47 $\times 10^{-4}$ $\pm$ 2,98 $\times 10^{-5}$	6,25 $\pm$ 1,14	0,33 $\pm$ 0,06	3,03 $\times 10^{-4}$ $\pm$ 4,73 $\times 10^{-4}$
Referência	116,50 $\pm$ 16,87	5,66 $\pm$ 0,76	1,63 $\times 10^{-3}$ $\pm$ 2,2 $\times 10^{-4}$	77,47 $\pm$ 6,85	3,88 $\pm$ 0,38	1,11 $\times 10^{-3}$ $\pm$ 1,1 $\times 10^{-4}$
Genérico	57,59 $\pm$ 5,48	2,39 $\pm$ 0,2405	6,88 $\times 10^{-4}$ $\pm$ 6,91 $\times 10^{-5}$	49,94 $\pm$ 9,06	2,14 $\pm$ 0,25	6,14 $\times 10^{-4}$ $\pm$ 7,08 $\times 10^{-5}$

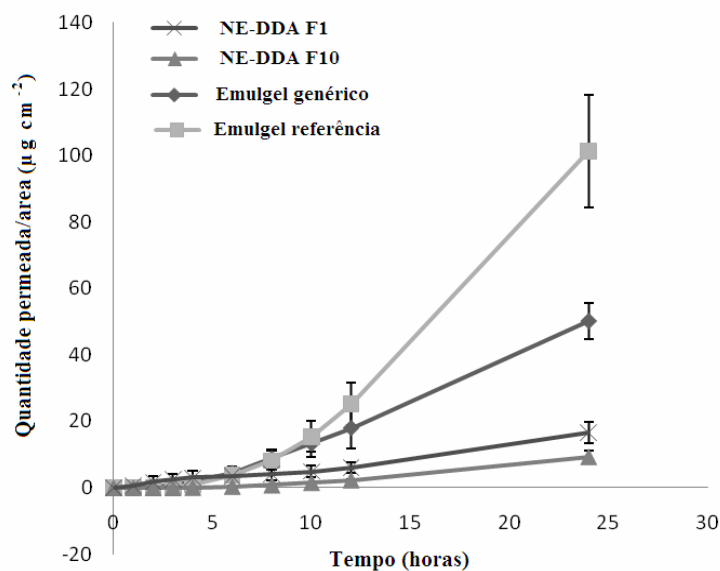


Figura 27. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele da orelha de porco das NE-DDA F1 e F10, referência e genérico.

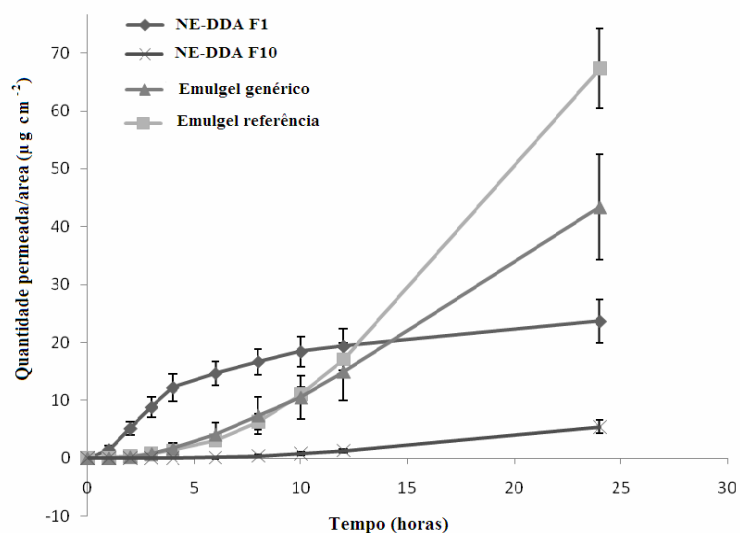


Figura 28. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele humana das NE-DDA F1 e F10 gel, referência e genérico.

A taxa de liberação do DDA, em cinética de permeação, depende significativamente da interação fármaco/veículo e da fração aquosa do sistema (KANTARCI et al., 2007; DJORDJEVIC et al., 2005). Desse modo, observa-se a partir dos dados da Tabela 12 que, tanto nas cinéticas com membrana de orelha de

porco quanto com pele humana, a NE-DDA F1 apresentou uma quantidade permeada maior que a NE-DDA F10 gel, o qual pode ser explicado pela sua maior concentração (50 %) da fração aquosa. Esses resultados indicam uma probabilidade de correlação entre a concentração da fração aquosa com o *QP*, os quais estão em concordância com (KANTARCI et al., 2007; PARSAEE; SARBOLOUKI; PARNIANPOUR, 2002) que observou que o DDA se difunde com maior facilidade em sistemas com elevada concentração de água do que em sistema gelificado como ocorreu com a NE-DDA F10 gel.

Provavelmente, a liberação do DDA da formulação NE-DDA F10 gel, comparada com a NE-DDA F1, foi dificultada pelas combinações moleculares do DDA com a fração aquosa e interface do sistema, o qual causou um incremento da viscosidade formando uma malha gelificada que dificultou sua liberação. Esse resultado está em concordância com DJORDJEVIC et al. (2005) que relata que NE contendo um glicerídeo cáprico caprílico e poligliceril-6 dioleato, associado com miristato de isopropila, podem dificultar a liberação de drogas anfifílicas por ocorrência de interações moleculares.

Para calcular os parâmetros de permeação, em sistemas isotrópicos que apresentam propriedades difusionais em todas as direções como as NE, foi utilizada a primeira lei de Fick, obedecendo ao modelo de dose infinita, cujo gradiente de concentração é constante em consequência da concentração de fármaco do compartimento doador ser constante (AUTON, 2005). Portanto, plotou-se quantidade permeada por área vs tempo, cujas representações gráficas estão descritas nas Figuras 27 e 28. E a partir desta, foi possível calcular o fluxo (*J*) no *steady-state* a partir da porção linear (5 - 24 horas).

Observa-se que houve uma diferença significativa entre as formulações testadas desde as primeiras horas das cinéticas, cujas ordens foram referência > genérico > NE-DDA F1 > NE-DDA F10 gel. Segundo essa ordem, o K_p das NE estudadas foi menor em relação ao medicamento referência e genérico. Esta menor taxa de permeabilidade das NE pode ser atribuída ao fato de que nos emulgeis comerciais são utilizados alcoóis em suas formulações, os quais atuam como promotores de penetração cutânea do DDA, fato que está em concordância com BOMMANNAN et al. (1991) quando relata em seu estudo que produtos tópicos que contém alcoóis em sua formulação, promovem uma alteração no conteúdo lipídico do EC. Segundo BABAR et al. (1991) o etanol é o álcool mais utilizado como promotor de permeação transdérmica, este tem a capacidade de aumentar a permeação dos AINES, a partir de uma formulação emulgel de base hidrofílica. Além disso, o etanol aumenta o número de grupos sulfidril livres da queratina das proteínas do EC, incrementando a permeação de compostos hidrofílicos, enquanto que decresce a dos hidrofóbicos (SUGIBAYASHI et al., 1992).

Outro fator que deve ser levado em consideração para explicar o menor desempenho cinético das NE está relacionado aos fenômenos de interface, ou seja, a atividade de superfície e micelização do DDA afetaram a sua liberação transdérmica. Possivelmente, o DDA formou micelas, o que ocasionou um aumento drástico na sua solubilização, mas o seu coeficiente de partição (K_p) foi diminuído (AUTON, 2005). Então, se a micela não pode cruzar a membrana da pele, este agregado tem pouco efeito no processo de permeação.

Segundo RENOUX (1997) o grau de absorção percutânea está relacionado com o coeficiente de partição (K_p) do fármaco entre o sistema disperso e a camada córnea, onde um coeficiente próximo da unidade indica que a molécula se reparte de

maneira igual entre a camada córnea e a forma farmacêutica, ao passo que se o K_p da molécula for baixo, como é o caso do DDA, que apresenta um $K_p = 0,0708$ entre o miristato de isopropila e a água (DJORDJEVIC et al., 2004), o mesmo apresentará uma afinidade muito forte pelo veículo, difundindo-se mal na camada córnea. Tais fatos relacionados acima justificam o menor desempenho das NE estudadas.

Como as velocidades de liberação, e conseqüentemente de permeação, variam de acordo com as características das formulações, foi observado um aumento no tempo necessário (0 – 5 horas) para que o J das formulações referência, genérico e NE-DDA F10 gel se equilibre (tempo de latência) em relação ao da NE-DDA F1 (Figura 31). Decorrido o tempo de latência, foi possível definir o tipo de cinética de permeação cutânea (SATO et al., 2007; BROUNAUGH, 1999). O tempo de latência pode ser definido como o tempo necessário para que o sistema entre em equilíbrio, o qual é calculado por extrapolação da reta de regressão linear até o eixo do tempo (BEMVINDO, 2006). Os modelos cinéticos de ordem zero para estas formulações apresentaram um coeficiente de correlação ($r > 0,98$), tanto para membranas da orelha de porco como para pele humana, indicando que o J independe da concentração do fármaco. Estes resultados estão em concordância com a literatura (SATO et al., 2007; WESTER; MAIBACH, 1989), confirmando que estes modelos cinéticos são característicos de formulações com doses infinitas. Foi constatado, também, que no perfil de permeação do DDA nas NE, o J permanece contínuo, demonstrando que existe quantidade infinita sendo fornecida à membrana e que a velocidade de cedência do DDA, provavelmente, se mantém constante.

Neste estudo, os valores de J da NE-DDA F1 e da NE-DDA F10 foram, respectivamente, $0,76 \pm 0,18$ e $2,75 \pm 0,27 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para membranas da orelha de porco e $0,41 \pm 0,11$ e $0,33 \pm 0,06 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para pele humana conforme

apresentado na Tabela 12. Esses resultados de J são maiores que os encontrados nas NE descrita por OZGUNEY et al. (2006), mostrando, desta forma, que as NE proposta neste estudo levam a uma resposta terapêutica no tocante a atividade antiinflamatória tópica local, na qual foi confirmada no estudo *in vivo* em modelo animal, através do ensaio da atividade antiedematogênica por edema de pata induzido por carragenina (seção 5.8). Além disso, pode-se presumir que a NE-DDA F1 diminuiu a resistência difusional imposta pelos lipídios do EC o que resultou no aumento de QP do DDA na pele (OZGUNEY, 2006). Esses resultados mostram que os componentes das NE estudadas preencheram as exigências de um veículo adequado à absorção cutânea, isto é, possuíram alta solubilidade e atividade termodinâmica do fármaco após o desenvolvimento da formulação (KREILGAARD, 2002).

Embora a NE-DDA F1 tenha tido um J baixo, a mesma, permeou mais devido ao efeito *burst* nas primeiras horas (0 – 5 horas), principalmente na cinética com pele humana, o que pode se considerado uma vantagem deste sistema, pois o efeito *burst* promove um efeito rápido sobre a inflamação. Neste caso, pode-se presumir que a liberação do DDA do veículo (NE) determinou o passo limitante e a pele funcionou em condições *sink*. Esta observação esta em concordância com a literatura (AUTON, 2005) que relata que quando a difusão dentro do veículo determina o passo limitante da velocidade, o tratamento matemático presume que a pele é um sistema *sink*. Assim, ela mantém a concentração essencialmente zero do material penetrante, permeando-o de forma rápida (*efeito burst*).

A Figura 29 (orelha de porco) e Figura 30 (pele humana) ilustram, de forma isolada, a cinética de permeação da NE-DDA F1 em condição *sink*. Com base em dados da literatura (AUTON, 2005) este tipo de cinética deve ser transformado em quantidade permeada vs raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$), também chamada de

equação de Higuchi, o qual deve gerar uma reta como mostram as Figuras 31 (pele humana) e 32 (orelha de porco). Neste caso, a quantidade de DDA liberada foi proporcional a raiz quadrada do tempo e o J uma função inversa do tempo. GUY & HADGRAFT (1990) baseados em estudo publicado por HIGUCHI (1962), propuseram que o tratamento dos dados de estudos de liberação *in vitro* deveria compreender a adoção de função com base na raiz quadrada do tempo (pontos experimentais dispersos em gráficos de quantidade de fármaco liberada em função da raiz quadrada do tempo).

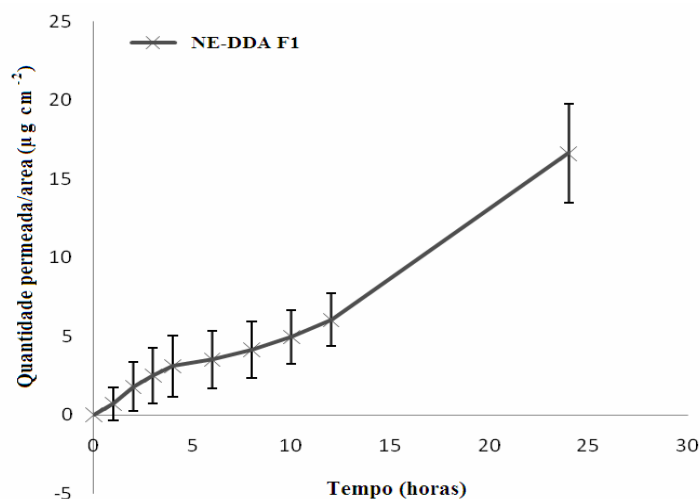


Figura 29. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele da orelha de porco da NE-DDA F1

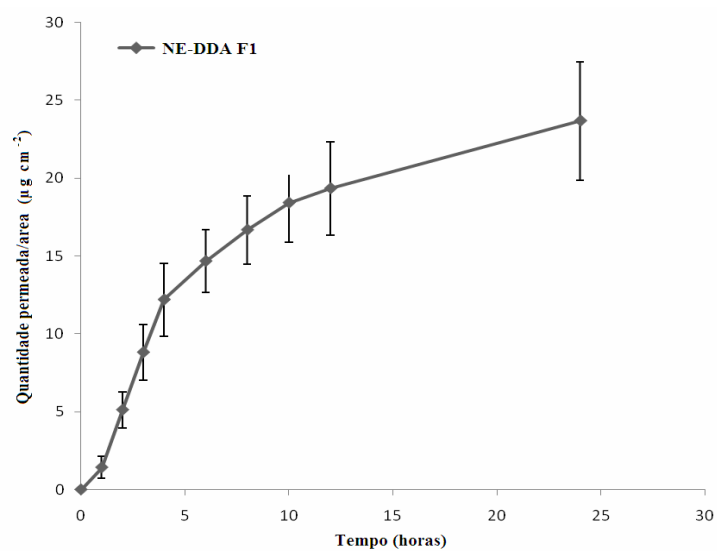


Figura 30. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele humana da NE-DDA F1

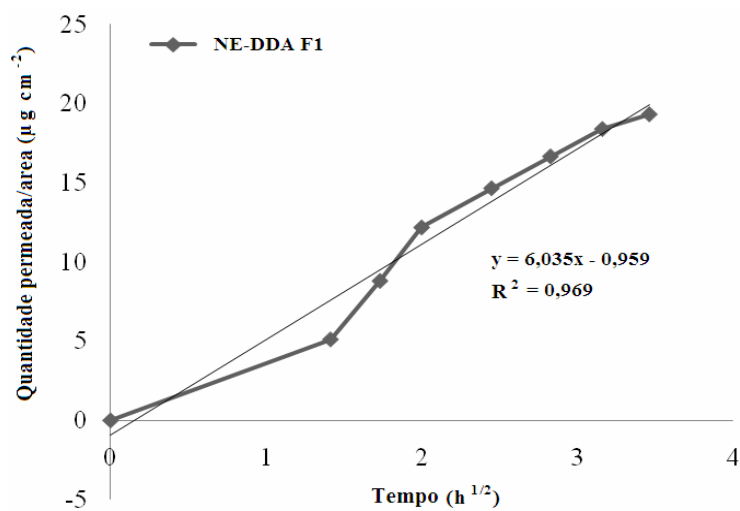


Figura 31. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele humana usando o modelo Higuchi da NE-DDA F1

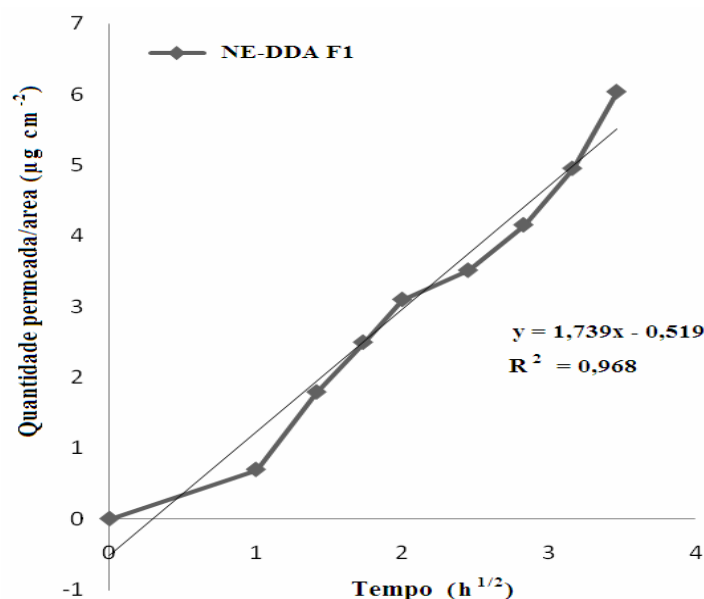


Figura 32. Perfil de permeação cutânea do DDA em pele da orelha de porco usando o modelo Higuchi da NE-DDA F1.

Desse modo, o modelo cinético para a NE-DDA F1 se comportou como cinética de pseudo 1ª ordem (modelo Higuchi) conforme ilustram as Figuras 34 e 35. Este modelo cinético, comum em sistemas dispersos (SATO et al., 2007), determina que o J depende da concentração do fármaco disponível. Assim sendo, verifica-se que ocorreu a confirmação do *efeito burst* do fármaco em contato com a membrana, passando a permear o fármaco em função da raiz quadrada do tempo (CHOW; KAKA; WANG, 1984).

Nos estudos *in vitro* de produtos dermatológicos é importante considerar que as concentrações de fármacos na solução receptora, por si só, não refletem a influência da formulação na atividade do produto (SATO et al., 2007). Assim, a determinação da quantidade de fármaco retido na membrana leva a dados concretos, os quais podem elucidar o grau de atividade tópica do produto (MASINI et al., 1993).

A literatura relata que as NE têm grande capacidade de promover a penetração de drogas através da pele (KREILGAARD, 2002; OZGUNEY, 2006). No entanto, neste estudo, foram encontrados resultados contraditórios, pois tanto a NE-DDA F1 como a NE-DDA F10 gel mostraram uma menor quantidade permeada e menor J que o emulgel referência e o emulgel genérico. Fato este já discutido anteriormente, porém pode-se atribuir, também, a uma diminuição da mobilidade do DDA incorporado e ao baixo coeficiente de partição do DDA ($K_p = 0,0708$), o que se traduziu numa difusão mais lenta e J diminuído do DDA nestes sistemas.

5.7.3. Retenção cutânea do DDA na pele humana e orelha de porco

A Tabela 13 e as Figuras 33 e 34 ilustram o acúmulo de DDA nas camadas da pele de orelha de porco e pele humana após os experimentos de permeação cutânea. Foi observado que a quantidade de fármaco retido no EC das membranas da orelha de porco foi menor do que no EC da pele humana, exceto para o emulgel referência. Por outro lado, a quantidade de fármaco retido na ED das membranas da orelha de porco foram maiores que na ED da pele humana para todas as formulações, o que pode ser explicado pelas diferenças na espessura do EC e pele utilizada no ensaio.

O EC é a principal barreira para prevenir a absorção de substâncias estranhas assim como a perda de água e de substâncias biológicas (LIRA, 2007). Essa barreira é formada pelos corneócitos que são células inativas formadas no estágio final de diferenciação das células da epiderme (BARRY, 2001).

Sabe-se que testes *in vitro* utilizando células de difusão para verificar a absorção cutânea de fármacos são bastantes utilizados, devido à sua simplicidade e possibilidade de uso da pele humana ou outros modelos mais semelhantes (como a

pele da orelha de porco), evitando interações envolvidas no uso do organismo animal como um todo (BRONAUGH; COLLIER, 1993). Além disso, ensaios de penetração cutânea podem ser realizados utilizando a pele dissecada, uma vez que o EC, assumidamente a principal barreira para a penetração/permeação de fármacos na pele, é composto por células já queratinizadas, de modo que a função barreira da pele é mantida mesmo quando da dissecação do tecido (LOPES, 2005). Dentre os modelos de pele animais, a pele de orelha de porco é um modelo bem aceito, devido a facilidade de obtenção e às similaridades das propriedades histológicas, como densidade de folículos pilosos, espessura do estrato córneo e propriedades bioquímicas em relação a pele humana (BRONAUGH; COLLIER, 1993; ZATZ, 1993; MOSER et al., 2001). A utilização da pele de orelha de porco em estudos de permeação tem apresentado, também, resultados comparáveis à pele humana, enquanto peles de camundongos, ratos e cobaias apresentam maior taxa de permeação (MOSER et al., 2001).

Os baixos desvios padrão entre as formulações, tanto para EC como para ED, são indicativos que o método de separação foi uniforme, e o método de quantificação eficiente, além de evidenciar boa homogeneidade entre os tecidos cutâneos seccionados. Baseado nesses resultados pode-se supor que todo o EC foi separado da ED em todos os experimentos. A variabilidade observada é devida, provavelmente, apenas a pequenas diferenças nas espessuras das camadas de cada segmento de pele e a utilização de formulações de composição diferentes conforme pode ser visualizado nas Figuras 33 e 34. Sendo assim, essa variação é esperada, pois se trata de um tecido *ex vivo* (BEMVINDO, 2006).

Tabela 13. Retenção cutânea do DDA nas membranas da orelha de porco e pele humana

	Orelha de porco (μg ; n=4)				Pele humana (μg ; n=4)			
	NE-DDA F1	NE-DDA F10	Referência	Genérico	NE-DDA F1	NE-DDA F10	Referência	Genérico
EC	$0,168 \pm 0,016$	$0,371 \pm 0,046$	$0,12 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,15$	$0,31 \pm 0,06$	$0,65 \pm 0,058$	$7,55 \pm 2,24$	$1,53 \pm 0,11$
ED	$3,43 \pm 0,397$	$2,39 \pm 0,27$	$14,62 \pm 1,84$	$2,90 \pm 0,59$	$0,18 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,098$	$2,72 \pm 0,498$	$1,543 \pm 0,28$
Σ	$3,598 \pm 0,0557$	$2,761 \pm 0,316$	$14,74 \pm 1,85$	$3,73 \pm 0,74$	$0,49 \pm 0,09$	$0,97 \pm 0,156$	$10,22 \pm 2,738$	$3,073 \pm 0,39$

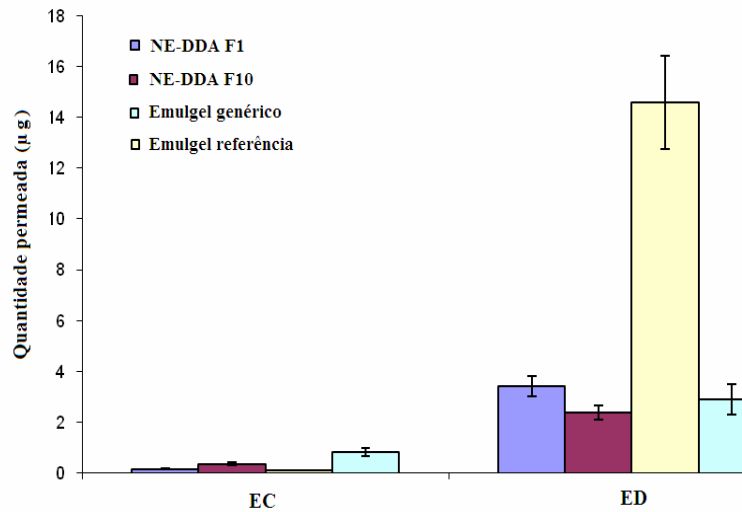


Figura 33. Distribuição do DDA nas camadas da pele de orelha de porco após 24 horas de cinética

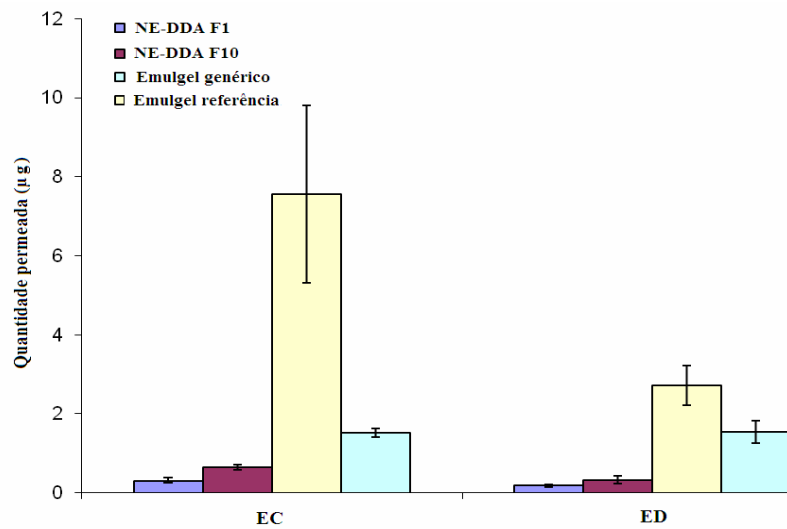


Figura 34. Distribuição do DDA nas camadas da pele humana após 24 horas de cinética

5.8. Avaliação da atividade antiedematogênica

A inflamação é uma resposta complexa do tecido vivo e vascularizado à um estímulo irritante, sendo freqüentemente associado com dor e envolvendo eventos

como retração de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo local, aumento da migração de granulócitos e células mononucleares, assim como proliferação de tecido granulomatoso (ANDRADE et al., 2007).

Inflamação fisiológica ou aguda é uma resposta benéfica do organismo de reparo tecidual, no entanto, o caráter duradouro do processo pode estar relacionado com doenças auto-imunes ou neoplasias (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005). A resposta fisiológica observada no processo inflamatório está relacionada com a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, como aminas biogênicas (histamina e serotonina), cininas (bradicininas), prostanóides (prostaglandinas), citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6), fator de ativação plaquetária (PAF) e substância P (KIM et al., 2007; O'SHEA & MURRAY, 2008; LAPA et al., 2003).

Dentre as diversas metodologias empregadas para pesquisas de novos fármacos em novas formas farmacêuticas, como nas NE, com potencial antiinflamatório, os agentes flogísticos, indutores do processo inflamatório, como carragenina, dextrana e histamina são bastante usadas em triagem farmacológica para avaliação de substâncias com potencial antiinflamatório (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

A carragenina, um polissacarídeo sulfatado de origem vegetal, isolado da alga *Chondrus crispus*, é amplamente utilizado como agente edematogênico (EMIM, 1996). O edema de pata induzido pela administração intraplantar de carragenina é considerado um modelo padrão de inflamação aguda (KALE et al., 2007; LAPA et al., 2003), apresentando característica bifásica: na fase inicial (90-180 min após a indução) observa-se liberação de mediadores como histamina, serotonina, bradicinina; a

segunda fase é mantida pela liberação de prostaglandinas, PAF, substância P, proteases, citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) e lisossomos do tecido inflamado (ORHAN et al., 2007; LAPA et al., 2003), observando-se um pico máximo 3-4h após da injeção do agente flogístico (EMIM, 1996).

A aplicação de um estímulo inflamatório, como a carragenina, produz liberação em cascata de citocinas iniciada pelo TNF- α , que ativa duas vias: uma que é responsável pela indução da ciclooxigenases 1 e 2 e subsequente síntese de eicosanóides via liberação de interleucina 1 β ; a outra que promove a indução da produção de aminas via interleucina-8 e dependendo da intensidade e natureza do estímulo, a liberação de TNF- α é precedida pela formação de bradicinina (RODRIGUES; FRACASSO; SIQUEIRA, 2007; RIBEIRO et al., 2000).

Os AINEs, como o diclofenaco, são fármacos que podem agir em vários passos do processo fisiopatológico, podendo inibir a biossíntese de mediadores pela interação direta com enzimas-chaves, como inibidores da enzima ciclooxigenase, ou reduzindo níveis de substrato (redução da liberação de ácido araquidônico), podendo agir inibindo a liberação de mediadores estocados (por ex. histamina) ou através da imunoestimulação (por ex. maturação de células mielóides ou estimulação de fagocitose), removendo a substância irritante e diminuindo a agressão tecidual (SAFAIHY e SAILER, 1997).

O diclofenaco é um AINEs muito utilizado e bem tolerado pelo organismo em patologias inflamatórias crônicas (ESCRIBANO et al., 2003), sua eficácia em reduzir a dor é resultado da capacidade em inibir as ciclooxigenases 1 e 2, enzimas importantes na síntese de prostaglandinas, que contribuem para a sensibilização do nociceptor

(RODRIGUES; FRACASSO; SIQUEIRA, 2007). O diclofenaco também dessensibiliza os nociceptores, através da estimulação da via NO/GMPc (FERREIRA, 2002).

A Figura 35 mostra os resultados obtidos nos testes de bloqueio da ação edematogênica das NE-DDA F1 e F10, bem como do emulgel referência e as mensurações das patas em diferentes tempos após as aplicações. Observa-se que a resposta inflamatória induzida pelo agente flogístico foi significativamente reduzida tanto para a NE-DDA F1 como para a NE-DDA F10 após o tempo de 2 horas, ou seja, para o grupo tratado com a formulação NE-DDA F1 nos tempos ($t = 180, 240$ e 300 min) e para a NE-DDA F10 nos tempos ($t = 120, 180, 240$ e 300 min).

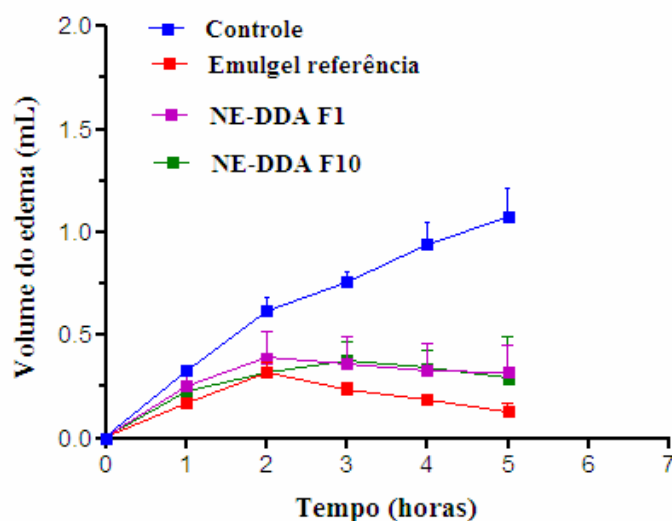


Figura 35. Atividade antiinflamatória das NE-DDA F1, NE-DDA F10 gel e emulgel referência pela técnica edema de pata induzido por carragenina 1%.

O edema de pata induzido por carragenina, o qual é um modelo tradicional e amplamente usado para triagem de drogas com potencial antiinflamatório. Em ratos, esse edema produz nos primeiros 60-90 minutos a liberação de histamina, serotonina, fator de ativação plaquetária, substância P e bradicinina. Em seguida, o edema é

mantido pela liberação de prostaglandinas e óxido nítrico produzidos pelas isoformas induzidas de cicloxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase (iNOS) respectivamente (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971; SEIBERT et al., 1994); observando-se um pico máximo 3-4h após da injeção do agente flogístico (LAPA et al., 2003; EMIM, 1996).

A ação bloqueadora do edema foi mais eficaz no tempo de 4 horas, onde foi observado o pico máximo de formação do edema, cujas inibições do edema foram 35,1 e 37,2 % dos grupos 3 e 4 tratados com NE-DDA F1 e NE-DDA F10, respectivamente, em relação ao grupo controle (controle negativo – grupo 1).

As formulações NE testadas apresentaram perfis farmacológicos de inibição de edema similar ao observado pelo grupo controle positivo (grupo 2 – emulgel referência), cuja inibição da ação edematogênica foi observada durante todo o tempo analisado, com uma redução máxima do edema, após 4 horas, de 79,8 %. De acordo com os resultados, sugere-se que as formulações NE-DDA F1 e NE-DDA F10 apresentaram atividade antiedematogênica efetiva nos diferentes tempos observados. Portanto, os testes indicam que as NE testadas liberam DDA em concentração eficaz para bloquear a ação edematogênica induzido pelo agente flogístico, visto que os resultados estatísticos apresentam ($p < 0,05$) da ação antiedematogênica quando analisadas pelo modelo de edema induzido por carragenina. Esses resultados estão em concordância com a literatura (CORDERO et al., 2001) quando relata que o DDA é um fármaco eficaz na terapêutica antiinflamatória, pois inibe acima de 90 % a ação da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2), fato confirmado, também, por PATEL & LESWELL (1996) que afirmam que uma inibição de 50 % da COX-2 é considerada relevante para

uma ação terapêutica. Portanto, podemos presumir que as NE-DDA testadas foram capazes de inibir a COX-2 em nível terapêutico suficiente para a ação antiedematogênica.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

A discussão dos resultados obtidos permitiu concluir que:

- Foi possível obter sistemas NE líquidos (a/o e o/a) e geis (o/a) utilizando-se o 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;
- A técnica empregada para a determinação do diagrama de fases, destes sistemas, mostrou-se bastante simples e reprodutível, pois foi possível definir com clareza as várias regiões do diagrama, como separação de fases (SF), emulsão líquida branca leitosa (ELBL), emulsão líquida opaca (ELO), emulsão semi-sólida (EMSS), áreas de dispersões opacas (DP) e regiões opticamente transparentes (NE);
- As NE obtidas foram capazes de incorporar praticamente todo o DDA (100 %), por simples solubilização, na concentração estudada, apresentando uma alta taxa de encapsulação;
- Após a incorporação do DDA nas NE os sistemas obtidos apresentaram-se com a mesma limpidez, transparência e isotropia, inclusive nas NE géis, mostrando que o DDA não influenciou a tensão interfacial entre a fase aquosa e a oleosa, não perturbando a estabilidade físico-química dos sistemas pois a característica Winsor IV foi mantida;
- O DDA adicionado aos sistemas migrou efetivamente para a fase dispersa e para interface óleo/água, visto que o volume da fração lipídica, de cada

formulação escolhida, produziu um número de vesículas lipídicas tal que o fármaco incorporado não saturou esta interface;

- A energia empregada na preparação e as proporções de seus componentes (óleo, água, tensoativo e co-tensoativo) foram apropriados para reduzir a tensão interfacial, até certo ponto, e foi capaz de conduzir a formação de um sistema homogêneo, límpido, isotrópico e translúcidos tipo Winsor IV que são característicos de NE;
- O monitoramento da σ permitiu concluir que a curva de condutividade ilustra a existência de três regiões estruturais: NE a/o; NE bicontínua e NE o/a;
- Os sistemas estudados na caracterização se comportaram como fluidos newtoniano tempo-independente, pois mantiveram a viscosidade constante, com a velocidade de cisalhamento aplicada;
- Espectrofotometria UV-VIS mostrou-se uma técnica analítica sensível e adequada para a quantificação do DDA em amostras de NE;
- Os métodos desenvolvidos, por espectrofotometria e por CLAE-UV, apresentaram confiabilidade e segurança necessárias em procedimentos analíticos, pois os parâmetros verificados garantiram a eles rapidez, seletividade, linearidade, reprodutibilidade, robustez e economia, apresentando-se, portanto, validado conforme RE 899/2003 da ANVISA. Portanto, podem ser utilizado para quantificação do DDA em formulações galênicas NE que utilizam o polietilenoglicol-8 cáprico/caprílico glicerídeo (Labrasol®) como tensoativo, o poligliceril 6-dioleato (Plurol oléico®) como co-tensoativo e o miristato de isopropila como fase oleosa;

- Com o estudo de permeação percutânea, utilizando o modelo de células de Franz, foi possível entender os fenômenos cinéticos de ordem zero e de pseudo-primeira ordem (modelo Higuchi);
- Foi possível determinar o *tempo latência* para as formulações NE-DDA F10, referência e genérico e *efeito burst* para a NE-DDA F1;
- Os modelos cinéticos de ordem zero para as formulações NE-DDA F10, referência e genérico indicam que o J independe da concentração do fármaco;
- O J do DDA nas NE permaneceu contínuo, demonstrando que existiu quantidade infinita sendo fornecidas as membranas;
- A NE-DDA F1 permeou mais, em relação a NE-DDA F10, devido o *efeito burst*, então se pode presumir que a liberação do DDA na NE determinou o passo limitante e a pele funcionou em condição *sink*;
- A quantidade liberada do DDA na NE F1 foi proporcional a raiz quadrada do tempo (modelo Higuchi).
- As nanoemulsões desenvolvidas seguem todas as normas de segurança de um produto a ser utilizado pela via transdérmicas, ou seja, apresentam grande estabilidade termodinâmica para o DDA, promovendo alta solubilidade em meio aquoso, além de apresentarem gotículas de tamanho adequado para sistemas transdérmicos de liberação controlada.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M. J. Particle size analysis of concentrated Phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. **APPS PharmSci.**, Arlington , v.2, n.3, E.19, 2000.

ALLEN Jr, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8^a ed., Artmed, Porto Alegre, 775p., 2007.

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 464-471, 2007.

ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers:local versus transdermal activity. **PSSTT**, Amsterdan, v.3, n.1, 2000.

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. **Quimica Nova**. v. 30, n. 6, p. 1484-1490, 2007

AUTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed., Artmed, Porto Alegre, 677p., 2005.

BABAR, A.; CHICKHALE, P. J.; PLAKOGIANNIS, F. M. Assessment of triethanolamine salicylate release from the dermatological base and the commercial products. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 66, p. 322-328, 1991.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, p. 211-217, 2005.

BAKER, R. C.; FLORENCE, A. T. Investigations into the Formation and Characterization of Microemulsions .1. Phase-Diagrams of the Ternary-System Water

Sodium Alkyl Benzene Sulfonate Hexanol and the Quaternary System Water Xylene Sodium Alkyl Benzene Sulfonate Hexanol. **Journal Colloid Interface Sciences**, v. 100, n. 2, p. 311-33, 1984.

BARRY, B. W. **Dermatological Formulations: Percutaneous Absorptions**, New York: Marcel Dekker, v. 18, n. 1, p. 1- 48, 1983.

BARRY, B. Beaching the skin's barrier to drugs. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, p.165-167, 2004.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 14, p. 101-114, 2001.

BEMVINDO, C. S. **Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais**. 2006. 110f. Dissertação de Mestrado. Departamento de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BERBENNI, V. et al. Thermoanalytical and spectroscopic characterization of solid-state retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 221, p. 123-141, 2001.

BERROZPE, J. D.; LANAO, J. M.; DELFINA, J. M. P. **Biofarmacia y Farmacocinética**. v. II, Editorial Sintesis, Madrid, 591p., 1998.

BHARGAVA, H. N.; NARURKAR, A.; LIEB, L. M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharmaceutical Technology**, Duluth, v. 3, p. 46-54, 1987.

BRASIL (2003). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília DF: ANVISA ANVISA. **RE n. 899 de 29 de Maio de 2003.**

BOMMANNAN, D.; POTTS, R. O.; GUY, R. H.; Examination of the effect of ethanol on human stratum corneum in vivo using infrared spectroscopy. **Journal Controlled Release**, v. 16, p. 299-304, 1991.

BRONAUGH, R.; COLLIER, S. *In vitro* methods for measuring skin permeation. IN: Zatz, J. **Skin Permeation**. Wheaton: Allured Publishing Corp., p. 93-112, 1993.

BRONAUGH, R. L.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous absorption: Drugs – cosmetics – mechanisms – methodology**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, v. 97, 955p, 1999.

BUMAJDAD, A.; EASTOE, J. Conductivity of water in oil microemulsions stabilized by mixed surfactants. **Journal Colloids Interface Sciences**, v. 274, n. 1, p. 268-76, 2004.

CANDAU, F.; PABON, M. Polymerizable microemulsions: some criteria to achieve an optimal formulation. **Colloids and Surfaces**, v. 153, n.1-3, p. 47-59, 1999.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos, 2001

CERA, L. F. R. **Estudo da interação do diclofenaco sódico com microemulsões lipídicas: Formulação e liberação in vitro**. 2001. 145f. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, São Paulo.

CORDERO, J. A.; CAMACHO, M.; OBACH, R.; DOMENECH, J.; VILA, L. In vitro based index of topical anti-inflammatory activity to compare a series of NSAIDs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 51, p. 135-142, 2001.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discution. **Journal Chromatography B Biomedical Science Applied**, Amsterdam, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHEN, H.; CHANG, X. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. **Journal of Controlled release**, v. 98, p. 427-436, 2004.

CHOW, D. S. L.; KAKA, I.; WANG, T. I. Concentration-dependent enhancement of 1-dodecylazacycloheptan-2-one, on the percutaneous penetration kinetics of triamcinolone acetonde. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 73, n. 12, p. 1794-1799, 1984.

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

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R. Quality of measurements in analytical chemistry study of case: Cadmium determination by flame atomic absorption spectrophotometry. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 374-380, 2001

CONSTANTINIDES, P. P.; LANCASTER, C. M. Enhanced intestinal absorption of an RGD peptide from water-in-oil microemulsions of different composition and particle size. **Journal of Controlled Release**, Arlington, v. 34, p.109-116, 1995.

CONSTANTINIDES, P. P.; SCALART, J. P. Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long- versus medium-chain glycerides. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158, n. 1, p. 57-68, 1997

CRUZ, D. J. O.; UCKUM, M. F. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v. 64, p. 113-123, 2001

DAMASCENO, B. P. G. L. **Estudo do comportamento físico-químico e farmacotológico da anfotericina B em microemulsões do tipo O/A**. 2005. 70f.

Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte.

DELGADO-CHARRO, M. B.; IGLESIAS VILAS, G. et al. Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. **European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v. 43, n. 1, p. 37-42, 1997.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carragenin and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M.; KRAJISNIK, D. Characterization of caprylocaproyl macroglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 271, n. 1-2, p. 11-19, 2004.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M. In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macroglycerides based microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, n. 1-2, p. 73-79, 2005

DREHER, F.; WALDE, P.; WEHRLI, E. Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport. **Journal of Controlled Release**, v. 45, n. 2, p. 131-140, 1997.

EMIM, J. A. S. **Atividades farmacológicas de um inibidor seletivo da calcineurina tecidual em processos nociceptivos e antiinflamatórios de camundongos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1996.

ELIAS, P. M. Epidermal barrier function: intercellular epidermal lipid structures, origin, composition and metabolism. **Journal of controlled release**, v. 15, p.199-208, 1991.

ESCRIBANO, E.; CALPENA, A. C.; QUERALT, J.; OBACH, R.; DOMENECH, J. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 203-210, 2003

ESPOSITO, E.; BORTOLOTTI, F.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R. Amphiphilic association systems for amphotericin B delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 260, p. 249-260, 2003.

FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. **International Journal of Clinical Practice**. v. 128, p. 2-10, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV. São Paulo, Andrei editora, 2003.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-químicos em Farmácia**. São Paulo – SP, 2003.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **PSTT**, Amsterdam, v.3, p.12, 2000.

FONSECA, S. G. C.; SILVA, L. B. L.; REBECA, F. C; SANTANA, D. P. Validation of the analytical methodology for evaluation of lapachol in solution by HPLC. **Química Nova**, v. 27, n.1, p. 157-159, 2004

FORMARIZ, T. P. **Incorporação da doxorrubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa in vitro através de culturas de células**. 2004. 199f. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA-JUNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsão e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p.301-313, 2005

FORMARIZ, T. P.; SARMENTO, V. H. V.; SILVA-JUNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; SANTILLI, C. V.; OLIVEIRA, A. G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 51, p. 54-61, 2006.

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

FRIBERG, S. E. Micelles, microemulsions, liquid crystals, and the structure of stratum corneum lipids. **Journal Society Cosmetic Chemists**, v. 41, p. 155-171, 1990.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558-566, 2004.

GARTI, N.; ASERIN, A. Pharmaceutical emulsions, double emulsion and microemulsion. In: _____. **Drug and the pharmaceutical science**, New York: Marcel Dekker, 1996. v. 73, cap.15, p.412-519.

GASCO, M. R.; GALLARATE, M.; PATTARINO, F. In vitro permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 10, p. 193-196, 1991.

GRASSI, M.; COCEANI, N.; MAGAROTTO, L. Mathematical modeling of drug release from microemulsions: theory in comparison with experiments. **Journal Colloids Interface Science**, v. 228, p. 141-150, 2000.

GRIFFIN, W. C. Classification of Surface-active Agents by "HLB". **Journal of the SCC**, p. 311-326, 1949.

GUY, R. H.; HADGRAFT, J. On the determination of drug release rates from topical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 60, p. R1-R3, 1990.

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

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal Pharmaceutical Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 58, p. 291-299, 2004.

HARDING, C. R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatologic Therapy**, Copenhagen, v.17, p.6-15, 2004.

HELLWEG, T. Phase structures of microemulsion. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, p. 50-56, 2002.

HIGUCHI, W. I. Analysis of data of the medicament release from ointments. **Journal Pharmaceutics Sciences**, v. 51, p. 802-804, 1962.

HO, H. O.; HSIAO, C. C. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. **Journal Pharmaceutics Sciences**, v. 85, n. 2, p. 138-143, 1996.

International Conference on Harmonisation (ICH); **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, Q2 (R1), 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 301-312.

JURKOVIC, P.; GASPERLIN, M. Microemulsion as dermal drug delivery systems. **Farmaceutski Vestnik**, v. 55, p. 565-571, 2004

KAHLWEIT, M.; STREY, R. How to Study Microemulsions. **Journal Colloid Interface Sciences**. v.118, n. 2, p. 436-453, 1987.

KALE, M.; MISAR, A. V.; DAVE, V.; JOSHI, M.; MUJUNDAR, A. M. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 300-304, 2007.

KANTARCI, G.; OZGUNEY, I.; KARASULU, Y.; ARZIK, S.; GUNERI, T. Comparison of different water/oil microemulsion containing diclofenac sodium: preparation, characterization, release rate and skin irritation studies. **AAPS PharmSciTech**. v. 8, n. 4. E1-E7, 2007.

KARANDE, P.; JAIN, A.; MITRAGOTRI, S. Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, p.192-197, 2004.

KAWAKAMI, K., et al. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs - I. Prescription design. **Journal Controlled Release**, v. 81, n.1-2, p. 65-74, 2002.

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. **Journal Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 489-507, 2005.

KIM, Y.; SO, H. S.; YOUN, M. J.; KIM, H. J.; WOO, W. H.; SHIN, S. H.; LEE, I.; MOON, B. S.; CHO, K. H.; PARK, R. Anti-inflammatory effect of Sasim extracts in PHA-stimulated THP-1 and peripheral blood mononuclear cells from cerebral infarction patients. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 32-39, 2007.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S77-S98, 2002

KRIWET, K.; MULLERGOYMANN, C. C. Binary diclofenac diethylamine water-systems – Micelles, vesicles and lyotropic liquid-crystals. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 39, n. 6, p. 234-238, 1993

KRIWET, K.; MULLERGOYMANN, C. C. Diclofenac Release from Phospholipid Drug Systems and Permeation through Excised Human Stratum-Corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v.125, n. 2, p. 231-242. 1995

LACAVA, Z. G. M. Aplicação biomédicas das nanopartículas magnéticas. IN: DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. Artliber Editora, São Paulo, 2006, 207p.

LANGEVIN, D. Microemulsions. **Accounts of Chemical Research**. v. 21, n. 7, p. 255-260, 1988.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. **Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais**, p.5-9, 2003.

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

LEUNG, R.; SHA, D. O. Microemulsions: an evolving technology for pharmaceutical applications. **Controlled Release of Drugs**, V. Publishers, New York. v. 1, p. 185-216, 1989.

LINDMAN, B.; FRIEBERG, S. E. Microemulsions - A historical overview. **Handbook of microemulsion science and technology**, M. Dekker, New York: p. 1-12, 1999.

LIN, T. J. Microemulsions and application of solubilization in cosmetics. **Topical drug delivery formulations**, M. Dekker, New York, p. 29-53, 1990.

LIRA, A. A. M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele**. 2007. 142f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIRA, A. A. M.; SESTER, E. A.; CARVALHO, A. L. M.; STRATTMANN, R. R.; ALBUQUERQUE, M. M.; WANDERLEY, A. G.; SANTANA, D. P. Development of lapachol formulation: anti-inflammatory study of a selected formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 163-168, 2008.

LOPES, L. B. **Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídeos: avaliação in vitro e in vivo de sistemas de liberação de moléculas carreadoras**. 2005. 179f. Tese de Doutorado. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

LUNDBERG, B. B.; MORTIMER, B. C. Submicron lipid emulsions containing amphipathic polyethylene glycol for use as drug-carriers with prolonged circulation time.

International Journal of Pharmaceutics, v. 134, p.119-127, 1996

MACEDO, J. P. F. **Uso de diagramas ternários e HLB como ferramenta de previsão da estabilidade de sistemas emulsionados**. 2005. 72f. Dissertação de Mestrado.

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte.

MACEDO, J. P. F.; FERNANDES, L. L.; FORMIGA, F. R.; REIS, M. F.; NAGASHIMA, T.; SOARES, L. A. L. J.; EGITO, E. S. T. Micro-emultocrit technique: A valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. **AAPS PharmSciTech**. v. 7, p. E1-E7, 2006.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin: "La Raison d'être" of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 121, p. 231-241, 2003.

MASINI, V.; BONTE, F.; MEYBECK, A.; WEPIERRE, J. Cutaneous bioavailability on hairless rats of tretinoin in liposomes or gel. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 82, n. 1, p. 17-21, 1993.

MAGNETTE, J. L.; KIENZLER, J. L.; SALLIN, D. Diclofenac systemic exposure is not increased when topical diclofenac is applied to ultraviolet-induced erythema. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 60, p. 591-594, 2004.

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

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.54, p. S3-S-17, 2002.

MENDONÇA, C. R. B.; BICA, C. I. D.; PIATNICKI, C. M. S. Water in soybean oil microemulsions as medium for electrochemical measurements. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 14, n. 4, p.628-636, 2003

MORAES, S. L.; REZENDE, M. O. O. Determination of the critical micelle concentration of humic acids by spectroscopy and conductimetric measurements. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.701-705, 2004

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA,Y. N.; GUY,R. H. Passive Skin Penetration Enhancement and its Quantification In Vitro. **European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 52, p. 103-112, 2001.

MULLER, C. R.; HAAS, S. E. Degradation and stabilization of diclofenac in polymeric nanocapsules. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 555-560, 2004.

NUNES, R. S.; SENNA, B. A. A.; SILVA, J. A.; SANTANA, D. P. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de Lippia sidoides Cham por CLAE. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.86, n. 3, p. 87-91, 2005.

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. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Microemulsão I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma**, v. 13, p. 73-79, 2001.

ORHAN, D. D.; HARTEVIOGLU, A.; KUPELI, E.; YESILADA, E. *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. Fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 394 - 400, 2007.

ORTHABER, D.; GLATTER, O. Synthetic phospholipid analogs: a structural investigation with scattering methods. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 107, p. 179-189, 2000.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. **Immunity Review**, v. 28, p. 477-487, 2008.

OSBORNE, D. W.; WARD, A. J. Surfactant association colloids as topical drug delivery vehicles. **Topical drug delivery formulations**, M. Dekker, New York. p. 349-377, 1990.

OZGUNEY, I. S.; KARASULU, H. Y.; KANTARCI, G.; SOZER, S.; GUNERI, T.; EERTAN, G. Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from various formulations. **AAPS PharmSciTech**. v. 7, n. 4, p. E1-E7, 2006.

PANIGRAHI, L.; PATTNAIK, S.; GHOSAL, S. K. The effect of pH and organic ester penetration enhancers on skin permeation kinetics of terbutaline sulfate from pseudolatex-type transdermal delivery system through mouse and human cadaver skins. **AAPS PharmSciTech**. v. 6, p. E167-E173, 2005.

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. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 244, n. 1-2, p. 21-31, 2002

PARK, M. K.; LEE, K. M. Phospholipid-based microemulsions of flubiprofen by the spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, p. 145-154, 1999.

PARSAEE, S.; SARBOLOUKI, M. N.; PARNIANPOUR, M. *In vitro* release of diclofenac diethylammonium from lipid-based formulations. **International Journal Pharmaceutics**, v. 241, p. 185-190, 2002.

PAPARELLA, S.; VALLEY, H. Transdermal patches: an unseen risk harm. **Journal of Emergency Nursing**, v. 3, p. 278-281, 2005.

PATEL, R. K.; LESWELL, P. F. Comparison of ketoprofen, piroxicam and diclofenac gels in the treatment of acute soft-tissue injury in general practice. **Clinical Therapeutics**. v. 18, p. 497-507, 1996.

PRAUSNITZ, M. R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Reviews**, New York, v.3, p.115-124, 2004.

REICHLING, J.; LANDVATTER, U.; WAGNER, H.; KOSTKA, K. H.; SCHAEFER, U. F. In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.64, p. 222-228, 2006.

RENOUX, R.; AIACHE, J. M.; AIACHE, S. Disponibilização dos princípios activos no organismo, a partir de formas farmacêuticas destinadas a outras vias de administração: A via cutânea. IN: LEBLANC, P. P.; AIACHE, J. M.; BESNER, J. G.; BURI, P.; LESNE, M. **Tratado de Biofarmácia e Farmacocinética**. Editora: Instituto Piaget, 1997, 419p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**. v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; FERREIRA, S. H. CUNHA, F. Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **European Journal Pharmacology**, v. 391, n.1/2, p. 97-103, 2000.

RODRIGUES, L. A. G. Variability in risk gastrointestinal complications with different nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American Journal of Medicine**. v. 104, n. 3A, p. 30S-34S, 1998.

RODRIGUES, L. A.; FRACASSO, J. F.; SIQUEIRA, C. E. Potencialização do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do diclofenaco e da nimesulida por vitaminas do complexo B. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v. 28, n.1, p. 45-49, 2007.

ROSSETI, F. C. **Microemulsões como sistema de liberação cutânea para zinco ftalocianina tetrassulfonada na terapia fotodinâmica do câncer de pele**. 2006. 104f. Dissertação de Mestrado. Departamento Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

SAFAIHY, H., SAILER, E. R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Medica**, v.63, 487-493, 1997.

SATO, M. E. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

SATO, K.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 80, p. 104-107, 1991.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. **Iniciação à Química Cosmética**, v. 2, Tecnopress, São Paulo, 105p, 2002.

SCHULMAN, J. H.; ROBERTS, T. S. **Microemulsions**. New York, Trans. Faraday Soc. 1982.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 91, p.12013-17, 1994.

SHAH, V. P.; ELKINS, J.; SKELLY, J. P. Relationship between *in vivo* skin blanching and *in vitro* release rate for betamethasone valerate creams. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 81, n. 1, p. 104-106, 1992.

SHAH, V. P.; MAIBACH, H. I. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum Press, 453p, 2003.

SHAH, D. O. **Micelles, microemulsions and monolayers**. New York, 1998.

SILVA, F. C. F. **Padronização de métodos analíticos para a determinação de filtros solares em emulsões**. 2000. 121f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, H. S. R. C. **Estudo de sistema microemulsionados para aplicação na extração e formulação de própolis**. 2001. 116f. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte.

SIMONSEN, L.; PETERSEN, M. B.; GROTH, L. In vivo skin penetration of salicylic compounds in hairless rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, p. 95-104, 2002.

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **Journal Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 173-183, 2004

SINTOV, A. C.; BOTNER, S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n.1-2, p. 55-62, 2006

SPICLIN, P.; HOMAR, M.; VALANT, A. Z.; GASPERLIN, M. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 256, p. 65-73, 2003.

STREY, R. Microemulsion microstructure. **Euro Cosmetics**, v.10, p. 39-46,1996

SUGIBAYASHI, K.; NAKAYAMA, S.; SEKI, T.; HOSOYA, K.; MARIMOTO, Y. Mechanism of skin penetration enhancing effect by laurocapram. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 81, p. 58-63, 1992.

TAHA, M. O.; AL-GHAZAWI, M.; ABU-AMARA, H.; KHALIL, E. Development of quantitative structure-property relationship models for pseudoternary microemulsions formulated with nonionic surfactants and cosurfactants: application of data mining and molecular modeling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 5, p. 461- 478, 2002.

TENJARLA, S. Microemulsion: an overview and pharmaceutical applications. **Critical Reviews Therapeutics Drug Carrier Systms**, boca Raton. v. 16, p. 461-521, 1999.

TROTA, M.; GASCO, M. R.; Transcutaneous diffusion of hematoporphyrin in photodynamic therapy: in vitro release from microemulsion. **STP Pharmaceutics Science**, v. 4, p. 150-154, 1994.

TROTA, M. Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. **Journal Controlled Release**. v. 60, p. 399-405, 1999

TOMA, H. E. Interface e organização da pesquisa no Brasil: da química à nanotecnologia. **Química Nova**. v. 28, p. S48-S51, 2005.

USP XXIII (United States Pharmacopeial Convention. Rockille MD). 1995.

VERISSIMO, L. M. **Desenvolvimento de sistemas farmacêuticos emulsionados para veiculação gênica**. 2007. 56f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação da Genética e Biologia e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN.

WARR, G. G. Shear and elongational rheology of ternary microemulsions. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 103, p. 273-279, 1995.

WASCHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 20, p. 131-145, 1996.

WESTER, R. C.; MAIBACH, H. I. *In vitro* testing of topical pharmaceutical formulations. IN: BRONAUGH, R. L.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous absorption: mechanisms, methodology, drug delivery**. New York: Marcel Dekker, p. 653-659, 1989.

WIACEK, A. E.; CHIBOWSKI, E. Zeta potential and droplet size of n-tetradecane/ethanol (protein) emulsion. **Colloid and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 25, p. 55-67, 2002.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Skin absorption enhancers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Boca Raton, v.79, n.2, p.305-353, 1992.

WINSOR, P. A. Hydrotropy, Solubilisation and Related Emulsification Processes. Part 1. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, n. 6, p. 376-398, 1948.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rats as an assay of anti-inflammatory drugs. **Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine**, v.3, p.544-7, 1962.

WU, H. L.; RAMACHANDRAN, C. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, n.1-2, p. 63-75, 2001.

8. Anexos



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 333/2007 - CEP/CCS

Recife, 09 de novembro de 2007

Registro do SISNEP FR – 156797

CAAE – 0331.0.172.000-07

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 333/07

Titulo: “Estudo de permeação cutânea de microemulsões tópicas de diclofenaco de dietilamônio em pele humana.”

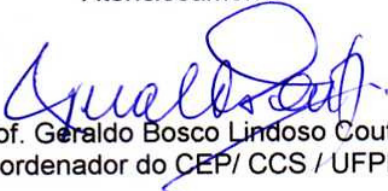
Pesquisador Responsável: José Alexsandro da Silva

Senhor Pesquisador:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 07 de novembro de 2007.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório ao final da pesquisa (31/01/2008)

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

Ao
Doutorando José Alexsandro da Silva
Dep. de Ciências Farmacêutica – CCS/UFPE

ANEXO II

***ARTIGO COMPLETO ACEITO EM PERIÓDICO (Journal Dispersion Science
Technology – n 30, vol 8, 2009)***



FEDERAL UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO NORTE
HEALTH SCIENCES CENTER
DEPARTMENT OF PHARMACY
LABORATORY OF DISPERSED SYSTEMS

Natal, 04/17/2008.

Prof. Johan Sjoblom, Ph.D.,
Editor of the *Journal of Dispersion Science Technology*

Dear Prof. Sjoblom:

I would like you to consider the enclosed manuscript for publication in the *Journal of Dispersion Science Technology*:

“Physicochemical characterization and development of a microemulsion system for transdermal use”, by José A. Silva^{1,2}, Danilo C. G. Bedor¹, Bolívar P. G. L. Damasceno^{3, 4}, Anselmo G. Oliveira⁵, E. Sócrates T. Egito^{4, *} and Davi P. Santana.

All authors agree that the contents of the manuscript are the original work of the authors and will not be copyrighted, submitted, or published elsewhere (including the Internet), in any language, while acceptance by the *Journal of Dispersion Science Technology* is under consideration.

Sincerely,

E. Sócrates T. Egito*,
Associate Professor of Pharmaceutics
Department of Pharmacy
Federal University of Rio Grande do Norte
Rua Praia de Areia Branca, 8948
Natal-RN, 59094-450, Brazil
e-mail: socrates@digi.com.br

Physicochemical characterization and development of a microemulsion system for transdermal use.

*José A. Silva^{1,2}, Danilo C. G. Bedor¹, Bolívar P. G. L. Damasceno^{3, 4}, Anselmo G. Oliveira⁵, E. Sócrates T. Egito^{4, *} and Davi P. Santana¹*

¹Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Ciências Farmacêuticas - Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) – Recife/PE, Brazil.

²Universidade Estadual da Paraíba – Departamento de Farmácia - Campina Grande/PB, Brazil.

³Universidade Estadual da Paraíba – Centro de Ciências Biológicas e Sociais e Aplicadas – João Pessoa/PB, Brazil.

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Departamento de Farmácia – Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID) – Natal/RN, Brazil.

⁵Universidade Estadual Paulista – Departamento de Fármacos e Medicamentos – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Araraquara/SP, Brazil.

Running Title: **Microemulsion system for transdermal use**

* Correspondence should be addressed to Dr. E. Sócrates Tabosa do Egito

UFRN – CCS – Departamento de Farmácia (DFAR) – Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID)

Rua Praia de Areia Branca, 8948

59094-450

Phone: (55 84) 3215 43 55

Fax: (55 84) 3215 4355

e-mail: socrates@ufrnet.br or socrates@digi.com.br

ABSTRACT

A microemulsion (ME) carrier system containing diclofenac diethylamine (DDA) was developed and physicochemically characterized. In addition, a methodology for analytical determination of DDA by UV-Vis spectrophotometry was validated. The methodology used to produce the ME was simple and reliable, producing a stable ME system with a high DDA entrapment efficiency of 89.6 ± 14.19 %. The ME system presents a mean droplet size, conductivity, pH, refractive index and viscosity of around 50 nm, $300 \mu\text{S cm}^{-1}$, 7.0, 1.399, and 110 mPa, respectively. Furthermore, the analytical method developed to evaluate the DDA content was validated and used to quantify DDA in the ME formulations.

Key words: Microemulsion, spectrophotometry, validation, stability, diclofenac diethylamine, pseudo-ternary phase-diagram.

INTRODUCTION

Nanotechnology appears to be a notable challenge for pharmaceutical science mainly because the pharmacist is used to dealing with the pharmaceutical technology in a condensed way, expressing properties in micrometric or millimetric terms, leaving the nanometric world behind. Nanoscience has been tremendously pushing knowledge innovation and evolution, being present in almost all of the current scientific journals. This change has already been assimilated by the universal scientific culture, and now it has spread throughout the pharmaceutical science by the approach of new drug delivery and properties at the nanometric scale ⁽¹⁾.

Microemulsions (MEs), a good example of nanotechnologic therapeutic system, are defined as an optically isotropic, transparent, and thermodynamically stable mixture of oil and water, stabilized by a film of surfactant and frequently combined with a co-surfactant. Because of their properties, especially the ability to carry lipophilic and hydrophilic drugs into their lipophilic and hydrophilic phases, respectively; and amphiphilic drugs into their oil/water interface, they present a large potential as a drug delivery system ^(2, 3).

Diclofenac diethylamine (DDA), a non-steroidal anti-inflammatory drug, is able to form micelles and lyotropic liquid crystals in water ⁽⁴⁾. Besides, it interacts with the phospholipids of the skin and contributes to the increase of fluidity through the *stratum corneum*, thereby increasing the cutaneous permeability ⁽⁵⁾. DDA presents hepatic metabolism, a short life span, and a low partition coefficient. Yet, it does not metabolize on the skin and does not induce tolerance ^(5, 6). The widely known pharmaceutical dosage form to carry DDA for transdermal use is a hydrophilic emulsion gel named Voltarol Emulgel™. Such medicine contains a moisturizer, propylene glycol, and ethanol or isopropyl alcohol, which acts as an enhancer absorption agent and could induce skin irritation. Additionally, when diffused in conventional pharmaceutical

dosage forms, like Emulgel™, DDA usually cannot achieve a remarkable concentration on the target organism tissue due to the fact that between the application spot and the place where it must have its pharmacological effect are a number of biological barriers^(4, 7). This justifies its use in the ME formulation. The aims of this work were to develop and to characterize a transdermal DDA loading ME using a pseudo-ternary phase diagram as a tool to identify the regions of MEs, and to develop and to validate an analytical methodology to assess the amount of DDA into a ME.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DDA (Nortec Química, Brazil); polyethyleneglycol-8 caprylic/capric glycerides (Labrasol[®], HLB = 16.0) and polyglyceryl-6 dioleate (Plurol Oleique[®], HLB = 4.0) were kindly gifted from Gattefosse (Lyon, France). Isopropyl myristate was supplied by Volp (Brazil). Water was purified using the Millipore Milli-Q[®] Water System (Millipore Corporation – USA).

Methods

Construction of phase diagrams

Phase diagrams were built by visual inspection of the surfactant (S) and cosurfactant (CS) admixtures [polyethyleneglycol-8 caprylic/capric glycerides (S) and polyglyceryl-6 dioleate (CS)] at the proportion of 4:1; 3:1; 2:1 and 1:1; to this S/CS admixture, isopropyl myristate (oil phase) was added in the proportions from 1:9 to 9:1, respectively. The ultrapure water type Milli-Q was titrated with an automatic pipette at ambient temperature, and the system was stirred with a magnetic shaker for 3 minutes. The transition from separated phase to optically clear microemulsion was seen and analyzed by naked eye against a black background^(2, 8-13). Each experimental assay was performed in duplicate.

Formulation selection

After the construction of the phase diagram, 14 ME formulations (F1 to F14-Table 1) were obtained from a certain region of these pseudo-ternary diagrams. The DDA was incorporated into the MEs at the concentration of 1% w/v. The MEs were prepared at the ambient temperature 48 hours before the incorporation of the DDA for system equilibrium ⁽¹⁴⁾.

Microemulsion characterization

DDA analytical determination in the MEs

For the DDA dosage into the MEs, a stock solution containing 1000 µg/mL of DDA in methanol was prepared. From this stock solution, dilutions with methanol to obtain a standard 20 µg/mL DDA solution were made. The DDA-ME samples were also diluted with methanol to a nominal concentration of 20 µg/mL of DDA. The spectral analyses were performed at 282 nm, according to the protocol adopted for the development and validation of this analytical methodology (See Validation Parameters for blank and DDA-loaded ME Section below).

DDA entrapment efficiency for the MEs

The entrapment efficiency was assessed after centrifugation ($11000\text{ g} \approx 14000\text{ rpm}$) of 1 mL of each formulation for 30 minutes. The aim of this procedure was not to settle ME droplets, but to settle both metastable systems and DDA crystals not incorporated in the ME droplets. At the end of the centrifugation cycle, 50 µL of the supernatant were carefully extracted and diluted in 24950 µL of methanol. The entrapment percentage was determined from the Equation 1.

$$EE = Abs_{sup} / Abs_{bulk} \times 100 \quad (1)$$

Where EE was the entrapment efficiency, and Abs_{sup}/Abs_{bulk} was the DDA absorbance on the supernatant (sup) and the plain ME (bulk), respectively.

Conductivity measurements

Electrical conductivity (σ) of the formulation was measured using a conductometer (Model Cambo HI 98129, Hanna, Brazil). The equipment was calibrated with a calibration solution of specific conductance ($1413 \mu\text{S}/\text{cm}$) at 25°C . Each experimental assay was performed in triplicate, and the results were presented as mean $\pm$ SD (standard deviation).

Rheological measurements

The rheological properties of the blank and the DDA-loaded MEs were determined using a controlled-stress (model Brookfield, Rheology International, Germany) with cone-plate geometry. The experiments were performed with a shear rate (γ) in the range of 0-100 $1/\text{s}$. The used shear rate regions were selected due to the resisting abilities against the applied stresses. The rheological measurements ($n=3$) were performed for both, up- and down-curves⁽¹⁵⁾.

pH evaluation

The pH values of the samples were measured ($n=3$) at $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, in a pre-calibrated pH meter (model Checker, Hanna Instruments, Vila do Conde, Portugal). The electrode was placed directly into the formulation stored into scintillation flasks (15 mL).

Refractive index (RI) measurements

The RI, which was used to evaluate the transparency of ME and to compare the systems with and without DDA, was determined ($n=3$) using an Abbé Carl Zeiss-Jena, which was previously calibrated. 100 μL of blank and DDA-loaded ME were placed on the refractometer prism and its RI was carried out always at $25^\circ \pm 1^\circ \text{C}$.

Macroscopic appearance

The color of the MEs, as well as their stability variation (presence of creaming, coalescence, or phase separation), was verified by naked eye.

Particle size evaluation

The particle size analysis was performed using a photon correlation spectroscopy apparatus (Brookhaven Instruments Corporation, Model EMI 9863). Prior to analysis, the samples were diluted with ultra-pure Milli-Q water and filtered (0.22 μm). The size measurements were carried out at a fixed angle of 90° . The correlator was operated in parallel mode and the cumulant method of analysis was used to calculate the mean droplet size according to the intensity of scattered light (Z-average diameter). The results are the mean and SD of the least of 10 measurements of the samples ⁽¹⁵⁾. The measurements were performed at $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

Validation parameters for blank and DDA-loaded ME

Selectivity or specificity

The selectivity was determined comparing the spectrophotometric analyses at 282 nm of the blank and the DDA-loaded ME at 1%_(w/v) ^(16, 17).

Linearity

An analytical curve was prepared (n=3) dissolving 0.01 g of DDA in 100 mL of methanol, exactly. The dilutions were made in order to obtain a final concentration of 5; 10; 15; 20; 25; 30 e 35 $\mu\text{g/mL}$ of DDA, and the spectrophotometric analyses were performed at 282 nm. The lower limit of detection (LLOD) and the lower limit of quantification (LLOQ) were calculated from the analytical curve.

Precision

Precision of the method (repetitivity, intermediary precision, and reproducibility) was determined by dilution (1:500) of the DDA-loaded ME at 1%_(w/v) in order to obtain a 20 µg/mL DDA concentration. Each experimental assay was performed in sextuplicate.

Accuracy

The accuracy describes the average proximity of the results obtained in a test, in a given concentration, and in relation to the real value; that is, the relation between the one found by the method and that accepted as true or referential, usually determined by three triplicate analyses, at least: one at low, other at medium, and another at high concentration ⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

Robustness

The robustness of the method was observed through variations of the methanol brand (different suppliers) and the samples preparation technique (manual and ultrasonic shaking for 5 minutes) ^(17, 19, 21).

RESULTS AND DISCUSSION

Phase diagram

The specific composition of the mixtures allowed a large variety of formulations with different properties and was, therefore, very appropriate as a vehicle for transdermal administration of drugs such as diclofenac diethylamine. Compared with the work of Kriwet and Mullergoymann⁽⁷⁾, our ME did not use phospholipids, which could make the ME production difficult and could increase the price of the final product.

The methodology used for classifying the ME systems and building the phase diagrams turned out to be very simple and reproducible. After the titrations, it was possible to define different regions on the phase diagram. Two main regions of ME systems were identified by

such methodology, an optically transparent ME system and a gel-like ME system (MEG), Figure 1. On the right side of each pseudo-ternary diagram, a large ME region can be observed by any S/CS ratio. On the other hand, only the 2:1 S/CS ratio produces a small MEG region at the bottom of the pseudo-ternary diagram. From these regions, 14 formulations with a HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) range from 10.00 to 13.60 were chosen for further studies (Table 1). In addition, it was checked that the incorporation of the DDA did not interfere or alter these formulations, keeping them isotropic and optically transparent characteristic, even after centrifugation at 11000 g for 30 minutes.

Figure 1

During the ME production process, the energy used and the proportions of the components (oil, water, surfactant, and co-surfactant) were appropriate for reducing the interfacial tension sufficiently to produce homogenous, clear, and translucent systems with a Winsor IV characteristic ⁽²²⁾. After the DDA incorporation, the systems remained with the same optical property in all selected formulations. This could be due to location of DDA into the oil core of the O/W microemulsion with the hydrophilic region of the molecule in the oil-water interface that did not disturb the Winsor IV behavior of the system. In fact, the DDA has a low partition coefficient (K_p 0.078) remaining partitioned between the oil phase and the interfacial region of the system ⁽¹⁰⁾.

Formulation characterization

DDA entrapment efficiency for the ME

The average entrapment efficiency value of DDA in the formulations was 89.60 ± 14.19 % (Table 2). Additionally, after the centrifugation process, no modifications such as precipitation of DDA crystals were observed. However, when the S/SC proportion was 1:1 (Formulation F11

to F14) and the oil phase was at the higher value (20%), the entrapment efficiency dropped to around 70%. This was probably due to the high amount of oil phase and low concentration of surfactants that produce larger oil droplets and reduce the interfacial area of the ME. These data reveal that DDA molecules were strongly bound to the ME oil droplets (Table 2). Such phenomenon was responsible for the high stability of the ME system. In fact, taking into account the pKa value of DDA as 4.87⁽⁶⁾, in the pH value of 7.05 observed for DDA-loaded ME, DDA is mostly in the molecular state and can be favorably partitioned into oil droplets by hydrophobic effect ⁽²³⁾.

Table 1

Table 2

In a previous study, it was verified that F1 formulation showed the best appearance after DDA incorporation until reaching drug saturation into the system (data not shown). Therefore, the formulation F1 (F1 blank ME), obtained from the 4:1 S/CS phase diagram (Figure 1d), was chosen for the physicochemical characterization experiments (Table 3), and for the development and validation of the analytic methodology for DDA. In fact, this formulation presents an entrapment efficiency of around 100 % (99.56 ± 0.59 %) and a very good macroscopic appearance, revealing a good physicochemical stability.

Table 3

Because DDA is a weak alkali (pKa of 4.87), when this molecule is dispersed in a pH higher than its pKa, it tends to remain in the molecular state, generating molecular arrangements in the aqueous phase resulting in a viscosity and conductivity increase ⁽¹⁰⁾. In fact, the results of these characterizations of F1 show that not only was the pH parameter not so affected by the

presence of the DDA, but also the pH change was slight, from 6.55 for the F1 blank ME to 7.09 for the F1 DDA-loaded ME.

Because of its dynamic nature and the small size of the ME droplets of 40.1 ± 3.9 nm and 61.1 ± 1.0 nm for the F1 blank ME and the F1 DDA-loaded ME, respectively, the direct examination of the formulation was quite difficult. Therefore, it was necessary to use indirect techniques such as σ measurement and rheology determination to obtain information about the structure of the system^(24, 25).

As was expected, the σ of the F1 formulation was modified with the addition of DDA, since the values of the F1 blank ME and the F1 DDA-loaded ME were 294.7 ± 0.57 and 564.0 ± 2.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectively (Table 3). In fact, the diethylamine grouping increases this value due to the presence of this cation to the aqueous phase^(6, 10).

In order to explore the system as to the kind of ME, an σ monitoring in relation to the volume fraction of the aqueous phase (Φ_w) was performed (Figure 2). Thus, bicontinuous ME structures were identified. These structures may vary with the increase in the water fraction and depend directly on the kind of the surfactant used⁽²⁴⁾.

Figure 2

Figure 2 shows that in low water ratios (until $\Phi_w \approx 18$ % w/v), σ was practically independent of the fraction volume of the aqueous phase added to the system followed by a linear increase region until $\Phi_w \approx 45$ % w/v; after that, the system reached a maximum with a subsequent small decrease. This behavior can be explained, since the conductivity curve reveals the existence of three structural regions: w/o ME with $\Phi_w < 18$ % w/v; bicontinuous ME with 18 % w/v $< \Phi_w < 45$ % w/v, and o/w ME with $\Phi_w > 45$ % w/v. The region where σ increases

linearly with Φ_w is called critical percolation (Φ_p), and a possibility of an ultra-critical percolation (Φ_{up}) can also be expected ⁽¹⁰⁾.

Rheological analysis consists of the study of the outflow or deformation of the material when submitted to a shear tension. The method is applicable to the characterization of ME systems because the behavior of the fluid is directly related to the kind and degree of organization of the system. In addition, it can be used to check the quality during the production process, allowing a study of the DDA-addition effect on the formulation ⁽¹⁵⁾. The result of the rheological parameter shows that both systems, F1 DDA-loaded ME and F1 blank ME, were time-independent Newtonian fluids because their viscosity remains constant with the shearing speed applied. It also shows a superposition of the ascendant and descendant curves with a small standard deviation (Figure 3). Therefore, the presence of DDA does not disturb the rheological properties of the MEs.

Figure 3

The refraction index results show that the obtained values, between the F1 blank ME (1.399 ± 0.001) and the F1 DDA-loaded ME (1.420 ± 0.010), were not significant (Table 3). Therefore, the presence of DDA does not alter the transparency of the ME system, which confirms that DDA was inserted in a molecular state in the interfacial layer of the ME and this process does not disturb its stability. In fact, these parameters are used as stability loss indicators of MEs in different temperatures and storing organizations, and may also influence the location and stability of the drug in the system ⁽²⁶⁾.

Particle Size Analysis

Because the viscosity of the systems may lead to an experimental determination error⁽²⁷⁾, the dynamic light-scattering technique, which use a dilution process ⁽¹⁵⁾, was employed to

determine the size of the monodisperse droplets ^(15, 26-28). Such technique is based on the Brownian dispersion movement of the droplets, which is dependent of their diffusion coefficient ⁽²⁹⁾.

Table 4 shows the diameter and the polydispersity index (PDI) of the investigated system. A monomodal and homogenous distribution of the droplets and a low PDI can be observed. Since the system remained homogenous, the addition of the DDA did not cause a high increase in the size of the droplets and its PDI. However, the slight increase on the ME droplets may be a consequence of the location of the DDA in the oil core with the hydrophilic region of the molecule in the interfacial region, increasing the diameter of the structures. This phenomenon was confirmed by the increase of the σ , which was almost doubled for DDA-ME (Table 3). The low diameter of the ME droplets, smaller than 200 nm, allows the use of such system by transdermal application ⁽³⁰⁾. In fact, the literature describes that systems presenting small droplets after their transdermal application can be used as prolonged liberation systems ⁽³¹⁾.

Table 4

Development and validation of DDA analytical methodology

Another important fact to point out in this manuscript concerns the development of a validated methodology to quantify DDA in pharmaceutical dosage forms. Normally, scientific works using dosage of active ingredients in medicines use a standard analytical procedure without a deep study of validation.

Spectrophotometric analysis of the F1 blank ME and the F1 DDA-loaded ME showed that the F1 blank was not absorbed at $\lambda = 282$ nm demonstrating the specificity of the method for the DDA quantification. The linearity of the experiment was tested with a stock solution (100 $\mu\text{g/mL}$) dissolved in methanol, with concentrations in the range of 5 to 35 $\mu\text{g/mL}$ (Table 5). The

statistic analysis of the obtained results by linear regression through the minimum squares method was validated using the variance analysis (ANOVA). The LLOD and LLOQ were 0.6094 μ g/mL and 0.9233 μ g/mL, respectively.

Table 5

The repetitivity (intra-assay precision) and reproducibility (inter-laboratorial precision) were evaluated from the injections in sextuplicates ⁽¹⁹⁾ in which the analyzed concentration of 20 μ g/mL was chosen for representing the average spot of the specified interval by the procedure (5 to 35 μ g/mL on the analytical curve) and expressed by the relative standard deviation (RSD %) of the Laboratories 1 and 2 (2.18 % and 2.31%, respectively). The reproducibility (inter-laboratorial accuracy) was done by different laboratories, machines, and analysts and on different days ^(19, 21), without any statistically significant difference (Table 6).

Table 6

The accuracy of the method was determined after the linearity and specificity studies, by checking it from nine determinations, including the interval of the linear procedure, three replicates of low concentration (10 μ g/mL RSD = 0.42%), three replicates of medium concentration (20 μ g/mL RSD = 1.85%), and three replicates of high concentration (30 μ g/mL RSD = 1.30%). The accuracy was within the expected variation, due to the fact that the variation coefficient (VC) was not higher than 5% in any of the analytical determinations, and the values of $F_{\text{calculated}}$, on the three concentrations were always below the values of $F_{\text{tabled}} = 4.30$ in all concentrations when compared with the standard solutions.

It was also noticed that the method possesses an intrinsic robustness as well because it maintained its response, in triplicate, among the variations of the methanol brands and different suppliers (20.88 $\pm$ 0.33 μ g/mL and 20.77 $\pm$ 0.93 μ g/mL, respectively) and the technique for the

preparation of the samples, manual shaking, and ultrasonic for 5 minutes ($20.88 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ and $20.76 \pm 0.86 \mu\text{g/mL}$, respectively). According to Ribani ⁽³²⁾, if the changes are within the limits of acceptable precision and accuracy, the method is robust, and such variations can be incorporated into the analytic procedures.

CONCLUSION

Microemulsions obtained from polyethyleneglycol-8 caprylic/capric glycerides as surfactant, polyglyceryl-6 dioleate as co-surfactant, and isopropyl myristate as the oil phase were obtained and characterized in a wide-range region of the pseudo-ternary phase diagram. After DDA incorporation into the MEs, the systems remained optically clear, demonstrating that the DDA did not affect the physicochemical stability of the system. This allows the assumption that the added DDA migrated effectively to the oil core of the microemulsion with the hydrophilic region of the molecule located in the oil-water interface, since the diameter of the structures increased with the incorporation of the drug. This feature produces more systems that are quite stable when compared with the Emulgel™, which presents a less thermodynamic stability. This property is of utmost importance in transdermal and topical pharmaceutical dosage forms. In fact, our formulation follows all the rules of a safety product to be used in the transdermal route. It allows a great thermodynamic stability for the active ingredient and promotes an enhancement of its solubility in aqueous media. Additionally, ME presents an adequate droplet size for controlled release transdermal systems.

The UV-Vis spectrophotometric method for quantitative analysis of DDA proved to be sensitive and adequate for DDA quantification in the ME samples. The developed and validated method was sensitive, precise, accurate, reproducible, robust, and linear. Therefore, it can be used for the DDA quantitative analysis in ME formulations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially funded by CNPq and UEPB. The authors are also grateful to Glenn Hawes, from the University of Georgia, American Language Program, for editing this manuscript.

REFERENCES

1. Toma, H. E., Research organization in Brazil: from chemistry to nanotechnology. *Quim. Nova* **2005**, 28, S48-S51.
2. Formariz, T. P.; Urban, M. C. C.; Júnior, 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.* **2005**, 41, 301-313.
3. Oliveira, A. G.; Scarpa, M. V.; Correa, M. A.; Cera, L. F. R.; Formariz, T. P., Microemulsions: structure and application as drug delivery systems. *Quim. Nova* **2004**, 27, (1), 131-138.
4. Kriwet, K.; Mullergoymann, C. C., Binary diclofenac diethylamine water-systems - Micelles, vesicles and lyotropic liquid-crystals. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1993**, 39, (6), 234-238.
5. Escribano, E.; Calpena, A. C.; Queralt, J.; Obach, R.; Domenech, J., Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, 19, (4), 203-210.
6. Djordjevic, L.; Primorac, M.; Stupar, M., In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. *Int. J. Pharm.* **2005**, 296, (1-2), 73-79.

7. Kriwet, K.; Mullergoymann, C. C., Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum-corneum. *Int. J. Pharm.* **1995**, 125, (2), 231-242.
8. Chen, H. B.; Chang, X. L.; Weng, T.; Zhao, X. Z.; Gao, Z. H.; Yang, Y. J.; Xu, H. B.; Yang, X. L., A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. *J. Control. Release* **2004**, 98, (3), 427-436.
9. Constantinides, P. P.; Scalart, J. P., Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long- versus medium-chain glycerides. *Int. J. Pharm.* **1997**, 158, (1), 57-68.
10. Djordjevic, L.; Primorac, M.; Stupar, M.; Krajisnik, D., Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *Int. J. Pharm.* **2004**, 271, (1-2), 11-19.
11. 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* **2005**, 102, (2), 489-507.
12. Polizelli, M. A.; Telis, V. R. N.; Amaral, L. Q.; Feitosa, E., Formation and characterization of soy bean oil/surfactant/water microemulsions. *Colloid Surf. A - Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, 281, (1-3), 230-236.
13. Sintov, A. C.; Shapiro, L., New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *J. Control. Release* **2004**, 95, (2), 173-183.

14. Moraes, S. L.; Resende, M. O. O., Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectrofotometria. *Quim. Nova* **2004**, 27, (5), 701-705.
15. Formariz, T. R.; Sarmiento, V. H. V.; Silva-Junior, A. A.; Scarpa, M. V.; Santilli, C. V.; Oliveira, A. G., Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2006**, 51, (1), 54-61.
16. International Conference on Harmonisation (ICH). In *Methodology*, V. o. A. P., Ed. Q2A (CPMP/ICH/281/95): 2005.
17. Swartz, M. E.; Krull, I. S., *Analytical method development and validation*. Marcel Dekker: New York, 1997.
18. Convention, U. S. P., *USP-24. Validation of Compendial Methods*. 1999.
19. (ICH), I. C. o. H. In *Harmonised tripartie guideline: Validation of analytical procedures: text and methodology*, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use, 1996; 1996.
20. Cass, Q. B.; Degani, A. L. G., *Desenvolvimento de métodos por HPLC - Fundamentos, estratégias e validação*. Editora da UFSCar: São Carlos, 2001.
21. Nunes, R. S.; Senna, B. A. A.; Silva, J. A.; Santana, D. P., Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. *Revista Brasileira de Farmácia* **2005**, 86, (3), 87-91.
22. Winsor, P. A., Hydrotrophy, Solubilisation and Related Emulsification Processes . Part 1. *Trans. Faraday Soc.* **1948**, 44, (6), 376-398.

23. Formiga, F. R.; Fosenca, I. A. A.; Souza, K. B.; Silva, A. K. A.; Macedo, J. P. F.; Araújo, I. B.; Soares, L. A. L.; Egito, E. S. T., Influence of a lipophilic drug on the stability of emulsions: an important approach on the development of lipidic carriers. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 344, (1-2), 158-160.
24. Kahlweit, M.; Strey, R.; Haase, D.; Kunieda, H.; Schmeling, T.; Faulhaber, B.; Borkovec, M.; Eicke, H. F.; Busse, G.; Eggers, F.; Funck, T.; Richmann, H.; Magid, L.; Soderman, O.; Stilbs, P.; Winkler, J.; Dittrich, A.; Jahn, W., How to study microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, 118, (2), 436-453.
25. Strey, R., Microemulsion microstructure. *Euro Cosmetic* **1996**, 10, 39-46.
26. Fronza, T.; Campos, A.; Teixeira, H., Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. *Acta Farm. Bon.* **2004**, 23, (4), 558-566.
27. Aboofazeli, R.; Barlow, D. J.; Lawrence, M. J., Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions: II. Photon correlation spectroscopy. *AAPS Pharm. Sci.* **2000**, 2, (3), art. no.-19.
28. Lawrence, M. J.; Rees, G. D., Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, 45, (1), 89-121.
29. Orthaber, D.; Glatter, O., Synthetic phospholipid analogs: a structural investigation with scattering methods. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, 107, 179-189.
30. Lundberg, B. B.; Mortimer, B. C.; Redgrave, T. G., Submicron lipid emulsion containing amphipathic polyethylene glycol for use as drug-carriers with prolonged circulation time. *Int. J. Pharm.* **1996**, 134, (9), 119-127.
31. Trotta, M., Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. *J. Control. Release* **1999**, 60, (2-3), 399-405.

32. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I.; Melo, L. F. C., Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Quim. Nova* **2004**, 27, (5), 771-780.

TABLE CAPTIONS

Table 1. Formulation composition (%) of ME systems chosen from specific points of the pseudo-ternary phase diagram

Table 2. Entrapment efficiency of DDA-loaded MEs

Table 3. Results of the characterization of the F1 DDA-loaded ME and the F1 blank ME formulations.

Table 4. Particle size of the F1 DDA-loaded ME and the F1 blank ME formulations.

Table 5. Linearity of the assay from a stock solution of 100 µg of DDA/mL in methanol (mean, precision, and accuracy)

Table 6. Intra-day and inter-day precision of the F1 DDA-loaded ME

Table 1.

	4:1 (%)				3:1 (%)			2:1 (%)			1:1 (%)			
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14
Labrasol® (polyethyleneglycol-8 caprylic/capric glycerides)	36	40	32	24	37.5	30	22.5	23.3	33.3	35.3	25	15	15	25
Plurol oleique® (polyglyceryl-6 dioleate)	9.0	10	8.0	6.0	12.5	10	7.5	11.7	16.7	17.6	25	15	15	25
Isopropyl myristate	5.0	15	10	5.0	15	10	5.0	15	15	5.9	20	32	20	15
Water	50	35	50	65	35	50	65	50	35	41.2	30	38	50	35
HLB	13.60	13.60	13.60	13.60	13.00	13.00	13.00	11.99	11.99	12.01	10.00	10.00	10.00	10.00

Table 2.

Formulation	Before centrifugation		After centrifugation		DDA loaded (%)
	Abs	DDA load (µg/mL)	Abs	DDA load (µg/mL)	
F1	0.73 ± 0.00	19.71 ± 0.07	0.73 ± 0.00	19.62 ± 0.09	99.56 ± 0.59
F2	0.90 ± 0.03	24.20 ± 0.78	0.80 ± 0.00	21.48 ± 0.05	88.91 ± 2.76
F3	0.77 ± 0.02	20.77 ± 0.49	0.79 ± 0.01	21.23 ± 0.39	102.19 ± 0.70
F4	0.77 ± 0.00	20.74 ± 0.07	0.78 ± 0.01	20.90 ± 0.17	100.74 ± 0.75
F5	0.79 ± 0.02	21.13 ± 0.44	0.77 ± 0.00	20.66 ± 0.07	97.84 ± 2.15
F6	0.77 ± 0.01	20.69 ± 0.22	0.78 ± 0.01	20.89 ± 0.13	100.99 ± 0.49
F7	0.75 ± 0.02	20.25 ± 0.48	0.77 ± 0.01	20.60 ± 0.19	101.83 ± 3.15
F8	0.94 ± 0.02	25.20 ± 0.42	0.82 ± 0.04	21.91 ± 1.20	86.93 ± 3.43
F9	0.82 ± 0.01	22.01 ± 0.15	0.80 ± 0.01	21.50 ± 0.14	97.64 ± 1.28
F10	0.82 ± 0.01	22.14 ± 0.36	0.83 ± 0.01	22.40 ± 0.28	101.16 ± 0.74
F11	1.06 ± 0.01	28.65 ± 0.16	0.77 ± 0.01	20.62 ± 0.33	71.98 ± 1.39
F12	1.06 ± 0.00	28.45 ± 0.09	0.73 ± 0.02	19.71 ± 0.55	69.28 ± 1.72
F13	1.06 ± 0.01	28.64 ± 0.25	0.71 ± 0.02	19.14 ± 0.49	66.86 ± 1.63
F14	1.09 ± 0.01	29.33 ± 0.33	0.75 ± 0.01	20.13 ± 0.13	68.53 ± 0.49
Mean	-	-	-	-	89.6 ± 14.19

Table 3..

	pH	Conductivity (μS/cm)	Refractive index	Apparent viscosity (mPa)
F1 blank ME	6.55 ± 0.04	294.7 ± 0.57	1.399 ± 0.001	106.84 ± 3.68
F1 DDA-loaded ME	7.09 ± 0.03	564.0 ± 2.0	1.420 ± 0.010	113.92 ± 0.76

Table 4.

	Diameter (nm)	Polydispersity index $\pm$ SD
F1 blank ME	40.1 $\pm$ 3.9	0.106 $\pm$ 0.014
F1 DDA-loaded ME	61.1 $\pm$ 1.0	0.254 $\pm$ 0.007

Table 5.

Concentration (µg/mL)	Mean (µg/mL) (n = 3)	Precision (%)	Accuracy (%)
5.00	5.12 ± 0.23	4.47	98.27
10.00	10.42 ± 0.25	2.44	100.74
15.00	15.38 ± 0.57	3.72	101.18
20.00	20.56 ± 0.60	2.91	100.59
25.00	25.32 ± 0.98	3.88	99.46
30.00	30.57 ± 1.04	3.39	99.23
35.00	35.56 ± 1.51	4.26	98.85

Table 6.

Analyst	Day	Mean (µg/mL) (n=6)	Precision (%)	Accuracy (%)
Analyst 1	1	19.652 ± 0.763	3.88	98.26
	2	19.840 ± 0.345	1.74	99.20
Analyst 2	1	19.300 ± 0.828	4.29	96.50
	2	20.329 ± 0.711	3.50	101.64

LEGEND OF FIGURES

Figure 1. Pseudo-ternary phase diagram for the systems containing, PEG-8 caprylic/capric glycerides (S), polyglyceryl-6 dioleate (CS), isopropyl myristate (phase oil) and water for S:CS ratios of 1:1 (a), 2:1 (b), 3:1 (c) and 4:1 (d). Key: (ME) microemulsion, (MEG) gel-like microemulsion. (*) F1 blank ME formulation (HLB = 13.60).

Figure 2. Electrical conductivity as a function of volume fraction of aqueous phase in the F1 formulation at 25°C (n=3).

Figure 3. Rheological behavior of the F1 DDA-loaded ME (■) and the F1 blank ME (●) of the phase diagram at surfactant:cosurfactant ratio 4:1.

ANEXO III

***ARTIGO COMPLETO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO (Química
Nova)***

**ESTUDO LIBERAÇÃO E PERMEACÃO *IN VITRO* DO DICLOFENACO DE
DIETILAMÔNIO EM MICROEMULSÃO GEL-LIKE**

José Alessandro da Silva *

Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Rua Juvêncio Arruda, s/n,
58109-790, Campina Grande-PB, Brazil.

**Davi Pereira de Santana, Danilo Galindo César Bedor, Valeria Ferreira da Costa
Borba**

Departamento Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof.
Arthur de Sá, s/n, 50739-520, Recife-PE, Brazil.

Ana Amélia Moreira Lira

Departamento de Fisiologia, Curso de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, São
Cristovão-SE, Brazil.

Eryvaldo Socrates Tabosa do Egito

Departamento de Farmácia, Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID), Universidade
Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brazil.

IN VITRO RELEASE AND PERMEATION OF A DICLOFENAC DIETHYLAMINE FROM MICROEMULSION GEL-LIKE

The goal of this study was to produce and characterize a new microemulsion gel-like (MEG) carrier system by using the pseudo-ternary phase-diagram concept. The diclofenac diethylamine (DDA) was incorporated in the MEG system and its *in vitro* release and permeation profiles were performed using Franz-type diffusion cells. These results were compared with a commercial DDA emulgel. Concerning the *in vitro* release and permeation of DDA, MEG has presented lower released and permeated rates than commercial DDA emulgel. In DDA release studies, it was observed that the commercial DDA emulgel provided significantly higher K_p of DDA (2.2-fold) as compared to the MEG. Similar data were obtained in permeation studies where the commercial DDA emulgel also provided significantly higher K_p of DDA (4.7-fold). Although microemulsions are potential vehicles for improved topical delivery of many drugs, the results obtained in this work suggest that *in vitro* topical delivery of DDA from MEG formulation has not showed to be as effective as commercial DDA emulgel.

Keywords: diclofenac diethylamine, *in vitro* release, microemulsion gel-like

INTRODUÇÃO

A administração tópica é conhecida como via alternativa da administração oral de ativos medicamentosos e oferece muitas vantagens como a ausência de efeito de primeira passagem, o fato de ser indolor, e a facilidade de aplicação.¹ Todavia, uma eficácia tópica só é obtida a partir de fármacos potentes com adequado grau de penetração na pele.² Isto tem levado a um crescente interesse pela utilização de promotores de permeação em formulações tópicas assim como o uso de sistemas de liberação de fármacos com esta capacidade promotora da permeação.³

As microemulsões (ME) 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, pelas propriedades de solubilizar fármacos hidrofílicos em meio lipofílico, lipofílicos em meio aquoso e anfifílicos na interface óleo/água.⁴⁻¹⁰ Além disso, estes sistemas apresentam capacidade de se formarem espontaneamente, podendo existir sob várias formas estruturais (globular a/o e o/a, bicontínuas, cúbicas ou lamelares)^{11,12} e atuam como promotores de permeação de vários fármacos devido ao reduzido tamanho das gotículas formada assim como ao seu alto conteúdo de tensoativo que desorganiza os lipídeos da pele.⁵

O diclofenaco de dietilamônio (DDA) é um antiinflamatório não esteroide (AINEs) capaz de formar micelas e cristais líquidos liotrópicos em água.¹³ Apresenta a capacidade de interagir com os fosfolipídeos da pele, contribuindo para aumentar a fluidez do mesmo no estrato córneo, fazendo com que os lipídios passem de uma forma cristalina ordenada para uma forma líquida desordenada, aumentando, portanto, a permeabilidade cutânea.^{5,7}

Além disso, o DDA apresenta metabolismo hepático, tempo de meia-vida curto,¹⁴ não sofre metabolismo na pele, não induz tolerância e têm bom coeficiente de partição.¹⁵

Com base nas colocações acima e na importância do tema, o objetivo do presente trabalho foi à obtenção e a caracterização de uma ME, na forma gel (MEG) contendo DDA, como sistema promotor de permeação do fármaco, e a avaliação do seu perfil de liberação e permeação *in vitro* em comparação a uma formulação convencional emulgel comercial genérico.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Diclofenaco de dietilamônio (Nortec Química, Brazil), metanol e acetonitrila grau cromatográfico (J. T Baker), fosfato de potássio monobásico (Merck), água purificada do sistema Millipore Milli-Q[®] (Millipore Corporation – USA), membranas hidrofílicas de 0,45 µm de acetato de celulose, emulgel comercial de diclofenaco dietilamônio genérico (11,6 mg/g), miristato de isopropila (Henrifarma), polietilenoglicol-8 cáprico caprílico glicerídeo (Labrasol[®]-Gattefossé), poligliceril 6-dioleato (Plurol Oleico[®]-Gattefossé).

Métodos

Construção do diagrama de fases

O diagrama de fase, desta pesquisa, foi obtido por inspeção visual das misturas dos ingredientes polietilenoglicol-8 cáprico caprílico glicerídeo (tensoativo) com poligliceril 6-dioleato (co-tensoativo) na proporção 2:1 e, a esta mistura, foi adicionado miristato de isopropila (fase oleosa) nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. As titulações foram feitas com água purificada tipo Milli-Q[®], utilizando uma pipeta automática ajustada 1000 µL, adicionando gota a gota, em temperatura ambiente. Durante a titulação a

mistura foi homogeneizada por agitador magnético, por 3 minutos, e as mudanças do aspecto visual contra um fundo preto foram observadas. Considerando-se as proporções dos componentes após as titulações aquosas plotou-se os pontos em que se deu a formação de sistema isotrópico e opticamente transparente MEG.^{4,6,16-18} O diagrama foi feito em duplicata.

Seleção da formulação MEG

A MEG foi selecionada, a partir de uma determinada área do diagrama de fases, na qual foi preparada a partir da mistura dos ingredientes polietilenoglicol-8 cáprico caprílico glicerídeo como tensoativo (35,3 %) com poligliceril 6-dioleato como co-tensoativo (17,6 %) e, a esta mistura, foi adicionado o miristato de isopropila como fase oleosa (5,9 %) e em seguida água purificada tipo Milli-Q[®] (41,2 %). O diclofenaco de dietilamônio foi incorporado a este sistema, por simples solubilização, na concentração de 1,16 %. A formulação foi preparada 48 horas antes dos testes de caracterização, para estabilização termodinâmica do sistema em temperatura ambiente.¹⁹

Caracterização físico-química da MEG selecionada

Análise do tamanho das gotículas (espalhamento de luz dinâmico)

A análise do tamanho das gotículas sub-microscópicas foi determinada através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, também denominada espectrocópia de correlação de fótons (PCS), cuja técnica fornece o raio hidrodinâmico das partículas coloidais, o qual é calculado pela equação Stokes-Einstein.¹⁷ A MEG foi analisada em um analisador de gotículas. As amostras foram colocadas na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A temperatura do sistema foi mantida a 20 °C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração foi de acordo com o índice calculado de cada amostra analisada. Foram realizadas 10

determinações do diâmetro e índice de polidispersidade (IPD) das gotículas, com a duração total de 5 minutos.

Determinação da eficiência de encapsulação

Para o doseamento do DDA na MEG, por espectrofotometria, foi preparada uma solução de forma a obter uma solução de $\approx 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DDA (50 μL de MEG-DDA diluídos em 24,95 mL de metanol). As concentrações de DDA na MEG foram medidas a partir dos valores de absorvância, tendo como valor exato o valor correspondente ao padrão diário contendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (10 mg de DDA em 100 mL de metanol). A partir desta solução, foi realizada uma diluição com metanol de forma a obter uma solução de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. As leituras foram feitas em 282 nm segundo protocolo adotado no desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria.²

A eficiência de encapsulação do DDA na MEG foi determinada utilizando-se 1 mL da formulação na qual foi submetida à centrifugação (11000 $g \approx 14000$ rpm) por 30 minutos. Ao término do ciclo de centrifugação, foi feito o doseamento do sobrenadante, cuja percentagem de encapsulação foi calculada pela razão entre o teor do sobrenadante versus o teor na MEG x 100.²

Condutividade (σ)

A σ foi determinada em condutivímetro modelo Cambo HI 98129 da marca Hanna. O equipamento foi calibrado com uma solução de calibração de condutância específica de $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$, à temperatura de 25 °C.¹⁶

Determinação do pH

O pH da MEG foi avaliado utilizando-se um potenciômetro digital com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, modelo Cambo HI 98129, da marca Hanna, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. O eletrodo

de vidro foi introduzido diretamente no interior da formulação (≈ 15 mL) acondicionada em frasco de cintilação.

Índice de Refração (IR)

O IR foi determinado utilizando-se Refratômetro de Abbé, Carl Zeiss-Jena, aferido com água deionizada Milli-Q[®] (IR 1,3325), à temperatura de $25 \pm 0,5$ °C, e em triplicata.¹⁷

Determinação da densidade relativa (DR)

A DR foi determinada pelo método do picnômetro, seguindo-se a metodologia descrita na Farmacópeia Brasileira,²⁰ utilizando-se como referência água deionizada Milli-Q[®]. Os picnômetros utilizados foram de 5 mL de capacidade e para retirar as bolhas de ar formada no sistema foi utilizado o ultra-som (UltraSonic – USC 1400). A densidade foi obtida em ambiente com temperatura de $20 \pm 0,5$ °C e em triplicata.

Determinação do potencial zeta (ζ mV)

A medida do ζ mV foi determinada com auxílio de um zetâmetro [Particle Sizing System by *Light Scattering* – Brookhaven Instruments Corporation, model EMI 9863 (Holtsville, NY, USA)], submetendo as gotículas da formulação a uma voltagem fixa e utilizando os valores fornecidos pelo aparelho para calcular o ζ mV. Para cada amostra foram realizadas 15 medidas de mobilidade eletroforética.²¹

Estudo de liberação e permeação *in vitro* do DDA na MEG

O estudo de liberação e permeação *in vitro* do DDA na MEG foi conduzido utilizando-se células de difusão tipo Franz com área difusional de $1,15 \text{ cm}^2$, volume de ± 6 mL, usando membranas artificiais hidrofílicas de acetato de celulose $0,45 \mu\text{m}$ para o estudo de liberação e pele da orelha de porco para o estudo de permeação. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato pH 7,4 num sistema composto de seis células

individuais conectados a um banho termostatzado à $37 \pm 0,5$ °C sob agitação constante de 100 rpm em agitador magnético por um período de 12 h para a cinética de liberação e de 24 h para a cinética de permeação. As membranas foram colocadas na parte superior da célula receptora. No compartimento doador, foram aplicados 300 µL da MEG (o que corresponde à 3480 µg de DDA) diretamente sobre a membrana e, posteriormente, o sistema foi fechado. As amostras da solução receptora foram coletadas nos seguintes tempos para a cinética de liberação: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10 e 12 h e de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10; 12 e 24 h para a cinética de permeação. O volume total da fase receptora foi substituído a cada amostragem com tampão fosfato pH 7,4 para manutenção das condições sink do sistema.²²

A pele da orelha de porco foi obtida e tratada de animal recentemente sacrificado em matadouro da região metropolitana do Recife, cuja pele foi retirada da cartilagem com um auxílio de pinça e bisturi, seguindo-se de remoção do tecido gorduroso remanescente e foram seccionadas e congeladas.²

Quantificação do DDA por CLAE-UV

A quantidade de fármaco liberado no compartimento receptor foi quantificada por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu (Kyoto, Japão) configurado em 280 nm. A separação cromatográfica foi conseguida usando uma coluna analítica tipo C18 150 x 4,6 mm, 5 µm Shimpack® (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplada a uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato hidróxido de sódio 20 mM (70:30, v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido fosfórico, na qual foi filtrado e degaseificado e bombeado em um fluxo de 1,2 mL min⁻¹. O forno da coluna foi ajustado para 40 °C e o

volume de injeção foi 30 μL , com tempo de corrida total de 3,5 minutos. O método de quantificação do DDA foi validado, com uma linearidade de 0,05 à 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e coeficiente de correlação de 0,998, limite de detecção de 0,003 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e limite de quantificação de 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com uma precisão intra e inter corrida abaixo de 5% e uma exatidão nos três níveis (baixa, média e alta concentração) próximo de 100 %.

A liberação e a permeação desta formulação foi comparada à 300 mg do medicamento comercial genérico emulgel de diclofenaco de dietilamônio na mesma concentração que a MEG.

Cálculo do fluxo (J) e do coeficiente de permeabilidade (K_p) do DDA na MEG

O J foi calculado no *steady-state* a partir da porção linear da quantidade liberada por área versus tempo conforme dados da literatura.^{1,23}

Já o K_p foi calculado a partir do J no *steady-state* versus a concentração de DDA no compartimento doador (C_{doador}) conforme equação 1 sugerida por Ozguney *et al.*¹

$$K_p = J/C_{\text{doador}} \quad (1)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diagrama de fases

Durante o processo de produção do sistema MEG, selecionado a partir do diagrama de fases deste estudo, foi possível observar que a energia empregada e as proporções de seus componentes (óleo, água, tensoativo e co-tensoativo) foram apropriadas para reduzir a tensão interfacial até certo ponto e foi capaz de conduzir a formação de um sistema homogêneo, límpido, translúcido e isotrópico característico de MEG. Dessa forma, foi possível definir com clareza a região de MEG como representada na Figura 1.

Figura 1

Após a incorporação do DDA, por simples solubilização, o sistema obtido apresentou-se com a mesma limpidez, transparência e isotropia, mostrando que o DDA não influenciou a tensão interfacial entre a fase aquosa e a oleosa, não perturbando a estabilidade termodinâmica do sistema.

Caracterização físico-química da MEG

A MEG foi caracterizada 48 horas após sua fabricação e seus resultados encontram-se apresentados na Tabela 1. A eficiência de encapsulação do DDA foi de $101,16 \pm 0,74 \%$, mostrando que a incorporação do fármaco foi completa. Foi visto também que a densidade relativa (DR) e o índice de refração não alteraram com a incorporação do fármaco.

Tabela 1

O pH também foi pouco afetado com a adição do fármaco, $6,85 \pm 0,07$ para MEG sem o DDA e de $7,1 \pm 0,01$ para a MEG acrescida do DDA (Tabela 1). De forma geral, o pH ideal de uma formulação é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância (5,5 a 8,0),²⁴ cuja formulação desenvolvida nesta pesquisa apresentou pH compatível com o da pele.

Por outro lado, observa-se, a partir dos dados da Tabela 1, que a condutividade (σ) foi modificada com a adição do DDA, visto que os valores na MEG sem o DDA foram inferiores aos valores da MEG com DDA. Este resultado já era esperado já que ocorreu a adição de um sal ao sistema.

Na Tabela 1 estão apresentados também, os valores de potencial zeta (ζ mV) das MEG sem DDA e MEG com DDA na qual se podem observar valores negativos. Esses resultados estão em concordância com a literatura,^{25,26} os quais relacionaram análise de ζ mV e pH de sistemas dispersos observando que o ζ mV tende a se tornar mais negativo

com o aumento do pH. Essa negatividade pode ser atribuída à possível presença de grupos carboxilatos na superfície das gotículas dispersa.

As análises do diâmetro das gotículas da fase interna da MEG (Tabela 1) demonstraram uma distribuição do tipo monomodal e homogênea das gotículas (Figura 2), a qual foi evidenciada pelo baixo IPD. A literatura^{18,27-30} considera que um sistema disperso para ser considerado ME é necessário que o tamanho de suas gotículas da fase interna esteja entre 10 e 150 nm. Por isso, podemos estimar que o sistema estudado seja uma MEG, bem como, podemos utilizá-la para realização dos estudos posteriores.

Figura 2

A adição do DDA causou um aumento no tamanho das gotículas, porém elas mantiveram a sua isotropia e homogeneidade com um pequeno IPD. O diâmetro das gotículas foi menor do que 200 nm, sendo viável sua aplicação por via tópica³¹ já que a literatura descreve que sistemas que apresentam gotículas pequenas após a sua aplicação tópica podem ser utilizados como sistemas de liberação prolongada.³²

Estudo de liberação e permeação *in vitro* do DDA

Na avaliação de produtos de ação dermatológica como, por exemplo, uma MEG de DDA, testes clínicos devem ser precedidos, e em algumas vezes substituídos, por testes *in vitro*. Estes testes, devido às suas peculiaridades, permitem entender alguns fenômenos que ocorrem entre a aplicação do produto e o efeito medido farmacologicamente, de maneira prática, rápida e sem a interferência de fatores biológicos.³³

Para este estudo foi utilizada a célula de difusão baseada no modelo de Franz, usualmente empregada em estudo de liberação e permeação *in vitro*. É sabido que a eleição de uma solução receptora para os experimentos *in vitro* depende da solubilidade do fármaco, pois é necessária a manutenção das condições sink para garantir a obtenção de

resultados efetivos.³⁴ No caso do DDA, o mesmo mostrou-se muito solúvel em tampão fosfato pH 7,4, com solubilidade superior à 6,0 mg mL⁻¹ e por isso o mesmo foi escolhido.

A Figura 3 e 4 mostram os perfis de liberação e permeação *in vitro* da MEG e da formulação comercial emulgel genérico, usando membranas artificiais hidrofílicas de acetato de celulose (cinética de 12 h) e membrana da pele da orelha de porco (cinética de 24 h).

Figura 3

Figura 4

A taxa de liberação do DDA depende significativamente da afinidade do fármaco/veículo e da fração aquosa do sistema.¹⁵ Provavelmente, a liberação do DDA da MEG, comparada com o emulgel genérico, foi dificultada pelas combinações moleculares do DDA com a fração aquosa e interface do sistema, o qual causou um incremento da viscosidade formando uma malha gelificada que dificultou sua liberação. Esse resultado está em concordância com Djordjevic *et al*¹⁵ que relata que ME contendo um glicerídeo cáprico caprílico e poligliceril-6 dioleato, associado com miristato de isopropila, podem dificultar a liberação de drogas anfifílicas por interações moleculares.

Para calcular os parâmetros de liberação e permeação, em sistemas isotrópicos que apresentam propriedades difusionais em todas as direções como as ME, foi utilizada a primeira lei de Fick, obedecendo ao modelo de dose infinita, cujo gradiente de concentração é constante em consequência da concentração de fármaco do compartimento doador ser constante.²⁴ Portanto, plotou-se quantidade liberada e permeada por área versus tempo, cuja representação gráfica está descrita nas Figuras 3 e 4.

Observa-se que houve uma diferença significativa entre as formulações testadas desde as primeiras horas das cinéticas, tanto em membrana artificial quanto em pele da

orelha de porco. O K_p da MEG estudada em membrana artificial foi $5,76 \times 10^{-3} \pm 7,1 \times 10^{-4}$ cm h⁻¹, enquanto que o do emulgel genérico foi $1,28 \times 10^{-2} \pm 2,3 \times 10^{-3}$ cm h⁻¹ (2,2 vezes maior). O mesmo comportamento foi observado para o K_p usando membrana da orelha de porco, onde o emulgel comercial apresentou um K_p 4,7 vezes maior que a MEG ($1,47 \times 10^{-4} \pm 2,98 \times 10^{-5}$ cm h⁻¹ para a MEG e $6,88 \times 10^{-4} \pm 6,91 \times 10^{-5}$ cm h⁻¹ para o emulgel comercial). Esse menor K_p da MEG estudada pode ser atribuído ao fato de que no emulgel comercial é utilizado um álcool em sua formulação, na qual atua como promotor de permeação de AINEs, fato que está em concordância com Bommannan *et al.*³⁵

Outro fator que deve ser levado em consideração para explicar o menor desempenho cinético da MEG está relacionado aos fenômenos de interface, ou seja, a atividade de superfície e micelização do DDA afetaram a sua liberação. Possivelmente, o DDA formou micelas o que ocasionou sua retenção na formulação, justificando o menor desempenho da MEG estudada.

A velocidade de liberação, e conseqüentemente de permeação, variam de acordo com as características das formulações, foi observado um aumento no tempo necessário (0 – 5 horas) para que o J das formulações emulgel genérico e MEG se equilibrem, ou seja, ocorreu um tempo de latência Figura 4. O tempo de latência pode ser definido como o tempo necessário para que o sistema entre em equilíbrio, o qual é calculado por extrapolação da reta de regressão linear até o eixo do tempo.³⁶ Decorrido o tempo de latência, foi possível definir o tipo de cinética de permeação cutânea como de ordem zero.³³ Os modelos cinéticos de ordem zero para estas formulações apresentaram um coeficiente de correlação ($r > 0,98$), indicando que o J independe da concentração do fármaco.

A literatura relata que as ME têm grande capacidade de liberação de fármacos a partir da pele.^{1,28} Nos estudos realizados por Zhu *et al.*³⁷ usando o fármaco penciclovir em

uma ME foi obtido um aumento na permeação de 3,5 vezes quando comparado a uma formulação comercial. No entanto, neste estudo, foi encontrado resultado contraditório, pois a MEG apresentou um menor J ($2,75 \pm 0,27 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ para MEG e $2,39 \pm 0,24 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ para emulgel comercial) e menor quantidade liberada que o emulgel genérico. Fato que pode ser atribuído a uma diminuição da mobilidade do DDA incorporado, o que se traduziu numa difusão mais lenta e J diminuído.

CONCLUSÃO

Apesar das ME serem consideradas veículos capazes de promover a permeação de compostos na pele, resultados contrários foram obtidos neste estudo, onde a MEG estudada apresentou capacidade de permeação inferior a uma formulação convencional do mercado. Isto pode ser explicado através de uma maior retenção do fármaco na formulação devido à uma interação molecular entre o DDA e os componentes da MEG. Mas, um estudo da modificação desta organização molecular é necessário para confirmar este mecanismo de retenção e poderá ser feito em estudo posterior. Desta forma, pode-se concluir que as ME contendo miristrato de isopropila, glicerídeos cáprico caprílico e poligliceril-6-dioleato não resultam em sistemas promotores de permeação tão efetivo na pele quanto a formulação comercial presente no mercado para o fármaco DDA.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo edital universal e a UEPB

REFERÊNCIAS

1. Ozguney, I. S.; Karasulu, H. Y.; Kantarci, G.; Sozer, S.; Guneri, T.; Eertan, G.; *AAPS PharmSci.* **2006**, 7, E1.
2. Silva, J. A.; *Tese Doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2008.
3. Martins, M. R. F. M.; Veiga, F. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **2002**, 38, 33.

4. Ke, W. T.; Lin, S. Y.; Ho, H. O.; Sheu, M. T.; *J. Control. Release* **2005**, *102*, 489.
5. Oliveira, A. G.; Scarpa, M. V.; Correa, M. A.; Cera, L. F. R.; Formariz, T. P.; *Quím. Nova* **2004**, *27*, 131.
6. Djordjevic, L.; Primorac, M.; Stupar, M.; Krajisnik, D.; *Int. J. Pharm.* **2004**, *271*, 11.
7. Escribano, E.; Calpena, A. C.; Queralt, J.; Obach, R.; Domenech, J.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *19*, 203.
8. Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 628.
9. Paolino, D.; Ventura, C. A.; Nistico, S.; Puglisi, G.; Fresta, M.; *Int. J. Pharm.* **2002**, *244*, 21.
10. Taha, M. O.; Al-Ghazawi, M.; Abu-Amara, H.; Khalil, E.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *15*, 461.
11. Sha, D. O.; *Micelles, microemulsions and monolayers*, New York, 1998.
12. Jurkovic, P.; Gasperlin, M.; *Farmaceutski Vestnik* **2004**, *55*, 565.
13. Kriwet, K.; Mullergoymann, C. C.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1993**, *39*, 234.
14. Nokhodchi, A.; Sharabiani, K.; Rashidi, M. R.; Grafourian, T.; *Int. J. Pharm.* **2007**, *335*, 97.
15. Djordjevic, L.; Primorac, M.; Stupar, M.; *Int. J. Pharm.* **2005**, *296*, 73.
16. Formariz, T. P.; Chiavacci, L. A.; Sarmiento, V. H. V.; Santilli, C. V.; Egito, E. S. T.; Oliveira, A. G.; *Colloids Surf., B.* **2007**, *60*, 28.
17. Formariz, T. P.; Sarmiento, V. H. V.; Silva-Junior, A. A.; Scarpa, M. V.; Santilli, C. V.; Oliveira, A. G.; *Colloids Surf., B.* **2006**, *51*, 54.
18. Sintov, A. C.; Shapiro, L.; *J. Control. Release* **2004**, *95*, 173.

19. Moraes, S. L.; Rezende, M. O. O.; *Quím. Nova* **2004**, 27, 701.
20. Farmacopéia Brasileira, 4th ed., Andrei editora: São Paulo, 2003.
21. Veríssimo, L. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, 2007.
22. Lira, A. A. M.; *Tese Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2007.
23. Panigrahi, L.; Pattnaik, S.; Ghosal, S. K.; *AAPS PharmSci.* **2005**, 6, E167.
24. Auton, M. E.; *Delineamento de Formas Farmacêuticas*, 2th ed., Artmed: Porto Alegre, 2005.
25. Washington, C.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, 20, 131.
26. Wiacek, A. E.; Chibowski, E.; *Colloids Surf., B.* **2002**, 25, 55.
27. Lawrence, M. J.; Rees, D. G.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, 45, 89.
28. Kreilgaard, M.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, S77.
29. Tenjarla, S.; *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1999**, 16, 461.
30. Friberg, S. E.; *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1990**, 41, 155.
31. Lundberg, B. B.; Mortimer, B. C.; *Int. J. Pharm.* **1996**, 134, 119.
32. Trota, M.; *J. Control. Release* **1999**, 60, 399.
33. Sato, M. E. O.; Gomara, F.; Pontarolo, R.; Andreazza, I. F.; Zaroni, M.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2007**, 43, 195.
34. Shah, V. P.; Maibach, H. I.; *Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration*. New York: Plenum Press, 2003.
35. Bommannan, D.; Potts, R. O.; Guy, R. H.; *J. Control. Release* **1991**, 16, 299.
36. Bemvindo, C. S. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

37. Zhu, W.; Yu, A.; Wang, W.; Dong, R.; Wu, J.; Zhai, G.; *Int. J. Pharm.* **2008**, *360*, 184.

Legenda das Figuras

Figura 1. Diagrama de fases pseudo-ternário para o sistema polietilenoglico-8 cáprico caprílico gricerídeo (Labrasol[®])/poligliceril 6-dioleato (Plurol oleico[®]), miristato de isopropila e água para a proporção tensoativo:co-tensoativo 2:1. A área delimitada representa a MEG.

Figura 2. Distribuição do tamanho de gotículas por espalhamento de luz da MEG de DDA

Figura 3. Quantidade liberada do diclofenaco de dietilamônio em membrana sintética de acetato de celulose da MEG e do emulgel comercial genérico

Figura 4. Quantidade permeada do diclofenaco de dietilamônio em pele da orelha de porco da MEG e do emulgel comercial genérico

Figura 1

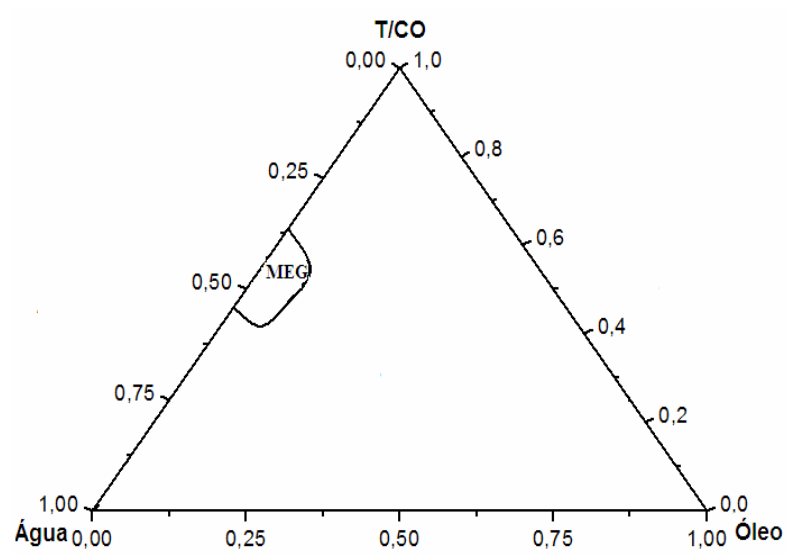


Figura 2

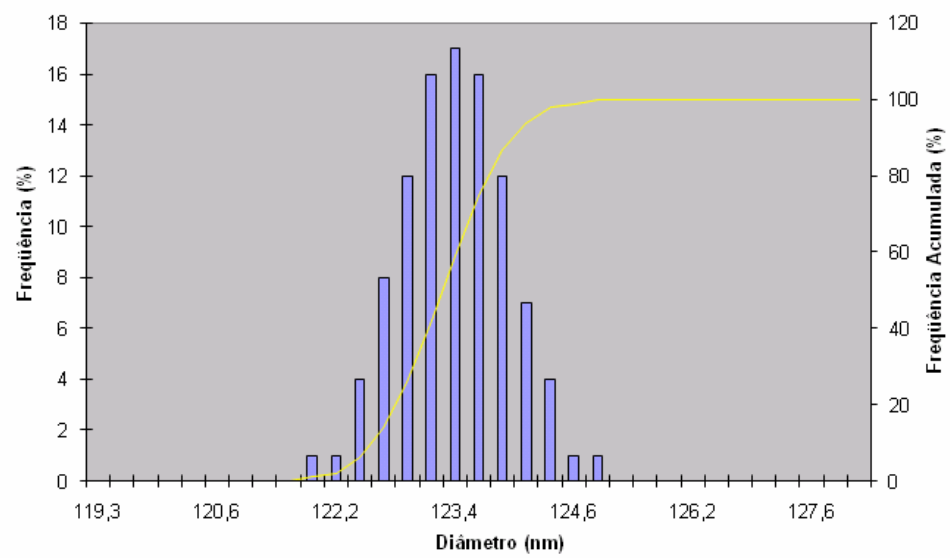


Figura 3

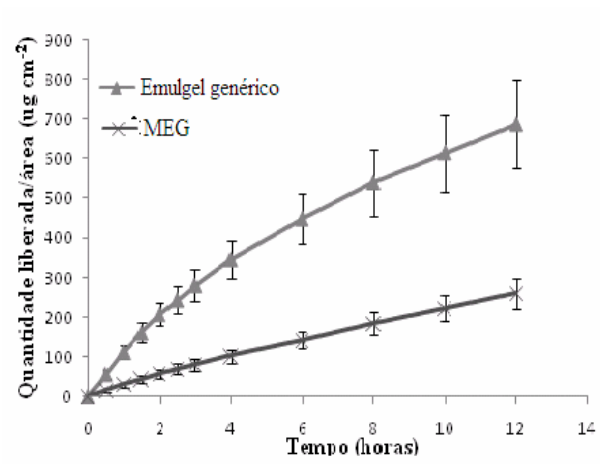


Figura 4

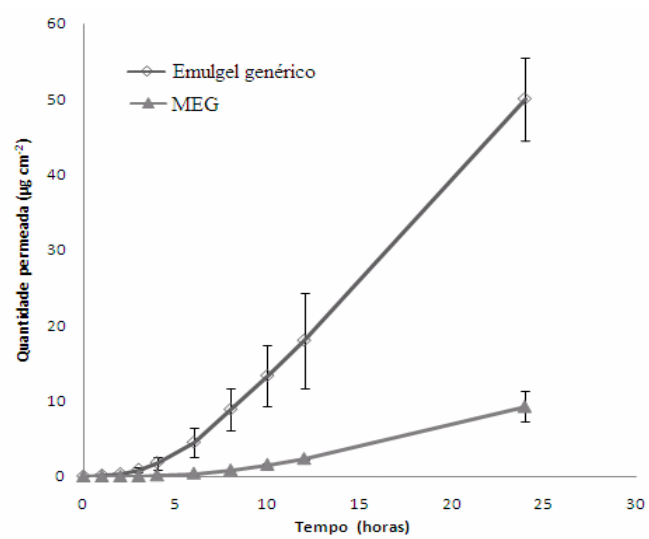


Tabela 1. Resultado da caracterização físico-química da MEG selecionada

Parâmetros	Microemulsão gel-like (MEG)	
	MEG sem DDA	MEG com DDA
Teor de DDA na MEG ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-	$22,40 \pm 0,28$
pH	$6,85 \pm 0,07$	$7,11 \pm 0,01$
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	$24,73 \pm 1,6$	$73,55 \pm 0,7$
Densidade relativa (g L^{-1})	$1,0275 \pm 0,003$	$1,029 \pm 0,01$
Índice de refração	$1,413 \pm 0,003$	$1,413 \pm 0,004$
Potencial zeta (mV)	$- 21,083 \pm 1,37$	$- 25,48 \pm 1,46$
Tamanho de gotículas (nm)	$94,6 \pm 2,9$	$123,4 \pm 6,7$
IPD*	0,273	0,105

* Índice de polidispersividade

ANEXO IV

TRABALHOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS



RESUMOS

João Pessoa - PB
07 a 11 de outubro de 2007
Hotel Tambaú

IN VITRO ASSAY OF DICLOFENAC DIETHYLAMINE IN THE SKIN BY MICROEMULSION BASED HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

José Alessandro da Silva^{1,3*} (PG), Valéria Ferreira da Costa Borba¹ (IC), Danilo Galindo Cesar Bedor¹ (PG), Carlos Eduardo Miranda de Sousa¹ (PG), Bolivar Ponciano Goulard Damasceno² (PG), Eryvaldo Socrates Tabosa do Egito² (PQ), Davi Pereira de Santana¹ (PQ).

¹ Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, NUDFAC (Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético), Recife-PE, Brasil.

² LASID (Laboratório de Sistemas Dispersos), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil.

³ Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, Brasil.

Keywords: Skin recovery, Diclofenac diethylamine, validation.

Introduction

The diclofenac diethylamine (DDA) is a non-steroidal anti-inflammatory drug able to form micelles and lyotropic liquid crystals in water¹. Besides, it interacts with the phospholipids of the skin and contributes to the increase of fluidity thought the "stratum corneum", increasing, therefore, the cutaneous permeability². The DDA presents hepatic metabolism, short half-life and a good partition coefficient. Therefore, it is not metabolized in the skin nor induces tolerances^{3, 4}. The aim of this work was to develop and validate an easy *in vitro* procedure for DDA quantification inside the epidermal tissue.

Methods

The DDA was extracted from the pig ear skin, cleared and easily analyzed by HPLC. The applicability of the procedure was checked by studying the epidermal accumulation of DDA after *in vitro* permeation experiments.

Results and Discussion

The analytical method developed to evaluate the DDA content was precise, accurate, robust and linear in the range of 0.05–20 µg/mL. The retention time of DDA was about 3.0 min, the limit of quantification was 0.05 µg/mL and the limit of detection was 0.003 µg/mL. The intra-day precisions and accuracies for 1.0 µg/mL of DDA were 4.2 % and 95.62 %, respectively. While the inter-day precisions and accuracies were 2.49 and 98.24 %, respectively.

The Table 1 shows the values of the DDA (20 µg/mL) extracted from the *stratum corneum* and the epidermis and dermis of pig ear skin.

Table 1: DDA extracted from the *stratum corneum* of the pig ear skin

	Standard DDA (20 µg/mL)	Stratum corneum n=3	Epidermis and dermis n=4
Peak area (n=4)	1091680	985315	1061697
Standard Deviation	18454	105667	11873
CV (%)	1.69	10.72	1.22
Concentration (µg/mL)	20	18,05	17,85
Extraction (%)	-	90,26	89,25

Causon⁵ recommends that the extraction does not have to exceed 15%. In this way, the analyses of the values of extraction allow to conclude that they are in accordance with the established limits.

Conclusion

A simple procedure has been set up and validated for the extraction and HPLC quantification of DDA in the epidermis. The procedure has good reproducibility, sensitivity and specificity resulting in a reliable method for biopharmaceutical studies of DDA distribution in the epidermis.

Although the procedure was validated only on pig ear skin, the same method can probably be adjusted for human skin, by simply changing of the extraction process. A trans-dermal system containing DDA was obtained, and it seems to be a promising drug carrier for such molecule into microemulsions.

Acknowledgment

This work was partially funded by CNPq and UEPB.

[1] Kriwet, K.; Muller-Goymann, C. C. *Int. J. Pharm.* 125(1995) 231.

[2] Escríbano, E. et al, *Eur. J. Pharm. Sci* 19(2003) 203.

[3] Djordjevic, L.; Primorac, M.; Stupar, M. *Int. J. Pharm.* 296(2005) 73.

[4] Martins, M. R. F. M.; Veiga, F. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 38(2002) 33.

[5] Causon, R. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.* 689(1997) 175.

Pharmaceutical Sciences World Congress

(PSWC2007) 3rd World Congress
of the Board of
Pharmaceutical Sciences
of FIP



22-25 April 2007

**RAI Congress Centre,
Amsterdam,
The Netherlands**



[DD-W-060] DICLOFENAC DIETHYLAMINE TRANSDERMAL MICROEMULSIONS: DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION

Silva, José Alexsandro¹; Bedor, Danilo César Galindo¹; Damasceno, Bolívar P. G. L.³; Oliveira, Anselmo Gomes²; Egito, E. Sócrates T.³; Santana, Davi Pereira¹.

¹*Federal University of Pernambuco, RECIFE, Brazil;* ²*UNESP, ARARAQUARA-SP, Brazil;*
³*Federal University of Rio Grande do Norte, NATAL-RN, Brazil*

Microemulsion (ME) is defined as an optically isotropic, transparent and thermodynamically stable mixture of oil and water, stabilized by a film of surfactants and frequently in combination with a co-surfactant. Because of its properties, especially of the ability to solubilize hydrophilic, lipophilic and amphiphilic drugs, microemulsions have a great potential as drug delivery system. The diclofenac diethylamine (DDA) is a non-steroidal anti-inflammatory drug able to form micelles and lyotropic liquid crystals in water. Besides, it interacts with the phospholipids of the skin and contributes to the increase of fluidity through the 'stratum corneum', increasing, therefore, the cutaneous permeability. The aim of this study was to develop a new ME carrier system by using the pseudo-ternary phase-diagram (PTPD) to identify the better ME region. Moreover, the topical ME system was physicochemically characterized. Also, the analytical method to quantify the DDA was validated. The incorporation rate of the topical ME selected from the PTPD was evaluated by spectrophotometry at the wavelength of 282nm. The physicochemical characterization included: macroscopic aspects, pH, conductivity, rheology, refractive index, apparent density and mean particle size. The technique used to determine the ME regions in the PTPD was simple and reliable, producing ME systems with a high incorporation rate of $89.60 \pm 14.19\%$ of DDA. The analytical method developed to evaluate the DDA content was precise, accurate, robust and linear in the range of 5–35 µg/mL. The limit of detection was 0.61 µg/mL and the limit of quantitation was 0.92 µg/mL. The intra-day precisions and accuracies were 2.1% and 104.3%, respectively, for 20 µg/mL of DDA. The inter-day precisions were 3.5% and the inter-day accuracies were 101.64%, respectively. Therefore, this method can be used to quantify DDA in ME formulations. In conclusion, a trans-dermal system containing DDA was obtained, and it seems to be a promising drug carrier for such molecule.

Date: Wednesday, April 25, 2007

Session Info: Poster presentation: Formulation, Delivery, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology