



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA KISHISHITA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO
BIOFARMACOTÉCNICA/FARMACODINÂMICA DE FORMULAÇÕES TÓPICAS
CONTENDO BETAMETASONA**

RECIFE

2019

JULIANA KISHISHITA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO
BIOFARMACOTÉCNICA/FARMACODINÂMICA DE FORMULAÇÕES TÓPICAS
CONTENDO BETAMETASONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Leila Bastos Leal

Co-orientadora: Dra. Giovana Damasceno Sousa

RECIFE

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

K622d Kishishita, Juliana.
Desenvolvimento e avaliação biofarmacotécnica/farmacodinâmica de
formulações tópicas contendo betametasona / Juliana Kishishita. – 2019.
115 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Leila Bastos Leal.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Betametasona. 2. Óleo de Palmeira. 3. Tecnologia farmacêutica. 4.
Nanotecnologia. 5. Técnicas in vitro. I. Leal, Leila Bastos (Orientadora). II.
Título.

615.4 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2019-163)

JULIANA KISHISHITA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO
BIOFARMACOTÉCNICA/FARMACODINÂMICA DE FORMULAÇÕES TÓPICAS
CONTENDO BETAMETASONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 28/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Leila Bastos Leal
Universidade Federal de Pernambuco
Orientadora - Presidente

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana
Universidade Federal de Pernambuco
Examinador Interno

Profa. Dra. Elayne Karine Souto de Melo
UNINASSAU-Centro Universitário Maurício de Nassau
Examinadora Externa

Aos meus pais Julieta e Mutsujiro, por toda dedicação e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus por absolutamente tudo, por ter me concedido o dom da vida, ter permitido que eu chegasse até aqui, e pelas pessoas maravilhosas que colocou na minha jornada, agradeço também pelos momentos de dificuldade e angústia que me fizeram mais forte para seguir. À Nossa Senhora, que cuida, protege e intercede por mim em todos os momentos.

Agradeço à minha família por confiar no meu potencial e acreditar que sou capaz. Ao meu pai Mutsujiro, meu exemplo de caráter, por ter me dado valores e me ensinado que estudar é o caminho, além de me amar sem nem precisar me dizer isso.

À minha mãe Julieta, que é a estrela da minha vida, que me ilumina, guia e cuida de mim, te agradeço por me incentivar em tudo, me amar e por estar sempre ao meu lado, te amo.

Aos meus irmãos em especial minha irmã Heloisa, aos meus sobrinhos: Gabriel e Maria Júlia, minha vó Luiza, agradeço por todo amor, apoio e compreensão.

Às amigas de sempre e para sempre, Gabi, Camylla e Joice, que considero como irmãs, meu obrigada por estarem comigo nos momentos alegres e nos difíceis também. Amo vocês meninas.

Às amigas que fiz na minha graduação, mas que levo em minha vida, em especial Aninha, Duda, Laysa e Pavla, independente da distância pós faculdade, nossos laços seguem firmes, minhas patinhas.

Agradeço aos amigos Irla, Maira, Belle, Edu, Guga, Karol, onde compartilhamos muito mais que uma rotina, obrigada por eu ter aprendido tantas coisas com vocês, vocês fizeram meus dias sempre mais felizes.

Ao amigo Wellithom, muito obrigado pela amizade que fizemos, lhe admiro demais, por quem você é, e gostaria de deixar isso registrado aqui.

À Francisco, pelo amor, carinho, parceria e alegria nos momentos compartilhados.

À minha orientadora, Leila, minha eterna gratidão por toda confiança depositada em mim, pelos conhecimentos passados, pelo carinho e amizade. Obrigada por tudo, inclusive por se preocupar com questões que vão além da vida acadêmica e por todo suporte dado para realização desse e de outros trabalhos. Deixo registrado minha admiração e respeito.

Ao Prof. Davi Santana, exemplo de pessoa e profissional, agradeço a confiança, os ensinamentos e experiências compartilhadas ao longo da minha trajetória no laboratório. Sou eternamente grata por todo suporte e oportunidades que me foram dadas, muito obrigada!

Ao Prof. Danilo pelos conhecimentos divididos, pelas ajudas dadas a mim e amizade durante todo o convívio no NUDFAC.

À grande família NUDFAC, hoje representada pelo Prof. Davi, Profa. Leila, Prof. Danilo, Ana Rosa, Asley, Belle, Camila, Carol Chagas, Carol Costa, Karol, Maira, Thalita, Wellithom, Beatriz, Júlia, Amélia, Alélia, Arnon, Rayane, Auryllane, Larissa e Henrique, obrigada pela convivência, momentos de descontração e apoio, eu não teria chegado aqui sem vocês.

Um agradecimento todo especial a Giovana, minha co-orientadora e grande amiga, você me inspira pelo seu exemplo, obrigada por tudo que aprendi com você desde o tempo da iniciação científica.

Às alunas de iniciação científica, em especial à Asley e Camila, que estiveram a postos para me ajudar, sempre com muita alegria e disposição.

Agradeço a Dr. Sílvia, veterinário do matadouro de Paulista, pela disponibilidade em contribuir com o trabalho, oferecendo meios para obtenção de pele suína para o estudo de absorção cutânea.

Ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE, na pessoa de Aíla pela disponibilidade da câmara climática, para realização do estudo de estabilidade acelerada.

A todos os voluntários que participaram do estudo de branqueamento, sem vocês, este trabalho não teria sido possível.

À Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade por todo o suporte, em especial a Júlio.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPE, Nerilin e Rilvan, pela disponibilidade de sempre.

À FACEPE, pela concessão da bolsa de mestrado.

E por fim, minha sincera gratidão a todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui e pudesse estar concretizando mais um ciclo, para que outros sejam iniciados, meu muito obrigada!

RESUMO

Os corticosteróides tópicos (CT) são as drogas mais utilizadas na prática dermatológica no tratamento de inflamações. O Valerato de Betametasona (VBM) é um corticosteróide potente, disponível comercialmente nas formas de creme, pomada e loção na concentração de 0,1%. A eficácia clínica *in vivo* de CT depende da biodisponibilidade (BD) no local da ação, que pode ser avaliada devido à sua característica de branquearem a pele, pelo seu efeito vasoconstritor. Uma possibilidade de redução de efeitos adversos dos CT, seria uma formulação que aumentasse a retenção do fármaco nas camadas da pele sem aumentar a quantidade absorvida. As microemulsões (MEs) são uma alternativa para a administração tópica de VBM, pois podem modificar a BD, por atuarem como sistemas de liberação controlada. MEs são sistemas que apresentam gotículas na escala nanométrica e são compostas por tensoativos, água e óleo. O óleo de licuri (*Syagrus coronata*) é extraído de uma palmeira brasileira, possui excelente espalhabilidade e penetração. A avaliação do potencial irritante de produtos é tradicionalmente realizada a partir do uso de animais de laboratório, porém métodos alternativos foram desenvolvidos a fim de substituir os testes *in vivo* na avaliação de segurança. Dito isto, este projeto visa desenvolver MEs contendo óleo de licuri, relizar avaliação biofarmacoténica e farmacodinâmica e determinar o potencial irritante, das formulações desenvolvidas e formulação comercial, contendo VBM. Para tanto, diagramas de fase pseudoternários foram construídos para desenvolver as MEs. As MEs obtidas foram caracterizadas quanto a centrifugação, pH, solubilidade em corante, potencial zeta, tamanho de gotícula e microscopia de luz polarizada (MLP). Foi avaliada também a estabilidade acelerada das formulações, além do estudo de liberação *in vitro*, permeação e retenção cutânea em pele de porco. O teste de branqueamento foi utilizado para avaliação farmacodinâmica das formulações. O potencial de irritação foi avaliado utilizando dois métodos alternativos (HET-CAM e CAM-TBS). Foram desenvolvidas e caracterizadas quatro microemulsões do tipo O/A, que foram veiculadas em gel de Carbopol® para incremento de viscosidade. Todas as formulações apresentaram pH na faixa de tolerância da pele; tamanho de gotícula de $14,67 \pm 0,2$ a $37,56 \pm 0,8$; potencial zeta negativo, entre -3,596 e -1,407 mV e mostraram-se isotrópicas através da MLP. Em geral, todas as formulações apresentaram maior retenção do fármaco do que a formulação comercial. A Formulação F3 exibiu maior retenção de VBM, quando comparada as outras formulações, sem aumento na quantidade permeada. Por esta razão, a F3 foi selecionada para o ensaio de branqueamento, e como resposta não houve diferença entre as concentrações testadas e entre o Betnovate® na avaliação farmacodinâmica. Todas as

formulações foram classificadas como não irritantes ou irritantes leves nos ensaios realizados. Os resultados indicam que as formulações desenvolvidas contendo óleo de licuri são alternativas promissoras, seguras e estáveis para a administração tópica de VBM, com destaque a F3, onde foi possível aumentar a retenção nas camadas da pele sem aumento da absorção cutânea, podendo ser uma alternativa viável na melhora da biodisponibilidade local, sem observação de efeitos sistêmicos.

Palavras-chave: Betametasona. Óleo de Palmeira. Tecnologia Farmacêutica. Nanotecnologia. Técnicas *In Vitro*.

ABSTRACT

Topical corticosteroids (TC) are commonly used in dermatological practice in the treatment of inflammation. Betamethasone Valerate (BMV) is a potent corticosteroid, commercially available in cream, ointment and lotion forms at a concentration of 0.1%. In vivo TC efficacy depends on their bioavailability (BA) at the site of the action, and can be evaluated by a simple technique, since this pharmacological class has a characteristic of bleaching the skin, by their vasoconstricting effect. Even though efficacy has been demonstrated, TCs adverse effects may limit its use, one possibility to reduce such effects are the development of a formulation that could increase drug retention in the skin without increasing the absorbed amount. Microemulsions (MEs) are an alternative for BMV topical administration, they can modify a BA because they act as controlled release systems. MEs are nanometric systems composed of surfactants, water and oil. The licuri oil (*Syagrus coronata*) is extracted from a Brazilian palm tree fruit, it has an excellent spreadability and penetration. Since the 1940s, the assessment of the potential irritant of products has been made using laboratory animals, but alternative methods were developed to replace the questioned in vivo tests in the safety assessment. So, this project aimed to develop microemulsions with licuri oil for the topical delivery of betamethasone, followed biopharmaceutical and pharmacodynamic assesment and to determine the irritant potential, by alternative methods, of developed formulations and the commercial product. For that, pseudoternals phase diagrams were constructed for MEs development. Developed MEs were characterized under centrifugation, pH, dye solubility, zeta potential, droplet size and polarized light microscopy. It was also performed the accelerated stability of the formulations, besides the study of release, permeation and cutaneous retention. The bleaching test was used to evaluate the formulations pharmacodynamics. The irritation potential assesment was made using two alternative methods, the chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS). Four O/A microemulsions were developed and characterized. After MEs characterization, they were based on Carbopol® gel for viscosity increase. All formulations had pH values in the skin tolerance range; droplet size of 14.67 ± 0.2 to 37.56 ± 0.8 ; negative zeta potential, between -3.596 and -1.407 mV and was shown to be isotropic by polarized light microscopy. In general, all formulations showed bigger drug retention compared to commercial product. Formulation F3 presented higher BMV retention when compared with other formulations, without increase in the drug permeated amount. For this reason, F3 was selected for the bleaching assay, and as a response was not difference between the tested formulations and between Betnovate® on the pharmacodynamic evaluation. All formulations

were classified as non-irritant or mild irritants in HET-CAM and CAM-TBS assay. The results indicate that developed formulations containing licuri oil are promising, safe and stable alternatives for the BMV topical administration, especially F3, where it was possible to increase the retention in the layers of the skin without increasing the skin absorption, being an alternative improvement in local bioavailability, without observing systemic effects.

Key-words: Betamethasone. Palm Oil. Technology pharmaceutical. Nanotechnology. *In Vitro* Techniques.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática da estrutura da pele.....	27
Figura 2 –	Compartimentos da célula de difusão de Franz.....	29
Figura 3 –	Remoção de uma camada de estrato córneo com uma fita adesiva.....	30
Figura 4 –	Estrutura química do 17- valerato de betametasona (VBM).....	33
Figura 5 –	Representação esquemática de um diagrama de fases, onde cada vértice é representado por um dos componentes da mistura (fase aquosa, fase oleosa e mistura de tensoativos).....	36
Figura 6 –	Gráfico demonstrando a distribuição dos tipos de fármacos veiculados em microemulsões em 5 anos (2011-2016).....	38
Figura 7 –	Cacho de Licuri (<i>Syagrus coronata</i>); fruto e amêndoa.....	40
Figura 8 –	Incubação dos ovos em chocadeira com rotação automática.....	60
Figura 9 –	Remoção da membrana da casca.....	61
Figura 10 –	Membrana Corioalantoide (MCA) delimitada por anel de silicone.....	62
Figura 11 –	Representação esquemática da aplicação sequenciada com remoção sincronizada e horários das medidas de branqueamento.....	64
Figura 12 –	Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 80®, PEG 400, óleo de Licuri e água para proporções T/Co 2:1 e T/Co:óleo 9:1. EHL: 13,87.....	67
Figura 13 –	Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 80®, PEG 400, óleo de Licuri e água para proporções T/Co 3:1 e T/Co:óleo 9:1. EHL: 14,15.....	68
Figura 14 –	Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 80®, PEG 400, óleo de Licuri e água para proporções T/Co 5:1 e T/Co:óleo 9:1. EHL: 14,39.....	68
Figura 15 –	Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 80®, PEG 400, óleo de Licuri e água para proporções T/Co 7:3 e T/Co:óleo 9:1. EHL: 13,99.....	69
Figura 16 –	Cromatograma referente ao ponto 5 µg/mL da curva padrão.....	71
Figura 17 –	Cromatograma referente a microemulsão placebo.....	71
Figura 18 –	Curva de Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração do VBM em fase móvel.....	72

Figura 19 – Curva de Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração do VBM em tampão fosfato.....	72
Figura 20 – Gráfico referente à análise da estabilidade das amostras pré-extração por 7 dias.....	75
Figura 21 – Teste de corante realizado para a ME1 com 0,2% de VBM.....	77
Figura 22 – Fotomicrografias ao microscópio óptico de luz polarizada das microemulsões placebos; após adição de 0,2% de VBM e Betnovate® creme.....	81
Figura 23 – Espalhabilidade das formulações estudadas.....	83
Figura 24 – Perfil de liberação in vitro das formulações desenvolvidas utilizando membrana sintética de ésteres de celulose 0,45 μm	88
Figura 25 – Gráfico da quantidade retida de VBM no EC (μg) pela técnica de tape stripping após 6 h de absorção das formulações desenvolvidas e Betnovate® (REF).....	90
Figura 26 – Gráfico da quantidade retida de VBM (μg) na epiderme/derme após 6 h de absorção das formulações desenvolvidas e Betnovate® (REF).....	91
Figura 27 – MCA após aplicação dos controles.....	95
Figura 28 – Gráfico do Δa x tempo após remoção das formulações de VBM, após 2 horas de contato.....	99
Figura 29 – Gráfico do Δa x tempo após remoção das formulações de VBM, após 6 horas de contato.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA – RN nº 18/2014.....	43
Tabela 2 –	Métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA – RN nº 31/2016.....	44
Tabela 3 –	Composição centesimal das microemulsões desenvolvidas.....	52
Tabela 4 –	Composição centesimal do gel de carbopol.....	53
Tabela 5 –	Graduação das alterações observadas na membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.....	61
Tabela 6 –	Classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM.....	61
Tabela 7 –	Classificação final do ensaio CAM-TBS.....	63
Tabela 8 –	Solubilidade do VBM em diferentes tensoativos e óleos.....	66
Tabela 9 –	Composição das formulações obtidas nos diagramas pseudoternários.....	70
Tabela 10 –	Repetibilidade do VBM.....	73
Tabela 11 –	Reprodutibilidade em dias diferentes com analistas diferentes do VBM.....	73
Tabela 12 –	Exatidão VBM.....	74
Tabela 13 –	Recuperação de VBM em estrato córneo e pele de porco (epiderme e derme).....	74
Tabela 14 –	Máxima incorporação de VBM nas microemulsões.....	76
Tabela 15 –	Valores de pH, Potencial Zeta, tamanho de gotícula e índice de polidispersão das microemulsões desenvolvidas.....	79
Tabela 16 –	Doseamento das formulações desenvolvidas e Betnovate® creme.....	82
Tabela 17 –	Avaliação da estabilidade das formulações contendo VBM no tempo zero.....	84
Tabela 18 –	Avaliação da estabilidade das formulações contendo VBM no tempo 90 dias.....	85
Tabela 19 –	Avaliação da estabilidade das formulações contendo VBM no tempo 180 dias.....	85

Tabela 20 –	Quantidade liberada após 12h ($Q_{12} \pm D.P.$), Taxa de liberação $\pm D.P.$, e modelo cinético do VBM nas formulações.....	87
Tabela 21 –	Média $\pm$ DP da quantidade retirada de fármaco no EC e epiderme/derme após 6h de absorção das formulações desenvolvidas e Betnovate®.....	91
Tabela 22 –	Resultados do teste HET-CAM (média $\pm D.P.$) e classificação final.....	94
Tabela 23 –	Resultados do teste CAM-TBS (média $\pm D.P.$) e classificação final.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3R's	<i>Reduce, Replace, Refine.</i>
A/O	Água em óleo.
AMP	Aminometil propanol.
ANOVA	Análise de Variância.
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
BCOP	Teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina.
BD	Biodisponibilidade.
BE	Bioequivalência.
BraVAM	<i>Brazilian Center for Validation of Alternative Methods.</i>
CAM	Membrana corioalantóide.
CAM-TBS	<i>Chorioallantoic Membrane –Trypan Blue Staining.</i>
CCAC	<i>Canadian Council on Animal Care.</i>
CCAC	<i>Canadian Council on Animal Care.</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
CT	Corticosteróides tópicos.
D.P.	Desvio Padrão.
DLS	<i>Dyanamic Light Scattering.</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DOU	Diário Oficial da União
DPK	Dermatofarmacocinética.
DPR	Desvio padrão relativo.
EC	Estrato córneo.
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternatives Methods.</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid.</i>
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo.
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
EMEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle.</i>
F. BRAS	Farmacopeia Brasileira.
FDA	<i>Food and Drug Administration.</i>
GCs	Glicocorticoides.

GHS	Sistema Harmonizado Globalmente.
GT	Glicocorticoides tópicos.
HET-CAM	<i>Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane.</i>
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.</i>
IL	Irritante leve.
IM	Irritante moderado.
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.
IS	Irritante severo.
ISPN	Instituto Sociedade, População e Natureza.
JSAAE	<i>Japanese Society of Alternatives to Animal Experiments.</i>
KoCVAM	<i>Korean Center for the Validation of Alternative Methods.</i>
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco.
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências.
LogP	Coeficiente de Partição.
MCA	Membrana corioalantóide.
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações.
ME	Microemulsão.
NI	Não irritante.
NUDFAC	Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético.
O/A	Óleo em água.
OD490	Densidade óptica a 490 nm.
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development.</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico.
Q.S.P.	Quantidade suficiente para.
Q ₁₂	Quantidade liberada após 12 horas.
RE	Resolução.
REF	Medicamento referência.
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos.
RN	Resolução Normativa.
SPF	<i>Specif Pathogen Free.</i>
T:óleo	Tensoativos/óleo.

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
UN	Nações Unidas.
UV	Ultravioleta.
VBM	Valerato de Betametasona.

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento.
<	Menor que.
>	Maior que.
±	Mais ou menos.
®	Marca registrada.
µg	Micrograma.
µL	Microlitro.
µm	Micrômetro.
cm ²	Centímetro quadrado.
d	Diâmetro.
Ei	Espalhabilidade.
g	Força G.
g	Gramas.
h	Horas.
M	Concentração Molar.
m ²	Metro quadrado.
mg	Miligrama.
mL	Mililitro.
mm	Milímetro.
mM	Milimolar.
mV	Milivolts.
N	Normal.
Nm	Nanômetro.
°C	Grau Celsius.
p/p	peso/peso.
pH	Potencial hidrogeniônico.
r ²	Coeficiente de determinação.
Rpm	Rotações por minuto.
v/v	Volume/Volume.
x	<i>versus</i> .

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1	ABSORÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS	26
3.1.1	Pele.....	26
3.1.2	Avaliação <i>in vitro</i> da absorção cutânea	28
3.2	CORTICOSTEROIDES DE USO TÓPICO.....	30
3.2.1	Valerato de Betametasona.....	33
3.2.2	Avaliação farmacodinâmica <i>in vivo</i> de corticosteroides (ensaio de branqueamento).....	34
3.3	MICROEMULSÕES.....	35
3.4	ÓLEO DE LICURI.....	39
3.5	MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO	41
3.5.1	Ensaio em membrana corioalantóide HET-CAM e CAM-TBS.....	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1	MATERIAIS	48
4.2	EQUIPAMENTOS	48
4.3	SOLUBILIDADE DO VALERATO DE BETAMETASONA EM TENSOATIVOS E ÓLEO DE LICURI.....	49
4.4	DESENVOLVIMENTO DOS DIAGRAMAS DE FASE PSEUDOTERNÁRIOS.....	49
4.5	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE–UV).....	50
4.6	MÁXIMA INCORPORAÇÃO DE BETAMETASONA NAS MICROEMULSÕES	51
4.7	PREPARAÇÃO DAS MICROEMULSÕES CONTENDO BETAMETASONA E FORMULAÇÃO GELEIFICADA.....	52
4.8	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	53
4.8.1	Centrifugação	53
4.8.2	Determinação do pH	54

4.8.3	Teste de solubilidade em corante	54
4.8.4	Determinação do tamanho das gotículas e potencial zeta das microemulsões	54
4.8.5	Microscopia de luz polarizada	54
4.8.6	Doseamento de betametasona na formulação comercial Betnovate®	54
4.8.7	Doseamento de betametasona nas formulações desenvolvidas	55
4.8.8	Determinação da espalhabilidade	55
4.9	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES	55
4.10	ESTUDOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO, ABSORÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DA BETAMETASONA	56
4.10.1	Seleção do meio receptor	56
4.10.2	Obtenção e dermatomização da pele de porco	57
4.10.3	Montagem do sistema automatizado de células de difusão de Franz	57
4.10.4	Coleta e quantificação das amostras	57
4.10.5	Análise dos perfis de liberação e absorção cutânea	58
4.10.6	Avaliação de retenção cutânea	58
4.11	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE POR MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS	59
4.11.1	<i>Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)</i>	59
4.11.2	<i>Chorioallantoic Membrane –Trypan Blue Staining (CAM-TBS)</i>	62
4.12	AVALIAÇÃO FARMACODINÂMICA IN VIVO – ENSAIO DE BRANQUEAMENTO	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	SOLUBILIDADE DO VALERATO DE BETAMETASONA EM TENSOATIVOS, COTENSOATIVOS E ÓLEOS	65
5.2	DESENVOLVIMENTO DOS DIAGRAMAS DE FASE PSEUDOTERNÁRIOS.....	66
5.3	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE–UV).....	70
5.4	MÁXIMA INCORPORAÇÃO DE BETAMETASONA NAS MICROEMULSÕES	75
5.5	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	76
5.5.1	Centrifugação	76
5.5.2	Teste de solubilidade em corante.....	76
5.5.3	Determinação do pH.....	77

5.5.4	Determinação do tamanho das gotículas e potencial zeta das microemulsões	78
5.5.5	Microscopia de luz polarizada	80
5.5.6	Doseamento de betametasona nas formulações desenvolvidas e formulação comercial Betnovate®creme	82
5.5.7	Determinação da espalhabilidade.....	82
5.6	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES	83
5.7	ESTUDOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO, ABSORÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DA BETAMETASONA	86
5.7.1	Análise dos perfis de liberação e absorção cutânea.....	86
5.7.2	Avaliação de retenção cutânea.....	89
5.8	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE POR MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS	93
5.8.1	Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM).....	93
5.8.2	Chorioallantoic Membrane –Trypan Blue Staining (CAM-TBS).....	96
5.9	AVALIAÇÃO FARMACODINÂMICA <i>IN VIVO</i> – ENSAIO DE BRANQUEAMENTO	98
6	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

Os corticosteróides de uso tópico são os fármacos mais utilizados na prática dermatológica no tratamento de diversas condições de caráter inflamatório, como quadros alérgicos, psoríase e dermatite atópica (SMITH et al., 1985; OH et al., 2017). No entanto, seu uso está associado a efeitos indesejáveis, que podem ser de manifestação local como atrofia da pele e/ou sistêmico, como a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Sendo os efeitos sistêmicos pouco observados a partir da administração tópica (DEL ROSSO, 2005).

A Betametasona é um corticosteróide potente, sem propriedades mineralocorticóides, disponível comercialmente nas formas de creme, pomada, loção e gel na concentração de 0,1% e 0,05%. Atualmente, estratégias tem sido desenvolvidas com o objetivo de otimizar as propriedades desses corticosteróides e possibilitar a redução dos seus efeitos adversos, como, por exemplo, a incorporação desses ativos em nanossistemas para permeação tópica, que tem possibilitado a redução de tais efeitos (ZHANG & SMITH, 2010; KASTURI; SAMMARITANO, 2016).

As microemulsões (MEs) são uma proposta interessante para a administração tópica de ativos visto que podem melhorar a biodisponibilidade, por atuarem como reservatórios capazes de controlar a liberação e por possuírem tensoativos que facilitam a permeabilidade dos ativos na pele pela desestruturação da camada córnea. Sistemas microemulsionados são definidos como sistemas constituídos por água, óleo e tensoativos, apresentando-se na forma líquida, não viscosa, transparente, com comportamento newtoniano, opticamente translúcida, isotrópicos e termodinamicamente estável (HOAR & SCHULMAN, 1943; SCHULMAN, et al., 1959; LAWRENCE & REES, 2012; MCCLEMENTS, 2015).

Os óleos vegetais têm ganhado destaque como componente da fase oleosa de MEs, pois são biodegradáveis, renováveis e menos tóxicos/irritantes. O licuri (*Syagrus coronata*) é fruto de uma palmeira típica do semiárido e cerrado do Brasil e de sua amêndoa é extraído um óleo com alto teor de ácidos graxos saturados de cadeias médias (ácidos caprílico, cáprico e láurico), que são inclusive mais curtas que as do óleo de coco. Isso confere ao óleo excelente espalhabilidade e penetração, além de apresentar excelentes propriedades emolientes, quando utilizadas em preparações farmacêuticas e cosméticas (ZAMBIAZI, 2007; QUEIROGA, 2010; LEAL et al., 2013).

A via de administração tópica apresenta vantagens sobre outras vias, como a ausência de efeito de primeira passagem hepática, a facilidade de aplicação e é considerada uma via completamente indolor. Entretanto, devido à característica da pele em ser uma barreira natural

do organismo à penetração de substâncias exógenas, existe uma dificuldade dos fármacos em penetrarem e permearem as camadas da pele, afim de atingirem o alvo farmacológico para exercer seu efeito. Com isso o desenvolvimento de sistemas efetivos ainda é um desafio (WILLIAMS e BARRY, 2004; LOYD & ALLEN, 2007; MONTENEGRO et al., 2016).

As formulações dermatológicas de aplicação tópica e ação local, são aquelas que agem nas camadas mais superficiais da pele, seja no estrato córneo (EC), epiderme viável e/ou derme. O veículo utilizado numa formulação tópica influencia diretamente a taxa e extensão da permeação do fármaco, levando a modificação da sua potência (STOUGHTON, 1987). O desafio consiste em desenvolver uma formulação que possa aumentar a retenção do fármaco nas camadas da pele sem aumentar significativamente a quantidade permeada, para aumento de eficácia e diminuição de efeitos adversos (STOUGHTON, 1987; FANG et al., 2002; WIEDERSBERG et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Após desenvolvidas, as formulações para administração tópica devem ser adequadamente avaliadas quanto a liberação do ativo a partir do veículo; a permeação do fármaco e sua retenção nas camadas cutâneas. Os métodos mais comuns para avaliar a absorção cutânea *in vitro* utilizam células de difusão estáticas e membranas sintéticas, trazem como vantagens, curto tempo de ensaio, menor custo quando comparado a outros métodos e boa reprodutibilidade dos resultados, porém, uma desvantagem, é a falta de informação sobre os efeitos do fluxo sanguíneo na absorção do fármaco, já que condições *in vivo* não podem ser totalmente reproduzidas (BRAIN et al., 2002; SHEN et al. 2014).

Os estudos de permeação e retenção cutânea utilizam o mesmo aparato dos estudos de liberação, com objetivo de avaliar a quantidade de fármaco que permeia a pele e a quantidade de fármaco retido nas camadas da pele. A pele humana e animal são utilizadas como membranas biológicas. A pele humana excisada é a biomembrana ideal, porém, por apresentar dificuldades de caráter bioético e logístico na sua obtenção, a pele suína é mais utilizada, considerando sua similaridade com a pele humana (SCHMOOK et al., 2001; CARVALHO, 2007).

Desde a década de 1940, a avaliação do potencial irritante de diversas substâncias químicas e produtos, como agrotóxicos, cosméticos e medicamentos dermatológicos, é realizada a partir do uso de animais de laboratório. Os conhecidos testes de irritação ocular e cutânea, usados com o objetivo de determinar o grau de irritabilidade, foram inicialmente descritos por John H. Draize (DRAIZE et al., 1944; DRAIZE, 1959).

Porém, inúmeros cientistas de diversas áreas, começaram a desenvolver métodos alternativos que substituíssem os questionados testes *in vivo*, para demonstrar a eficácia e segurança dos seus produtos. Métodos alternativos podem ser considerados como qualquer

método que possa ser usado para substituir, reduzir ou refinar o uso de experimentos com animais de laboratório, com a finalidade de minimizar o sofrimento, de acordo com o princípio dos 3R's descrito por William Russel e Rex Burch (WORTH; BALLS, 2002; ABREU et al., 2008).

Uma vez que o contato tópico e ocular são prováveis rotas de exposição humana a diversos produtos, a determinação do potencial irritante é uma base racional para avaliação de riscos no homem. Os métodos alternativos são capazes de predizer os efeitos que produtos e substâncias podem acarretar nos seres humanos, gerando informações sobre a sua segurança. Com isso, neste trabalho foram utilizadas duas metodologias alternativas na avaliação da irritabilidade ocular: o *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM) e o *Chorioallantoic Membrane –Trypan Blue Staining* (CAM-TBS).

Ambos são testes que utilizam a membrana corioalantoide (MCA) de ovos embrionados de galinha, esta é caracterizada por apresentar processo vascular e inflamatório semelhante ao tecido conjuntival de olhos de coelho (ICCVAM, 2010). O HET-CAM é um método útil em fornecer respostas qualitativas sobre os potenciais efeitos irritativos que podem ocorrer na conjuntiva após exposição da substância teste. Já o CAM-TBS, trata-se de uma variação do teste anterior, onde a resposta sobre a irritação é obtida por valores quantitativos da absorção de um corante marcador (LAGARTO et al., 2006).

Após a aplicação dérmica de formulações seguras contendo corticosteroídes, é possível observar o acontecimento de um efeito farmacodinâmico, característico dessa classe de fármacos, que é o branqueamento (clareamento) da pele, devido a sua ação vasoconstritora sobre os capilares da derme. Este fenômeno pode ser avaliado *in vivo* com auxílio de um equipamento capaz de detectar e quantificar o clareamento gerado (LIPPOLD & SCHNEEMANN, 1984; NOON et al., 1996).

Dito isto, este trabalho objetivou desenvolver microemulsões contendo o óleo de licuri (*Syagrus coronata*) como fase oleosa, para incorporação de betametasona; avaliar as características biofarmacotécnicas; o potencial irritante (através de métodos alternativos ao uso de animais) e o efeito farmacodinâmico das formulações desenvolvidas e de uma formulação comercial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e avaliar características biofarmacotécnicas e farmacodinâmicas de formulações tópicas microemulsionadas contendo betametasona.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a solubilidade da betametasona em tensoativos e óleo de licuri;
- Desenvolver e utilizar diagramas pseudoternários para obtenção e identificação de regiões microemulsionadas utilizando óleo de licuri como fase oleosa;
- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) para quantificação da betametasona nas formulações em estudo e nos ensaios de liberação e permeação cutânea *in vitro*;
- Realizar caracterização dos sistemas obtidos: centrifugação, pH, solubilidade em corante, potencial zeta, tamanho de gotícula, microscopia de luz polarizada, doseamento do fármaco e espalhabilidade;
- Avaliar a estabilidade física e química das formulações;
- Avaliar a cinética de liberação *in vitro* de betametasona a partir das formulações desenvolvidas e do Betnovate® creme;
- Avaliar absorção e retenção cutânea da betametasona a partir das formulações desenvolvidas e do Betnovate® creme;
- Avaliar e comparar o potencial irritante das microemulsões e Betnovate® creme utilizando métodos alternativos ao uso de animais;
- Avaliar o branqueamento *in vivo* de formulação desenvolvida na concentração de 0,1% de fármaco; na concentração de 80% de saturação do fármaco e Betnovate® creme.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ABSORÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS

A via de administração tópica tem destaque como alternativa promissora na administração de fármacos, já que apresenta ausência de efeito de primeira passagem hepática, é uma via indolor e de fácil aplicação, levando à adesão por parte dos pacientes. De fato, a pele oferece vantagens como uma via de administração de ativos, embora sua natureza de barreira torne difícil para a maioria dos fármacos penetrarem e permearem através dela (MONTENEGRO et al., 2016), com isso o desenvolvimento de sistemas efetivos ainda é um desafio. As formulações dermatológicas de aplicação tópica e ação local, são aquelas que agem nas camadas mais superficiais da pele, seja no estrato córneo (EC), epiderme viável e/ou derme (SILVA et al., 2009).

A função primordial da pele é a proteção do organismo diante de agentes externos de caráter físico, químico e biológico, ou seja, estando íntegra e em seu equilíbrio, a pele é uma barreira eficiente contra a penetração e permeação de substâncias exógenas (WILLIAMS e BARRY, 2004).

Por esta razão, a grande dificuldade encontrada na absorção cutânea de fármacos é a necessidade de ultrapassar o EC, já que o ativo deve apresentar características adequadas, relativas as suas propriedades físico-químicas, incluindo massa molecular, solubilidade, coeficiente de partição e constante de dissociação (LOYD & ALLEN, 2007). Além das propriedades físico-químicas dos fármacos, outros fatores influenciam a penetração percutânea, como o veículo; dose e duração de tratamento; vias sub-anatômicas; variabilidade populacional; condições da superfície da pele; transformação metabólica e fotoquímica do ativo; cinética de excreção, e outros. Com isso, novos sistemas de liberação estão sendo usados para melhorar a entrega de fármacos na pele, possibilitando a passagem pelo EC e o aumento da retenção.

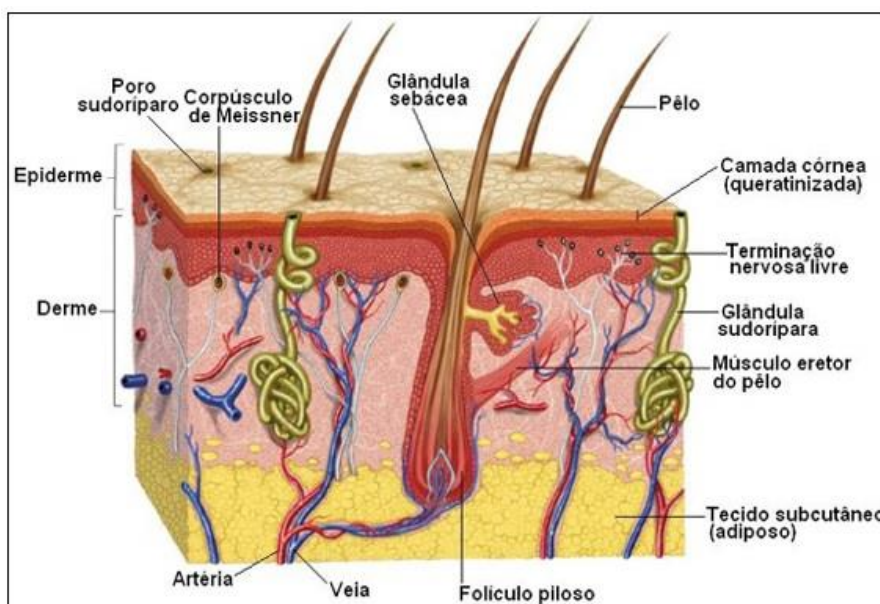
3.1.1 Pele

A pele é conhecida por ser o maior órgão do corpo humano, em indivíduos adultos apresenta uma área total de aproximadamente 2 m², de 1 a 4 mm de espessura, de acordo com a região do corpo, correspondendo em torno de 16% da massa corporal. A pele representa uma barreira de proteção entre o organismo e o ambiente externo, e é caracterizada por ser flexível, semipermeável e resistente, além de ser capaz de impedir a entrada de agentes externos como

bactérias, fungos e toxinas. Sendo responsável também por regular a temperatura corporal, produzir suor, evitar a perda de água transepidermal e manter o equilíbrio eletrolítico (KEDE & SABATOVICH, 2003; DANGELO & FATTINI, 2005).

Em termos gerais, ela pode ser dividida em três camadas, visualizando da parte mais externa para a interna, temos a epiderme, derme e hipoderme ou tecido subcutâneo (figura 1) (DANGELO; FATTINI, 2005).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele.



Fonte: <https://www.auladeanatomia.com/novosite/sistemas/sistema-tegumentar/> - acesso em 13/11/2018.

A epiderme é a camada mais externa, não apresenta sistema vascular e sua espessura é variável, a depender da região corporal, sendo aproximadamente entre 15 e 150 μm , chegando até 600 μm nas plantas dos pés e das mãos. É um tecido estratificado, onde é possível distinguir quatro camadas: córnea, granulosa, espinhosa e basal (mais interna) (TOSATO, 2010).

A camada córnea, conhecida como estrato córneo (EC) é a camada mais externa da pele com cerca de 10-15 μm de espessura, é composta por células mortas preenchidas de queratina (corneócitos) incorporadas em uma matriz lipídica. Ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres organizados em bicamadas lamelares cristalinas fazem parte da composição dessa matriz lipídica, com isso, a estrutura do EC foi dita como um “sistema de tijolo e argamassa” por Michaels e colaboradores (1975). Tal estrutura confere a forte característica hidrofóbica dessa

camada da pele, sendo a principal barreira à penetração de substâncias (MOSER et al., 2001; PATHAN & SETTY, 2009).

Em teoria, após a aplicação de uma formulação na pele, o ativo contido no veículo pode atravessar essa barreira por três vias: transcelular, intercelular e através dos apêndices cutâneos. Na via transcelular, o fármaco se difunde pelas membranas dos corneócitos e pela matriz lipídica. Na intercelular, o fármaco se difunde apenas pela matriz lipídica, desviando os corneócitos. Já pelos apêndices cutâneos, os fármacos podem permear a pele principalmente pelos folículos pilosos. (MOSER et al., 2001; BARRY, 2004; BOLZINGER et al., 2012).

A derme, camada disposta abaixo da epiderme, é o principal local de absorção de substâncias exógenas, formada por tecido conjuntivo, apresenta fibras de colágeno e elastina e está subdividida em duas camadas: a derme papilar, mais superficial e em contato com a epiderme, que confere resistência à pele e é responsável pela nutrição da mesma, e a derme reticular, que confere elasticidade. A partir da derme emergem os apêndices cutâneos como folículos pilosos e glândulas sebáceas, além das glândulas sudoríparas (DANGELO & FATTINI, 2005).

A hipoderme ou também chamada de tecido subcutâneo, é a camada mais profunda da pele, formada por um tecido conjuntivo frouxo, apresentando lóbulos de células de gordura, delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos. Além de ser um reservatório energético, essa estrutura protege contra traumas físicos (TOSATO, 2010).

3.1.2 Avaliação *in vitro* da absorção cutânea

A absorção cutânea de fármacos vem sendo avaliada a partir de várias técnicas *in vitro* e *in vivo*, nesse cenário, recomendações sobre essas metodologias foram coletadas por órgãos reguladores do mundo inteiro para produzir diretrizes para execução de tais métodos. A academia e a indústria têm usado amplamente as técnicas *in vitro* para avaliar a liberação e a permeação de fármacos, a partir de formulações tópicas, visto que esses dados podem predizer o comportamento da absorção dérmica em humanos.

Os métodos mais comuns para avaliar a absorção cutânea *in vitro* empregam células de difusão, que trazem como vantagens, o baixo custo, curto tempo de ensaio e boa reprodutibilidade dos resultados, porém, uma desvantagem, é a falta de informação sobre os efeitos do fluxo sanguíneo na absorção do fármaco, uma vez que as condições *in vivo* não podem ser completamente reproduzidas (BRAIN et al., 2002; BARTOSOVA & BAJGAR, 2012; SHEN et al. 2014).

O guia OECD TG 428 (OECD, 2004), sobre o método *in vitro* de absorção cutânea, traz as orientações para realização do estudo, que é conduzido com pele excisada, utilizando células estáticas de difusão, onde a mais usada é a célula de Franz, descrita por Thomas J. Franz em 1975 (FRANZ, 1975). Esta célula é composta por dois compartimentos, o doador e o receptor, que durante o experimento, são separados por uma membrana, seja sintética ou natural (figura 2).

Figura 2 - Compartimentos da célula de difusão de Franz.



Fonte: Elaborado pelo autor.

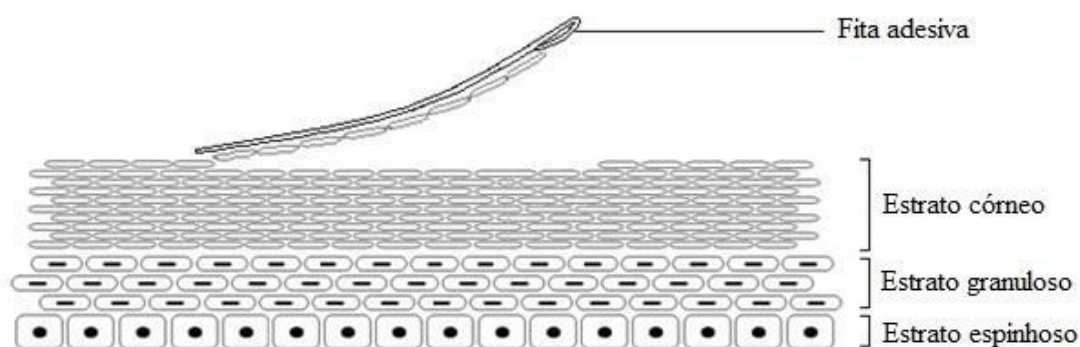
Tratando-se da avaliação de absorção cutânea, a pele excisada é usada como membrana natural e é disposta entre os compartimentos, com o lado do estrato córneo (EC) voltado para o compartimento doador e a formulação teste é aplicada na superfície dessa pele.

É possível utilizar amostras de pele humana ou de outros mamíferos, como macacos e porcos, como biomembrana para esse estudo. O modelo ideal de biomembrana é a pele humana *ex vivo*, porém, devido à dificuldade de obtenção e às questões éticas, os modelos animais são largamente utilizados, onde a pele de porco apresenta-se como um modelo adequado, devido a sua capacidade preditiva e similaridade com a pele humana (SCHMOOK et al., 2001).

Na câmara receptora das células, temos um líquido receptor que simula o fluxo sanguíneo e é agitado continuamente, além de ser mantido à temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura da pele *in vivo*). A quantidade de fármaco que permeia do doador para o receptor é determinada em

função do tempo pela remoção do fluido receptor em intervalos pré-definidos (OECD, 2004; SILVA et al., 2010; SIMON et al., 2016). Ao final do ensaio de absorção cutânea, é possível também quantificar o fármaco remanescente no EC, retirando essa camada de células pela técnica de *tape-stripping*, mostrada na figura 3, que consiste na retirada sequencial de camadas do EC com o uso de fitas adesivas adequadas (NARKAR, 2010), como ilustrado abaixo:

Figura 3 - Remoção de uma camada de estrato córneo com uma fita adesiva.



Fonte: KANFER, 2010.

No entanto, quando utilizamos uma membrana sintética na célula de difusão, é possível analisar a liberação do fármaco da formulação, visto que essa barreira não é limitante para a passagem do fármaco como as membranas naturais. Assim, a liberação irá depender principalmente da atividade termodinâmica e da solubilidade do fármaco no veículo, dentre outros fatores. As membranas mais utilizadas são as de acetato de celulose, nitrato de celulose, nylon e polidimetilsiloxane (CARVALHO, 2007).

3.2 CORTICOSTEROIDES DE USO TÓPICO

Os corticosteróides foram introduzidos na terapêutica por volta do ano de 1950, tendo como primeira indicação, o tratamento de artrite reumatoide, e a partir disso, seu uso se estendeu a diferentes especialidades médicas, como a dermatologia, a endocrinologia, a oncologia e a oftalmologia (FINAMOR et al., 2002). Essa classe de medicamentos é caracterizada por serem hormônios de natureza quimicamente esteroidal, endocrinamente produzidos nas glândulas suprarrenais e constituem dois grupos: os glicocorticoides e os mineralocorticoides (FUCHS & WANNMACHER, 1998).

Os glicocorticoides (GCs) endógenos são essenciais ao organismo e regulam diversos processos fisiológicos envolvidos no metabolismo intermediário, homeostase, função imune,

cardiovascular, reprodução e cognição (BOARDMAN et al., 2014). Os GCs abrangem um amplo espectro de ações terapêuticas, como anti-inflamatórias, imunossupressoras, antiproliferativas e vasoconstritoras (efeito constritor nos capilares da derme), tendo também efeitos apoptóticos e antiangiogênicos (BANCIU et al., 2006; LEBWOHL et al., 2013 GOODMAN; GILMAN, 2005). São prescritos para tratar várias condições de caráter inflamatório, em sua grande maioria, como por exemplo, asma, quadros alérgicos, dermatite atópica e psoríase (OH et al., 2017).

Os glicocorticoides tópicos (GT) são a classe de medicamento mais prescritos pelos dermatologistas. O tratamento com formulações de GT é eficaz, de fácil administração, bem aceito pelos pacientes e seguro quando usados corretamente (WIEDERSBERG et al., 2008).

Por outro lado, os GT estão associados a efeitos colaterais locais e sistêmicos, que limitam seu uso. Como efeito local podemos citar a atrofia e aparecimento de estrias na pele, enquanto que efeitos sistêmicos, em menor proporção, incluem a síndrome de Cushing, supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e até desenvolvimento de catarata (DEL ROSSO, 2005).

Dessa forma, um GT ideal para o uso terapêutico em doenças inflamatórias da pele deve ser capaz de difundir-se através do estrato córneo para atingir concentrações terapêuticas na epiderme/derme, sem ser absorvida a ponto de gerar altos níveis na circulação sistêmica, principalmente em uso crônico de GTs (WIEDERSBERG et al., 2008; FERENCE & LAST, 2009).

Os efeitos farmacológicos anti-inflamatórios e imunossupressores de GT parecem ser mediados, em grande parte pela regulação de genes responsivos a corticosteroides. É preciso que a molécula entre na célula alvo, para que, no citoplasma, ela se ligue ao receptor de glicocorticóide, formando um complexo que é rapidamente internalizado no núcleo, em seguida, liga-se no DNA para estimulação ou inibição da transcrição, afim de regular o processo inflamatório (HUGHES & RUSTIN, 1997; WIEDERSBERG et al., 2008).

Os receptores para glicocorticoides na pele estão situados, em maior proporção, nas células fibroblásticas presentes na derme, estas células estão envolvidas diretamente na resposta inflamatória e no sistema imune. Estudos com cultura de células mostraram que, além dos fibroblastos, o citoplasma dos queratinócitos contém receptores que se ligam a glicocorticóides com alta afinidade, sugerindo que o local de ação para GT são tanto células epidérmicas quanto dérmicas (PONEC & POLANO, 1979; PONEC & KEMPENAAR, 1981).

A eficácia clínica *in vivo* de GT depende da biodisponibilidade na pele no local da ação. Para atingir as células-alvo, a molécula de GT precisa permear o estrato córneo, que representa a maior barreira da absorção cutânea (MOSER et al., 2001), esse processo de absorção de um

fármaco a partir de uma formulação tópica, é um processo complexo (WILLIAMS & RIVIERE, 1995), onde as características físico-químicas do fármaco e do veículo, somado as condições fisiológicas da pele podem afetar a liberação e penetração cutânea (CROSS et al., 2003).

Segundo Wiedersberg et al. (2008), para um GT veiculado topicamente ser absorvido para gerar o efeito farmacológico é preciso que o fármaco:

- 1º seja liberado da formulação;
- 2º Penetre na camada mais externa da pele, o EC e permei/difunda através do EC,
- 3º Particione do EC para a epiderme viável e a derme e
- 4º Dentro da epiderme viável/derme, difunda para alcançar os receptores de GT.

O efeito vasoconstritor (observado pelo branqueamento da pele no local de aplicação) de GT pode contribuir para sua atividade anti-inflamatória, na diminuição do eritema local. No entanto, o mecanismo pelo qual os GTs realizam essa vasoconstrição ainda não é completamente elucidado. Por fim, a eficácia clínica é significativamente influenciada pela estrutura molecular do corticoide, pela formulação e até certo ponto, pela concentração aplicada do fármaco. (NOON et al., 1996).

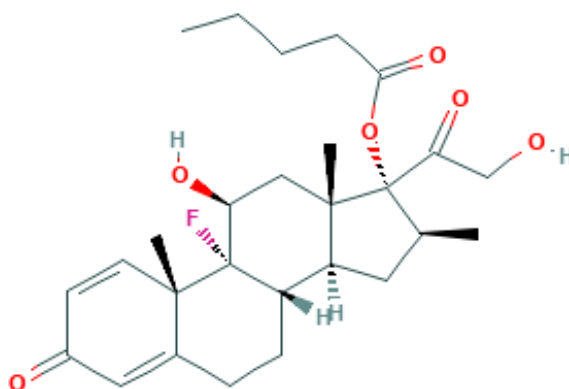
Lippold e Schneemann (1984) mostraram que o branqueamento da pele a partir da aplicação de do 17-benzoato de betametasona aumentou proporcionalmente com a concentração do fármaco, atingindo a resposta máxima quando a concentração foi igual à solubilidade do ativo no veículo. Por outro lado, Katz (1972) já tinha chegado à conclusão que a alta solubilidade do fármaco no veículo e um baixo coeficiente de partição entre o estrato córneo (EC) e o veículo levaram à penetração deficiente do fármaco no EC e baixa biodisponibilidade. Com isso, é possível observar que o efeito final, depende de muitos fatores envolvidos e a resposta pode mudar de fármaco para fármaco. Corroborando com isso, vários estudos, utilizando o ensaio de branqueamento, mostrou que existiam grandes diferenças entre genéricos e medicamentos referência de um mesmo glicocorticoide, na mesma concentração, porém em diferentes veículos (STOUGHTON, 1987).

A maioria dos GTs que são usados na terapêutica são derivados sintéticos da hidrocortisona, que dispõe de quatro anéis esteroidais, e apresenta baixa potência e uma curta duração de ação. Diversas modificações moleculares podem ser realizadas a fim de modificar a potência do GT. Como por exemplo, adição de grupos éster ou acetal ao anel D, aumenta a lipofilia e resistência metabólica do ativo, como é o caso do 17- valerato de betametasona (WIEDERSBERG et al., 2008).

3.2.1 Valerato de Betametasona

O 17- valerato de betametasona (VBM) (figura 4) é um glicocorticoide potente, sem propriedades mineralocorticoide, de forma molecular $C_{27}H_{37}FO_6$ e peso molecular de 476,58 g/mol, é conhecido quimicamente como (8S,9R,10S,11S,13S,14S,16S,17R) - 9-fluoro - 11 - hydroxy - 17 - (2 hydroxyacetyl) 10,13,16 - trimethyl - 3 - oxo - 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 16, 17- dodecahydro - 3H cyclopenta [a] phenanthren - 17 - yl pentanoate (PUBCHEM, 2018).

Figura 4 - Estrutura química do 17- valerato de betametasona (VBM).



Fonte: Pubchem (2018).

Está disponível na forma de creme, pomada, loção e gel, na concentração de 0,1% (p/p) expressa como base de betametasona. Formulações dermatológicas contendo VBM são amplamente utilizadas para o tratamento de uma variedade de condições inflamatórias da pele (SMITH et al., 1985). O VBM oferece uma potência dez vezes maior do que a hidrocortisona e tem sido aplicada através de nanossistemas para permeação tópica, reduzindo os efeitos colaterais associados (ZHANG & SMITH, 2011; ABDEL-MOTTALEB et al., 2012).

O VBM é um fármaco altamente lipofílico, apresentando coeficiente de partição (Log P) de 3,6 (PUBCHEM, 2019). Por esta razão, modificações químicas são feitas para melhora de solubilidade e propriedades farmacocinéticas, por exemplo, a síntese de ésteres de betametasona, como o 17-valerato de betametasona, sintetizado com objetivo de melhorar o seu transporte através da pele. Para formulações sistêmicas, são utilizados outros ésteres e sais, como o 21-fosfato dissódico, que permite preparar soluções aquosas para injeção (MIOLO et al., 2009).

3.2.2 Avaliação farmacodinâmica *in vivo* de corticosteroides (ensaio de branqueamento)

A Biodisponibilidade (BD) é definida como a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração x tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina (BRASIL, 1999). Já a biodisponibilidade tópica, segundo FDA, pode ser definida como a "taxa e extensão na qual o fármaco é absorvido a partir da formulação e fica disponível no local da ação", geralmente representada por apenas alguns por cento da dose aplicada.

Os principais métodos para avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência (BE) tópica podem ser divididos em 2 abordagens: (a) *in vitro*, incluindo os ensaios de liberação e permeação cutânea; e (b) *in vivo*, que envolve os ensaios clínicos, ensaio farmacodinâmico (ex: vasoconstrição), a dermatofarmacocinética (DPK) e a microdiálise dérmica.

Até pouco tempo atrás, os métodos *in vitro* não poderiam ser utilizados em substituição a avaliação *in vivo* para testar a bioequivalência de produtos tópicos, devido à falta de correlação entre os dois tipos de métodos. Dessa maneira, os estudos clínicos e os estudos de resposta farmacodinâmica, este último aplicado apenas para corticoides, eram os únicos métodos aceitos pelo FDA para avaliar biodisponibilidade e bioequivalência de formulações tópicas (WIEDERSBERG et al, 2008; SHAH et al., 1998).

Os estudos farmacodinâmicos são relativamente fáceis de executar, expõe os sujeitos a uma pequena quantidade de formulação, por um curto período de tempo, são bastante reprodutíveis, e requerem um número relativamente pequeno de sujeitos (USA, 1995). Como resposta farmacodinâmica de GTs, temos a vasoconstrição da microvasculatura da pele, levando ao branqueamento (clareamento) no local de aplicação. O ensaio de avaliação do branqueamento, foi descrito pela primeira vez por McKenzie e Stoughton em 1962 (MCKENZIE & STOUGHTON, 1962). Desde então, o método foi modificado e ampliado para fornecer um meio confiável para testar GTs e suas formulações. A intensidade do branqueamento da pele foi correlacionada com a potência do fármaco e o grau de entrega do ativo através do EC.

O ensaio de branqueamento foi utilizado para medir a BD/BE de formulações contendo GTs em voluntários saudáveis e também na avaliação farmacodinâmica de diferentes doses e veículos para administração tópica de corticoides (STOUGHTON, 1987; WIEDERSBERG et al., 2009) e foi adotado em 1995 para determinação de BE pela Food and Drug Administration dos EUA (FDA), em um documento de orientação "Corticosteróides Dermatológicos Tópicos: Bioequivalência *In Vivo*" (USA, 1995). De acordo com este documento, a formulação teste é

aplicada para várias durações de dose, até 6 horas. No final do período de tratamento, a resposta de branqueamento da pele é medida com auxílio de um cromômetro até as próximas 24–28 horas após remoção do produto. A resposta de branqueamento (Δa) é dada em função do tempo.

O cromômetro quantifica a luz refletida de uma fonte de xenônio em três índices de cores: a escala L (claro-escuro), a escala A (vermelho-verde) e a escala B (amarelo-azul). Estes três valores são usados para definir um ponto no espaço tridimensional que caracteriza uma cor em termos absolutos (SMITH et al., 2002; WIEDERSBERG et al., 2008). Com isso, temos uma ferramenta simples e reprodutível, capaz de avaliar a potência de GTs a partir de diferentes veículos e doses, visto que esses fármacos não devem atingir a circulação sistêmica em concentrações pelas quais seja possível avaliar de forma convencional a sua eficácia.

3.3 MICROEMULSÕES

Diversos estudos demonstraram que os nanocarreadores são sistemas vantajosos para aplicações farmacêuticas e cosméticas e, dentre tais, as microemulsões ganham cada vez mais destaque.

Em 1943, Hoar e Schulman, levantaram a hipótese da existência de estruturas microscópicas em forma de emulsão em uma mistura transparente de óleo, álcool, água e um tensoativo catiônico. Aproximadamente quinze anos depois, Schulman et al. (1959) confirmaram a presença, nestes sistemas, por microscopia eletrônica, de pequenas estruturas semelhantes a emulsões e nomeou-as de “microemulsão” para definir um sistema constituído por água, óleo e tensoativos, sendo um líquido não viscoso, transparente, de comportamento newtoniano, opticamente isotrópico e termodinâmico estável (HOAR & SCHULMAN, 1943; SCHULMAN, et al., 1959). Que na verdade, o termo microemulsões para descrever esses veículos é um tanto equívoco, pois elas têm tamanho de gotícula na escala nanométrica (geralmente na faixa de 10 a 100 nm) (AZEEM et al., 2009).

Além de serem termodinamicamente estáveis, as microemulsões apresentam a capacidade de se formam espontaneamente (ou com pouca energia), porém requerem uma maior quantidade de tensoativos em comparação às emulsões, o que pode levar a um aumento do seu potencial de irritação (McCLEMENTS, 2012).

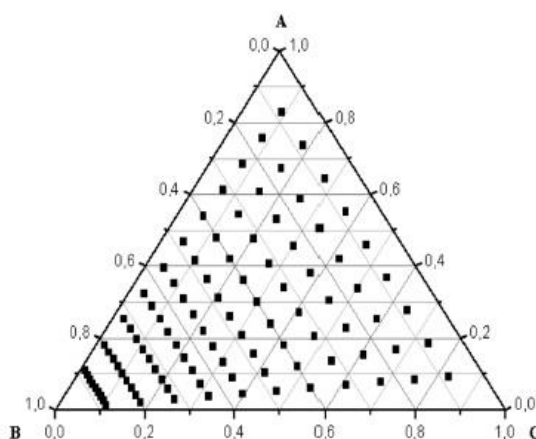
Tensoativos são compostos orgânicos que possuem comportamento anfifílico. A preferência dessas moléculas por um ambiente aquoso ou apolar é responsável pelo fenômeno de auto associação do tensoativo, podendo resultar em uma gama de estruturas micelares agregadas (BLANKSCHTEIN *et al.*, 1986).

A natureza química e a estrutura do tensoativo e óleo são fatores importantes na formulação e nas características físico-químicas finais dos sistemas microemulsionados obtidos (FORMARIZ et al., 2005; AJITH e RAKSHIT, 1995).

Devido às suas estruturas, os tensoativos na presença de água e óleo, adsorvem-se nas interfaces orientando-se de maneira que o grupo polar fique voltado para a fase aquosa e o grupo apolar para a fase oleosa, formando um filme ordenado nas interfaces, reduzindo então as tensões superficial e interfacial. Dessa forma, são capazes de solubilizar uma diversidade de substâncias polares e não polares em seus nanodomínios (PROSSER e FRANCES, 2001; ROSSI et al., 2007; MANDAL et al., 2013).

Para formar uma estrutura microemulsionada, o sistema deve conter microestruturas que envolvem a presença de uma fronteira entre as fases de óleo e água nas quais o tensoativo está localizado. Estes sistemas são normalmente formados apenas numa quantidade específica e estreita de concentrações para uma dada composição de tensoativo-óleo-água. A relação entre o comportamento de fase de diferentes misturas e sua composição é geralmente representada utilizando um diagrama de fase pseudoternário (figura 5), onde cada vértice irá representar: a mistura binária de dois componentes, tensoativo/co-tensoativo, água e óleo. Fora da região da microemulsão, a quantidade de tensoativo é muito baixa, sendo insuficiente para permitir a formação de uma fase de microemulsão única, levando à existência de um sistema multifásico (DAMASCENO et al., 2011; MONTENEGRO, 2016).

Figura 5 - Representação esquemática de um diagrama de fases, onde cada vértice é representado por um dos componentes da mistura (fase aquosa, fase oleosa e mistura de tensoativos).



Fonte: Damasceno, 2011.

Os fatores determinantes para a formação da microemulsão são as propriedades físico-químicas da fase oleosa, aquosa e dos tensoativos. Schulman e colaboradores (1959) forneceu algumas diretrizes para prever a formação de microemulsões:

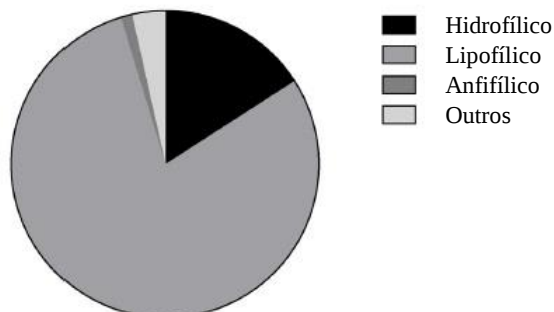
- [1] A produção de uma tensão interfacial muito baixa na interface água/óleo;
- [2] A formação de um filme interfacial de tensoativos muito fluido nessa interface e
- [3] A interação das moléculas do óleo com o filme interfacial de tensoativos.

A flexibilidade do filme interfacial é um parâmetro chave na determinação das possíveis estruturas a serem formadas e da capacidade de interconversão entre elas em um dado sistema de microemulsão. As transições das microemulsões óleo em água (O/A) para água em óleo (A/O) podem envolver a formação de diferentes fases (lamelar, hexagonal, bicontinua). E a redução da tensão interfacial e a fluidização do filme interfacial, é obtido, na maioria das vezes, pela adição de um cotensoativo de cadeia curta (STILBS, LINDMAN & KAPACKI, 1983; ABOOFAZELI et al., 1994).

Como vantagens, as microemulsões são capazes de: administrar fármacos na forma líquida; melhorar a biodisponibilidade e estabilidade devido seus pequenos tamanhos de gotículas; solubilizar e administrar drogas hidrofílicas e lipofílicas, além de se formarem espontaneamente com ingredientes relativamente simples e acessíveis (MCCLEMENTS, 2012; 2015).

Segundo levantamento feito por Callender e colaboradores (2017), a figura 6 mostra as classes de fármacos que foram distribuídos através de todos os tipos de sistemas de microemulsão, em cinco anos. Foi visto que das mais de 400 publicações referentes a microemulsão, os fármacos lipofílicos são a classe preferida para veiculação nesses sistemas (79,4%) seguidos dos fármacos hidrofílicos (15,9%). Os anfifílicos estão em quantidade insignificante (1,2%) e outras drogas, como as sensíveis ao pH representaram 3,5%.

Figura 6 - Gráfico demonstrando a distribuição dos tipos de fármacos veiculados em microemulsões em 5 anos (2011-2016).



Fonte: CALLENDER et al (2017).

Várias técnicas podem ser usadas para a caracterização de microemulsões. Na literatura, temos diferentes técnicas experimentais que podem ser usadas afim de se obter dados sobre a dinâmica e estrutura do sistema (KAHLWEIT et al., 1987). Entre as técnicas mais realizadas, temos: microscopia de luz polarizada para verificar a isotropia ou anisotropia do sistema; o espalhamento de luz, de raio X e de nêutrons a baixo ângulo para determinar o diâmetro da gotícula; ressonância magnética nuclear, para determinar a estrutura interna (ROSSETI, 2006); e alguns outros métodos mais simples e cotidianos, como aspectos macroscópicos, densidade, comportamento reológico, índice de refração, condutividade elétrica, potencial zeta (CONSTANTINIDES et al., 1995) e tamanho de gotícula pelo o espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dyanamic Light Scattering*), que são importantes para determinar o tipo de ME e caracterizá-la fisicamente (DAMASCENO, 2011).

Até hoje, MEs mostram ter a capacidade de incorporar o fármaco, controlando sua liberação, aumentar a solubilidade de fármacos poucos solúveis, e aumentar a biodisponibilidade. Além disso, são sistemas adequados para a maioria das vias de administração (LAWRENCE & REES, 2012).

Vários fatores podem afetar a permeação cutânea de fármacos em sistemas coloidais baseados em nanogotículas, incluindo sua partição entre o óleo e a água; sua solubilidade nos componentes do sistema; tamanho de gotícula; presença do fármaco na interface; uso de promotores de permeação, local ou caminho de absorção (KREILGAARD, 2002; LAWRENCE & RESS, 2012).

Nos últimos anos, as MEs foram consideradas uma estratégia atrativa para melhorar a entrega cutânea de ingredientes ativos hidrofílicos e lipofílicos em comparação com veículos convencionais. As MEs do tipo O/A são bem adequadas para entrega de drogas lipofílicas, enquanto microemulsões A/O são adequadas para a entrega de drogas hidrofílicas. Quando microemulsões são obtidas usando baixo volume da fase dispersa, o sistema conterá essencialmente gotículas de óleo ou água e sua viscosidade será muito baixa. A formulação resultante será adequada para muitas vias de administração (parentérica, oral, ocular), mas a sua aplicação tópica não é conveniente. Porém, uma alternativa para obter microemulsões com viscosidade adequada é a adição de agentes gelificantes específicos (TROTTA, PATTARINO, GASCO, 1996; PEIRA, SCOLARI, GASCO, 2001).

E como desvantagens, é importante lembrar que, no caso de microemulsões, os fármacos a serem incorporados, de acordo com sua natureza química, devem ser solubilizados em suas respectivas fases. Como resultado, a extensão da solubilização é limitada pelo volume de fase disponível. Isso pode ser limitante, dependendo da quantidade de fármaco necessária para o efeito desejado (CALLENDER et al., 2017).

Além disso, as microemulsões necessitam da presença de tensoativos em uma concentração ligeiramente superior à nanoemulsões, por exemplo (MCCLEMENTS, 2012). Alguns deles demonstram toxicidade, sendo aceitos até certas concentrações, reduzindo, portanto, a variedade de tensoativos disponíveis para uso em formulações. Isso também se aplica a certos óleos que demonstram algum grau de irritabilidade (DAMASCENO et al., 2011). Com isso, é importante a escolha racionalizada dos componentes e a preocupação com o desenvolvimento de sistemas seguros para a via de administração desejada.

3.4 ÓLEO DE LICURI

O Licuri ou Ouricuri (nomes populares), é cientificamente chamada de *Syagrus coronata*, pertencente da família *Arecaceae*, é uma palmeira típica do Brasil, que pode ser encontrada em regiões mais secas e áridas da Caatinga, nos territórios de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e norte de Minas Gerais. Produz frutos o ano inteiro, no entanto, março, junho e julho são os meses mais produtivos (NOBLICK, 1986; CREPALDI et al., 2001).

A região nordeste do nosso país contém uma variedade de plantas que produzem frutos ricos em ácido graxos, sendo uma potência nacional na produção de óleos vegetais. Seus frutos são agrupados em cachos (figura 7), que possuem em média, 1.350 coquinhos. Enquanto esses coquinhos ainda estão verdes, possuem polpa interna leitosa que irá se transformar em

amêndoa. A extração do óleo de Licuri é realizada pela torra dessas amêndoas, e posterior prensagem, com pressão e temperatura alta (QUEIROGA, 2010).

Figura 7 - Cacho de Licuri (*Syagrus coronata*); fruto e amêndoa.



Fonte: DoDesign-s.

O óleo extraído contém, aproximadamente 83,2% de ácidos graxos saturados de cadeia curta e média (ácido caprílico, cáprico e láurico), e tem ganhado destaque devido à sua vasta aplicabilidade (ZAMBIAZI, 2007). De acordo com sua composição, esse óleo apresenta excelente espalhabilidade, penetração cutânea e propriedades emolientes, quando utilizadas em preparações farmacêuticas e cosméticas (BONDAR, 1942; PEREIRA et al., 2005; TREVIZAM et al., 2014). Além de ser um óleo comestível, refinado para uso gastronômico, é uma opção para a produção de lubrificantes e biodiesel.

O óleo de Licuri é obtido, predominantemente, de forma extrativista por moradores e cooperativas da região Nordeste do Brasil desde a época colonial (MAIA et al., 2010). Na Bahia, existe uma empresa que processa e extrai o óleo de licuri para uso industrial na fabricação de sabão e cosméticos. Entretanto, essa produção, ainda que para uso em escala industrial, é realizada de forma artesanal em pequenas cooperativas, com base na agricultura familiar (DRUMOND et al., 2004).

Em 2013, foi publicada uma cartilha, “Boas Práticas de Manejo para o extrativismo sustentável do Licuri”, criada pelo Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN) em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), afim de contribuir para que o manejo seja feito de maneira sustentável, visando a manutenção da espécie e a continuidade das atividades de geração de renda.

3.5 MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Os esforços científicos na área da toxicologia tem como foco principal a proteção dos seres humanos e do meio ambiente contra os possíveis efeitos adversos de substâncias químicas, incluindo produtos farmacêuticos e cosméticos. A exposição a esses agentes pode ser de forma acidental ou intencional. Para garantir uma proteção adequada da saúde humana e do ambiente é essencial que seja verificado, o potencial que estes produtos apresentam para induzir efeitos irritantes e tóxicos (HOLMES, CRETON, CHAPMAN, 2010). Um dos possíveis efeitos da exposição tópica à substâncias químicas, é a irritação aos olhos, por isso, o potencial para causar irritação deve ser determinado (VINARDELL & MITJANS, 2008). Logo, bioensaios são necessários para avaliar a segurança desses produtos antes da inserção no mercado.

Desde a década de 1940, a avaliação do potencial irritante de diversos produtos e substâncias químicas, como agrotóxicos, cosméticos e medicamentos de uso tópico, é realizada a partir do uso de animais de laboratório. Os conhecidos testes de irritação ocular e cutânea, usados com o objetivo de determinar o grau de irritabilidade, foram inicialmente descritos por John H. Draize (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944; DRAIZE, 1959).

Os testes que fornecem dados na avaliação de risco de substâncias químicas são baseados em modelos animais desenvolvidos nos últimos 60 anos. Esses modelos, foram por décadas considerados o padrão ouro para avaliação dos riscos envolvidos com o uso de produtos e substâncias, seja irritação, alergia ou efeitos sistêmicos. No entanto, vários aspectos dos testes com animais foram criticados, como a subjetividade dos métodos, a superestimação das respostas humanas e a crueldade dos mesmos (SANTOS, 2008; VINARDELL; MITJANS, 2008).

Porém, a partir da consciência ética de vários pesquisadores durante a história e a pressão exercida por grupos de proteção aos animais, houve o interesse por iniciar o desenvolvimento de métodos alternativos que pudessem obter os mesmos resultados que os testes clássicos, porém, sem que houvesse o uso de tantos animais e com a possibilidade de evitar o sofrimento (WHITE, 2001; MEYER, 2003; SANTOS, 2008).

Segundo Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009, entende-se por métodos alternativos, procedimentos validados e internacionalmente aceitos que não utilizem animais; usem espécies de ordens inferiores; empreguem menor número de animais; utilizem sistemas orgânicos *ex vivos*; ou diminuam e/ou eliminem o desconforto, garantindo resultados semelhantes e com reprodutibilidade, atingindo, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos (BRASIL, 2009).

O desenvolvimento de métodos alternativos para avaliação de produtos tem sido foco de estudos no meio científico, que está se conscientizando sobre a necessidade de utilizar a política dos 3 R's (*replace, reduce, refine*) introduzida por William Russel e Rex Burch (1959).

A redução (*reduce*) é alcançada quando obtemos um nível equiparável de dados com o uso de menos animais de laboratório; o refinamento (*refine*) promove o alívio ou diminuição da dor, sofrimento ou estresse do animal utilizado e a substituição (*replace*) acontece quando as informações são alcançadas sem o uso de animais vertebrados vivos (RUSSELL et al., 1959).

No entanto, os animais de laboratório ainda devem ser utilizados quando não existem métodos alternativos validados que os substituam ou, em casos específicos, após triagem com métodos *in vitro* e/ou matemáticos validados, precedendo, dessa forma, os estudos *in vivo* (PRESGRAVE, 2009).

Os métodos alternativos desenvolvidos precisam passar por processos de validação formal, afim de garantir a confiabilidade dos resultados. A participação da Comissão Internacional em atividades de validação de métodos alternativos teve início em 1991 com o lançamento do primeiro centro de validação, o ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternatives Methods*). Além do centro europeu, a validação de tais métodos segue sendo realizada por grandes centros internacionais, como a *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*- ICCVAM; *Japanese Society of Alternatives to Animal Experiments* - JSAAE; *Canadian Council on Animal Care* – CCAC; *Korean Center for the Validation of Alternative Methods* – KoCVAM; *International Corporation on Alternative Test Methods* – ICATM (MARTINEZ-HIDALGO, 2007), e atualmente faz parte desse grupo, o *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods* – BraCVAM. Os métodos alternativos já validados e harmonizados são disponibilizados mundialmente pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD).

No Brasil, a responsabilidade de monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa é do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Esta entidade é também responsável por credenciar as instituições que ainda utilizam animais em seus trabalhos, além de normatizar a produção e uso desses animais.

Dentre os métodos formalmente validados por centros internacionais de validação, os reconhecidos no Brasil, de acordo com as resoluções normativas Nº 18/2014 e Nº 31/2016 do CONCEA, encontram listados nas tabelas a seguir:

Tabela 1 - Métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA – RN nº 18/2014.

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 24 DE SETEMBRO DE 2014.	
I- Para avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele:	
a) Método OECD TG 430 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste de Resistência Elétrica Transcutânea;	
b) Método OECD TG 431 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste da Epiderme Humana Reconstituída;	
c) Método OECD TG 435 - Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i> ; e	
d) Método OECD TG 439 - Teste de irritação Cutânea <i>in vitro</i> .	
II- Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:	
a) Método OECD TG 437 - Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina;	
b) Método OECD TG 438 - Teste de Olho Isolado de Galinha; e	
c) Método OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína.	
III- Para avaliação do potencial de Fototoxicidade:	
a) Método OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU.	
IV- Para avaliação da absorção cutânea:	
a) Método OECD TG 428 - Absorção Cutânea método <i>in vitro</i> .	
V- Para avaliação do potencial de sensibilização cutânea:	
a) Método OECD TG 429 - Sensibilização Cutânea: Ensaio do Linfonodo Local; e	
b) Método OECD TG 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local.	
VI- Para avaliação de toxicidade aguda:	
a) Método OECD TG 420 - Toxicidade Aguda Oral – Procedimento de Doses Fixas;	
b) Método OECD TG 423 - Toxicidade Aguda Oral – Classe Tóxica Aguda;	
c) Método OECD TG 425 - Toxicidade Aguda Oral – procedimento "Up and Down"; e	
d) Método OECD TG 129 - estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica.	
VII- Para avaliação de genotoxicidade:	
a) Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i> .	

Fonte: Adaptado de CONCEA (2014).

Tabela 2 - Métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA – RN nº 31/2016.

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 31, DE 18 DE AGOSTO DE 2016.	
I- Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:	
a)	Método OECD TG 491 - Teste <i>in vitro</i> de curta duração para danos oculares; e
b)	Método OECD TG 492 - Epitélio corneal humano reconstruído;
II- Para avaliação do potencial de sensibilização cutânea:	
a)	Método OECD TG 442C - Sensibilização cutânea <i>in chemico</i> ;
b)	Método OECD TG 442D - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i> ;
III- Para avaliação de toxicidade reprodutiva:	
a)	Método OECD TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento; e
b)	Método OECD TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva.
IV- Para Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis:	
a)	Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira).
Fonte: Adaptado de CONCEA (2016).	

As resoluções normativas citadas acima, estabelecem um prazo de até 5 anos a partir da respectiva data de publicação no Diário Oficial da União (DOU), para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo.

Neste trabalho, as formulações desenvolvidas foram avaliadas quanto a irritabilidade ocular, por meio de duas metodologias alternativas ao uso de animais, o *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM) e o *Chorioallantoic Membrane –Trypan Blue Staining* (CAM-TBS), ambos utilizando a membrana corioalantoide (MCA) de ovos embrionados de galinha. A MCA é uma membrana vascularizada que se encontra dentro do ovo embrionado, e que possui processo vascular e inflamatório semelhante ao tecido conjuntival de olhos de coelho (GILLERON et al., 1996; ICCVAM, 2010). Como pode ser observado nas tabelas anteriores, nenhum dos testes (HET-CAM e CAM-TBS) utilizados neste trabalho estão listadas nas Resoluções Normativas do CONCEA. Ambos os testes utilizando a MCA, são válidos e aceitos internacionalmente, porém ainda não completaram todo o processo de validação formal, inclusive, o HET-CAM é o primeiro método alternativo que está passando por validação no Brasil.

A partir da portaria nº 491 de 2012 do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC), o Brasil dispõe da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), que é composta por três Laboratórios Centrais, o Instituto Nacional de Metrologia,

Qualidade e Tecnologia (Inmetro), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), e dezenove laboratórios associados, distribuídos em oito estados, onde o Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosméticos, situado na Universidade Federal de Pernambuco, representa o estado de Pernambuco.

A Portaria SEPED/MCTIC N° 3586, de 30 de junho de 2017, renovou por mais três anos a RENAMA, permitindo a continuidade da infraestrutura laboratorial e dos recursos humanos especializados capazes de implantar métodos alternativos no nosso país, além de desenvolver e validar novos métodos.

Analizando a trajetória do desenvolvimento desses métodos, é possível perceber que existe uma gama de metodologias alternativas, mas que poucas delas foram validadas, sendo necessário o aprofundamento dos estudos sobre a aplicabilidade de ensaios *in vitro* (MITJANS; INFANTE; VINARDELL, 2008). Entre as limitações descritas na literatura científica com relação à substituição do teste de irritação ocular de Draize, por exemplo, destaca-se o fato de que as metodologias alternativas, como o modelo HET-CAM, podem tanto subestimar (STEILING et al., 1999; SCHEEL et al., 2011) como superestimar resultados obtidos *in vivo* (NÓBREGA et al., 2012), a depender da natureza da substância testada, do seu potencial irritante e da presença de efeitos irreversíveis *in vivo*.

Várias pesquisas foram conduzidas nas últimas décadas para desenvolver métodos alternativos para o teste de irritação ocular em coelhos (teste de Draize) e, embora não haja um único teste *in vitro* capaz de substituir completamente o teste de Draize, vários testes são considerados adequados e são regularmente usados para avaliar certos aspectos. Entre eles, o (HET-CAM) (SCHEEL et al., 2011).

3.5.1 Ensaios em membrana corioalantóide HET-CAM e CAM-TBS

O Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) foi proposto pela primeira vez por Luepe e Kemper (LUEPKE, 1985), trata-se de um método alternativo na avaliação de irritabilidade ocular, que atualmente está passando pelo processo de validação formal no nosso país.

O HET-CAM tem a capacidade de avaliar e identificar o potencial irritante de uma substância química ou produto quando aplicado sobre a membrana corioalantoide (MCA) de um ovo embrionado de galinha do tipo *Specif Pathogen Free* (SPF) da raça *White Leghorn*, no décimo dia de incubação. O teste é fundamentado na avaliação visual dos efeitos fisiológicos

irritantes de hiperemia, hemorragia e coagulação, durante 5 minutos após aplicação da formulação em teste (TAVASZI; BUDAI, 2007).

A MCA é um tecido ricamente vascularizado que é encontrado no interior do ovo fertilizado. Além de constituir uma membrana respiratória, devido as suas características, assemelha-se ao tecido conjuntival dos olhos de coelho, possuindo processo inflamatório análogo ao desses animais (GILLERON et al., 1996; ICCVAM, 2010).

O teste apenas é considerado aceitável se os controles negativo e positivo induzem uma resposta que se enquadra na classificação de não irritante e irritante severo, respectivamente. Substâncias coloridas, com alta turbidez ou que aderem à MCA, não são indicadas para serem avaliadas por este método, pois estão associados a resultados comprometidos, devido à dificuldade de observação visual dos efeitos irritantes que possam surgir na membrana (MITJANS; INFANTE; VINARDELL, 2008).

Estudos realizados por Hagino e colaboradores (1993) examinaram o protocolo do HET-CAM proposto por Luepke e foi observada uma boa correlação com o teste de irritação ocular *in vivo* (teste de Draize). No entanto, apesar de ser um método rápido, barato e eficaz como alternativa ao teste *in vivo*, o sistema de pontuação ainda tem desvantagens em relação a subjetividade e caráter qualitativo (LUEPKE; WALLAT, 1987; KALWEIT; GERNER; SPIELMANN, 1987; KALWEIT et al., 1990).

Uma modificação (*Chorioallantoic Membrane –Trypan Blue Staining -CAM-TBS*) foi introduzida para reduzir a subjetividade do método. Isso envolve o uso do corante azul de trypan, onde a quantidade de corante fixada na MCA danificada é quantificada por espectrofotometria. Com isso, o método tem a vantagem de poder avaliar as substâncias que apresentam coloração ou turbidez. O CAM-TBS foi desenvolvido com intuito de eliminar a subjetividade apresentada pelo HET-CAM, a técnica usa a quantidade de corante (azul de trypan) adsorvido no local após aplicação da substância teste, como indicador de lesão ou injúria da MCA. Além da obtenção de dados quantitativos, é uma metodologia simples e reprodutível (HAGINO et al., 1991), o procedimento inicial, até a aplicação da substância teste é semelhante ao HET-CAM.

Os resultados obtidos após avaliação de 12 tensoativos, demonstraram uma boa correlação com os dados oriundos do teste de irritação ocular *in vivo* em virtude da boa correlação entre a quantidade de corante absorvida pela MCA e a média dos escores máximo gerados pelo teste de Draize, com coeficiente de correlação de 0,91 (HAGINO et al., 1991; HAGINO et al., 1993). Outros estudos demonstraram a maior sensibilidade e capacidade de predição do CAM-TBS em relação ao HET-CAM (YANG et al., 1991) e, ainda, a grande

especificidade desses dois métodos, para avaliar substâncias com baixo ou nenhum potencial irritante (SCHEEL et al., 2011).

Em geral, um método *in vivo* não consegue ser completamente substituído por um único método alternativo, com isso é importante considerar uma abordagem cuja análise inclua um arsenal de ensaios capazes de gerar dados confiáveis, na tentativa de reduzir ou eliminar o sofrimento dos animais na experimentação científica (ABREU et al., 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Foi utilizada Betametasona 17-Valerato – lote: BV151203, FAGRON; Betnovate® creme – lote: WA 0067V; Miristato de Isopropila; Polietilenoglicol 400; Tween® 20 (*Polyoxyethylene sorbitan monolaurate*); Span® 80 (*Sorbitane monooleate*); Tween® 80 (*Polyoxyethylene sorbitan monooleate*); Álcool Etílico; Kolliphor® EL (*Macrogolglycerol ricinoleate*); fluoresceína sódica; *Trypan Blue Dye*; *Minimum Essential Medium Eagle* M2279; Ácido oléico; Metanol e Acetonitrila grau HPLC, JT Baker, EUA; BRIJ®20 (*Polyoxyethylene 20 oleyl ether*), Croda, East Yorkshire, UK; Óleo de Licuri (*Syagrus coronata*), Coopes, Brasil; Fita adesiva (Scotch Tape Livro, 3M, St. Paul, MN); microtubos Axygen® de 1,5 mL; tubos tipo Falcon de 15mL; filtros de seringa (Millex ®-HV-PVDF) e membranas filtrantes de ésteres de celulose de 0,45µm Millipore®; água deionizada em sistema de ultra purificação Purelab®, Elga, USA.

4.2 EQUIPAMENTOS

Os seguintes equipamentos foram utilizados: Banho Dubnoff Microprocessado Q226M, Quimis, Brasil; Centrífuga, Centribio 80-2B; Agitador magnético, Fisatom®; Pipetas automáticas, Eppendorf; Banho Ultrassom Quimis; Agitador mecânico Fisatom® 752A; pHmeter (model pH21, Hanna Instruments Inc., Woonsocket, USA); ZetaSizer® Nano-ZS90 (Malvern® Instruments); Microscópio de Luz Polarizada (Leica); Cromatógrafo líquido Nexera X2 (Shimadzu); Vision® MicroetteTM (Hanson®); opacitômetro BASF-OP 3.0; chocadeira com rotação automática IP 70D Premium Ecológica; Iluminador por fibra ótica MGA-D; Dermatômetro Zimmer air® dermatome, Dover, Delaware; *Chromameter* (CR-300, Minolta, Germany).

4.3 SOLUBILIDADE DO VALERATO DE BETAMETASONA EM TENSOATIVOS E ÓLEO DE LICURI

Com o objetivo de otimizar o desenvolvimento das microemulsões, foi investigada a solubilidade do Valerato de Betametasona (VBM) em diferentes meios. Foram preparadas dispersões de BMV, em triplicata, adicionando excesso do fármaco (100 mg) em frascos com tampa contendo 5 mL de diferentes tensoativos (Kolliphor® EL, Tween 20®, Tween 80®, PEG400®, Span 80®) e óleos (Miristato de Isopropila, Ácido Oléico, Óleo de Licuri).

Essas dispersões foram homogeneizadas por meio de agitação em banho (Dubnoff Microprocessado, Quimis®) à temperatura controlada ($32 \pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 24 horas e, em seguida, centrifugadas ($1500\text{ g} \approx 4000\text{ rpm}$) por 20 minutos, retirou-se uma alíquota do sobrenadante, filtrou-se em filtro de seringa ($0,45\text{ }\mu\text{m}$) e diluiu-se com metanol. A concentração de VBM foi determinada, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de ultravioleta (CLAE-UV) (PESTANA et al., 2008; SHAH et al., 2009).

4.4 DESENVOLVIMENTO DOS DIAGRAMAS DE FASE PSEUDOTERNÁRIOS

Para determinar a concentração de componentes para a existência de microemulsões, diagramas de fase pseudoternários foram construídos utilizando o método de titulação com água. Inicialmente os pares de tensoativos selecionados (Tween 80® e PEG 400®) foram misturados nas proporções (p/p) de 1:1, 2:1, 3:1, 5:1, 7:3 e 1:5. A esta mistura de tensoativos, foi adicionado óleo de licuri (fase oleosa) nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1, essas misturas ficaram sob agitação magnética *over night*.

Posteriormente, foi adicionada água purificada tipo Milli-Q® por titulação utilizando uma pipeta automática ajustada em $1000\text{ }\mu\text{L}$, gota a gota foi adicionada em temperatura ambiente. Durante a titulação, a mistura estava sendo homogeneizada por agitador magnético, e a cada $1000\text{ }\mu\text{L}$ adicionado, as mudanças do aspecto visual foram observadas. No momento em que se deu a formação de microemulsões, sistemas visualmente isotrópicos e opticamente transparentes, foi finalizada a titulação. As concentrações dos componentes foram então calculadas para traçar o diagrama de fase pseudoternário (PATEL et al., 2013; ZHAO et al., 2011).

4.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE–UV)

Desenvolvimento e validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (clae–uv)

As análises foram realizadas em Cromatógrafo líquido Nexera X2, Shimadzu® equipado com detector ultravioleta (UV). Foi utilizada fase móvel na proporção 70:30 (v/v), composta por: Metanol: solução EDTA 2,5mM, com coluna ACE® 5 do tipo C-18 de fase reversa (125x4,6mm) como fase estacionária, fluxo de 1,2 mL/min, volume de injeção de 20 µL, temperatura do forno de 40°C, a detecção do fármaco foi realizada no comprimento de onda de 250 nm, com tempo total de análise de 8 minutos. Os dados foram obtidos utilizando o software LC Solution® versão 1.25.

A metodologia de CLAE/UV para doseamento de VBM foi validada seguindo orientações da RDC nº 166/17 e da RDC nº 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para os métodos analíticos e bioanalíticos, respectivamente, seguindo os parâmetros de seletividade, linearidade, exatidão, precisão, repetibilidade, recuperação e estabilidade.

A Seletividade do método foi verificada a partir da avaliação de fase móvel; tampão fosfato de sódio monobásico (20 mM) pH 7,4; microemulsão placebo; fita adesiva contendo estrato córneo de porco e pele de porco, frente a uma solução padrão de VBM (1 µg/mL). No caso das fitas, 3 amostras de fita (Scotch Tape Livro, 3M, St. Paul, MN), que são usadas na remoção de estrato córneo de pele de porco, foram colocadas em microtubos Axygen® de 1,5ml, 1 mL de metanol foi adicionado e estes foram agitados em mesa agitadora por 6 horas, seguindo de centrifugação por 10 minutos a 1500 g, por fim os sobrenadantes foram filtrados em filtros de seringa (0,45 µm) e quantificados por CLAE-UV, o mesmo procedimento foi aplicado para pele de porco.

A linearidade do método foi verificada nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 5; 10 e 20 µg/mL de VBM em fase móvel e de 0,3; 0,5; 1; 5; 10 e 20 µg/ml de VBM em tampão fosfato de sódio monobásico (20 mM) pH 7,4, obtidas a partir de uma solução inicial de 100 µg/mL de VBM em uma mistura de metanol e água 70:30 (v/v).

A precisão foi determinada pelo o ensaio de repetibilidade, em uma mesma corrida (intradia) e em corridas diferentes em dois dias distintos (interdias) com analistas diferentes.

Para avaliar a exatidão do método, amostras em triplicata de três concentrações diferentes (baixa, média e alta) foram testadas.

Além disso, a recuperação do VBM foi avaliada a partir da contaminação de pele de porco e de fitas (Scotch Tape Livro, 3M, St. Paul, MN) contendo estrato córneo suíno, com uma solução de concentração conhecida do fármaco. Amostras de pele de porco com área de 1,77 cm² foram picotadas e colocadas em microtubos Axygen® de 1,5ml, bem como 3 fitas de área de aproximadamente 2,5 x 2,5 cm² foram enroladas e colocadas em microtubos semelhantes. A estes microtubos foi adicionado volume conhecido de solução metanólica padrão de VBM, numa concentração de 10 µg/mL.

Após total evaporação da solução adicionada, 1 mL de metanol foi colocado nos microtubos e estes foram agitados em mesa agitadora por 6 horas, seguindo de centrifugação por 10 minutos a 1500 g, por fim, os sobrenadantes foram filtrados em filtros de seringa (0,45 µm) e quantificados por CLAE-UV. O teste foi realizado em triplicata e os valores de recuperação foram determinados pela seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Como nem sempre é possível quantificar as amostras de estrato córneo imediatamente após a realização do procedimento de *tape stripping*, ao final dos estudos de absorção cutânea, esse tipo de amostra foi avaliado quanto a sua estabilidade por 7 dias, armazenadas em geladeira, que foi o período máximo estabelecido para quantificação dessas amostras. Para tanto, foram contaminadas 30 fitas com uma quantidade conhecida de fármaco (1 µg/ mL).

4.6 MÁXIMA INCORPORAÇÃO DE BETAMETASONA NAS MICROEMULSÕES

Para determinar a máxima concentração que seria possível incorporar o fármaco nas formulações desenvolvidas, ou seja, a saturação do sistema, VBM em excesso (100 mg) foi adicionada em 5 mL de cada microemulsão e agitada em vórtex por 5 minutos. Essas misturas foram submetidas à agitação magnética a 300 rpm por 48 horas e em seguida à ultrassom por 60 minutos à temperatura ambiente. Ao fim da sonicação, foram centrifugadas (4000 rpm ≈ 1500 g) por 20 minutos, para precipitar o excesso de fármaco não incorporado. Uma alíquota do sobrenadante foi filtrado e diluído em metanol para a quantificação por CLAE-UV.

4.7 PREPARAÇÃO DAS MICROEMULSÕES CONTENDO BETAMETASONA E FORMULAÇÃO GELEIFICADA

Após a construção dos diagramas de fase, quatro microemulsões (MEs) foram selecionadas para a incorporação do fármaco. As MEs são constituídas de Tween 80® e PEG 400® como tensoativos e óleo de licuri como fase oleosa, em diferentes proporções (Tabela 3). Para obtenção das MEs, os tensoativos e óleos foram misturados sob agitação magnética contínua *over night*, no dia seguinte, a água foi adicionada aos poucos ainda sob agitação, até formação espontânea do sistema. Quando prontas, 0,2% (p/p) de Valerato de Betametasona foi adicionado diretamente as microemulsões em agitação até completa solubilização.

Tabela 3 - Composição centesimal das microemulsões desenvolvidas.

Excipientes Microemulsão	Tween 80®	PEG 400®	Óleo de licuri	Água
ME 1	24%	12%	4%	60%
ME 2	30%	6,5%	4,5%	59%
ME 3	15,7%	5,23%	2,32%	76,75%
ME 4	17,9%	7,6%	2,8%	71,7%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao final da preparação, foram obtidas microemulsões fluídas. Para viabilizar sua aplicação, estas foram incorporadas em formulação geleificada, de forma a obter uma preparação (microemulsão *based gel*) com concentração final de 0,1% de VBM, denominadas F1, F2, F3 e F4.

O gel foi obtido através da reação de neutralização do polímero escolhido, após dispersão de uma quantidade de Carpobol® em água purificada com auxílio de agitador mecânico (Fisaton® - modelo 752A) em uma velocidade de 900 rpm. Posteriormente foi adicionado os demais excipientes, por fim o AMP, responsável pela geleificação do sistema. Após adição de todos os componentes (Tabela 4), o gel permaneceu sob agitação por 15 minutos.

Tabela 4 - Composição centesimal do gel de carbopol.

Excipientes	Concentração (%)
Carbopol®	0,5
Propilenoglicol	3
Metilparabeno	0,1
EDTA	0,05
Propilparabeno	0,05
AMP	0,2
Água	q.s.p. 100

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

As microemulsões podem ser caracterizadas por diversos métodos, porém, é necessário um conjunto de técnicas para obtenção de informações mais detalhadas e precisas sobre sua estrutura e dinâmica.

Após o desenvolvimento dos diagramas de fase e do estudo da saturação do fármaco nas formulações microemulsionadas obtidas, as quatro microemulsões selecionadas foram caracterizadas através dos métodos a seguir. Além da determinação de pH, doseamento do fármaco e microscopia de luz polarizada do creme comercial Betnovate® e doseamento das formulações finais geleificadas contendo as microemulsões. Todas as análises foram realizadas, no mínimo, em triplicata e os resultados apresentados por média $\pm$ desvio padrão (DP).

4.8.1 Centrifugação

As microemulsões foram avaliadas frente à centrifugação, colocando 5g de cada amostra em estudo para centrifugar em centrífuga (Centribio® 80-2B) a 3000 rpm, por 20 minutos. Ao final, observou-se a ocorrência ou não de separação de fases.

4.8.2 Determinação do pH

O pH das microemulsões desenvolvidas, da formulação final e da formulação comercial (Betnovate® creme) foi determinado através de pHmetro modelo pH 21 (Hanna®), previamente calibrado com as soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0 a $25,0 \pm 0,5$ °C (BRASIL, 2008).

4.8.3 Teste de solubilidade em corante

Foi adicionado às microemulsões o corante aquoso Vermelho allura AC, e a fase do sistema foi avaliada visualmente após 5 minutos (THAKKAR et al., 2011; BUTANI; YEWALE; MISRA, 2014).

4.8.4 Determinação do tamanho das gotículas e potencial zeta das microemulsões

Com auxílio do ZetaSizer® Nano-ZS90 (Malvern® Instruments, UK), foi determinado o tamanho de gotícula das microemulsões contendo betametasona e seus respectivos placebos, a partir da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz. Com o mesmo equipamento foi possível também determinar o potencial zeta dessas formulações. As formulações não precisaram ser diluídas.

4.8.5 Microscopia de luz polarizada

As microemulsões desenvolvidas bem como a formulação comercial foram observadas através do Microscópio de Luz Polarizada (DM 750P – Leica®) para avaliar a isotropia ou anisotropia dos sistemas.

4.8.6 Doseamento de betametasona na formulação comercial Betnovate®

A quantidade de Valerato de Betametasona no Betnovate® creme foi determinada de acordo com a metodologia presente na Farmacopeia Americana (USP, 2007), visto que na Farmacopeia Brasileira 5ª edição não existe monografia para esse fármaco (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.8.7 Doseamento de betametasona nas formulações desenvolvidas

A quantidade de VBM nas microemulsões veiculadas em gel de carbopol foi determinada a partir da adição de metanol à uma alíquota da formulação, na proporção 1:1 (v/v), essa mistura foi agitada magneticamente à 300 rpm por 40 minutos, em seguida foi levada ao ultrassom por 20 minutos. A amostra foi diluída com metanol e quantificada por CLAE-UV.

4.8.8 Determinação da espalhabilidade

O teste de espalhabilidade, verifica a expansão de uma formulação semissólida sobre uma superfície após um determinado período de tempo, este foi realizado a partir do método adaptado de Borgueti e Knorst (2006). Para tanto, foi aplicado 0,5g de amostra de cada formulação sobre uma placa de vidro posicionada sobre um papel milimetrado e em seguida foi colocado uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto, os diâmetros abrangidos pela amostra foram anotados, em duas posições opostas para que o diâmetro médio pudesse ser calculado. Este procedimento foi repetido acrescentando-se sucessivamente outras placas, em intervalos de um minuto, totalizando 5 placas. Os resultados foram expressos pela média de três determinações independentes, como espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, de acordo com a equação abaixo:

$$E_i = d^2 \cdot \pi / 4$$

Sendo: E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm^2); d = diâmetro médio (mm); $\pi = 3,14$.

4.9 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

Para avaliação da estabilidade foi realizado o estudo de estabilidade acelerada de acordo com a RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (ANVISA), que teve duração de 6 meses e foi realizado no setor de Pesquisa e Desenvolvimento do Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE), seguindo os parâmetros para produtos semissólidos, visto que as formulações finais estão na forma de géis.

As quatro formulações desenvolvidas foram submetidas ao estudo, onde ficaram em câmaras climáticas (Caron Model 6040) na temperatura de $40,0 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 75% durante 180 dias, com análises de consistência, cor, odor, pH, perda de água (%) e teor do fármaco, realizadas no tempo 0, 90 e 180 dias.

4.10 ESTUDOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO, ABSORÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DA BETAMETASONA

Os estudos de cinética de liberação e absorção cutânea foram realizados utilizando sistema automatizado de células verticais de difusão de Franz, o equipamento utilizado foi o Vision® Microette. Para os estudos de cinética de liberação das formulações foi utilizada membrana sintética de ésteres de celulose (Millipore®; lote 02690), com porosidade de $0,45\mu\text{m}$, previamente hidratada em tampão fosfato pH 7,4 por 12 horas, já os estudos de absorção cutânea foram realizados com pele de porco dermatomizada da área do dorso do animal, que ao final do experimento foi avaliada quanto a retenção cutânea do fármaco em estudo.

4.10.1 Seleção do meio receptor

O meio receptor a ser utilizado nos estudos de cinética de liberação *in vitro* e absorção cutânea foi selecionado mediante a avaliação da solubilidade do Valerato de Betametasona (VBM) em diferentes meios: tampão fosfato pH 7,4; tampão fosfato pH 7,4 com *polyoxyethylene 20-oleyl ether* (Brij® 020) a 0,5%; tampão fosfato pH 7,4 com Brij® 020 a 1% e solução hidroalcoólica (água:etanol = 60:40). Para tanto, foi preparado dispersões contendo excesso (100 mg) de VBM em 5mL de cada meio testado. Essas dispersões foram homogeneizadas por meio de agitação em banho (Dubnoff Microprocessado, Quimis®) à temperatura controlada ($32 \pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 24 horas e, em seguida, centrifugadas ($1500\text{ g} \approx 4000\text{ rpm}$) por 20 minutos, uma alíquota do sobrenadante foi retirada e filtrada em filtro de seringa ($0,45\mu\text{m}$) e diluída em metanol. A concentração de VBM foi determinada, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de ultravioleta (CLAE-UV).

4.10.2 Obtenção e dermatomização da pele de porco

A pele de porco, na área do dorso do animal, para utilização como biomembrana no estudo de absorção cutânea foi obtida logo após a morte dos animais no matadouro local da cidade de Paulista - Pernambuco/Brasil. A pele foi transportada em isopor para o laboratório e após a chegada, foi limpa inicialmente em água corrente. Com o auxílio de bisturi e tesouras cirúrgicas, o excesso de tecido adiposo e de pelos foi removido a fim de facilitar o processo de dermatomização. A pele foi dermatomizada para uniformização da espessura em aproximadamente 0,7 mm com o auxílio de dermatômetro Zimmer air® e armazenadas a -20°C até a sua utilização, porém antes da utilização, a pele foi deixada descongelar durante 15 minutos. As áreas onde foram observadas lesões, manchas ou arranhões foram descartadas.

4.10.3 Montagem do sistema automatizado de células de difusão de Franz

Na montagem do sistema, foi utilizada a membrana artificial para o estudo de cinética de liberação que durou 12 horas e a pele dermatomizada de porco no estudo de absorção cutânea de duração de 6 horas. O compartimento receptor das células de Franz foi completamente preenchido com o meio receptor selecionado. As membranas, tanto artificial como animal, foram colocadas nas células de modo que ficassem em contato direto com o meio receptor sem formação de bolhas. No compartimento doador foram aplicados 100 mg de cada formulação sobre a membrana, numa área difusional de 1,77 cm². As células foram fechadas hermeticamente, mantidas sob agitação magnética constante (350 rpm) e temperatura a 32 ± 1°C com banho circulante de água.

4.10.4 Coleta e quantificação das amostras

No estudo de cinética de liberação, as coletas de líquido receptor foram realizadas nos tempos de 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 e 12 horas, e no estudo de absorção cutânea houve coleta única ao fim das 6 horas de estudo. Em ambos os estudos, foram coletadas alíquotas de 1 mL, sendo este volume repostado automaticamente com meio receptor. As alíquotas foram filtradas em filtro de seringa 0,45µm e posteriormente quantificadas através de CLAE-UV.

4.10.5 Análise dos perfis de liberação e absorção cutânea

Para avaliar a cinética de liberação da Betametasona nas diferentes formulações, o resultado da quantidade corrigida do fármaco liberado foi compilado em gráficos de dispersão xy, característicos de três modelos de cinética (BOLZINGER et al., 2012):

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

A partir da análise de regressão linear, foi determinado o coeficiente linear (R^2) para cada modelo de cinética. O modelo que apresentou valor de R^2 mais próximo a 1 foi selecionado.

4.10.6 Avaliação de retenção cutânea

Ao final do estudo de absorção cutânea, além da verificação da quantidade permeada a partir da coleta única de líquido receptor ao final das 6 horas de experimento, as concentrações de fármaco retidas na epiderme (estrato córneo e epiderme viável) também foram analisadas. A superfície da pele de porco utilizada no estudo foi limpa com auxílio de swab embebido com álcool isopropílico Biosoma[®] (duas vezes), a fim de remover toda formulação residual.

Logo após a limpeza, a pele de porco foi delimitada por molde com área circular semelhante a área difusional do estudo de absorção cutânea ($1,77 \text{ cm}^2$), para possibilitar a remoção do estrato córneo (EC) pela técnica de *tape-stripping*, segundo metodologia modificada por N'Dri-Stempffer e colaboradores (2008) (FDA, 1998). O EC foi obtido pela remoção sequencial das fitas (Scotch Tape Livro, 3M, St. Paul, MN), com aplicação de uma pressão constante usando uma pinça. Trinta fitas foram utilizadas em cada secção de pele de porco. Posteriormente essas fitas foram extraídas para quantificar o fármaco presente no EC.

O agrupamento de fitas para posterior extração foi diferente para os tipos de formulação, as fitas provenientes do experimento com formulações desenvolvidas foram extraídas e quantificadas da seguinte forma: as 2 primeiras fitas foram agrupadas e as demais, agrupadas de 4 em 4 até totalização de 30 fitas; já as fitas provenientes do estudo do Betnovate[®]: as 2 primeiras fitas foram agrupadas e as 28 restantes extraídas juntas.

A extração foi realizada colocando-se as fitas, de acordo com o agrupamento escolhido, em microtubos Axygen[®] de 1,5ml e tubo tipo Falcon de 15 mL (para as fitas agrupadas em 28

unidades), adicionando 1,0 ml de metanol e 5 mL de metanol respectivamente em cada tipo de frasco, em seguida, estes tubos foram agitados em mesa agitadora por 6 horas, seguindo de centrifugação por 10 minutos a 1500 g, por fim os sobrenadantes foram filtrados em filtros de seringa (0,45 μ m) e quantificados por CLAE-UV.

Na sequência, para obtenção dos dados de retenção cutânea na epiderme/derme, a área difusional das secções de pele após o *tape-stripping*, foi cortada em pequenas partes extraídas de forma semelhante as fitas, para quantificação do fármaco retido na pele.

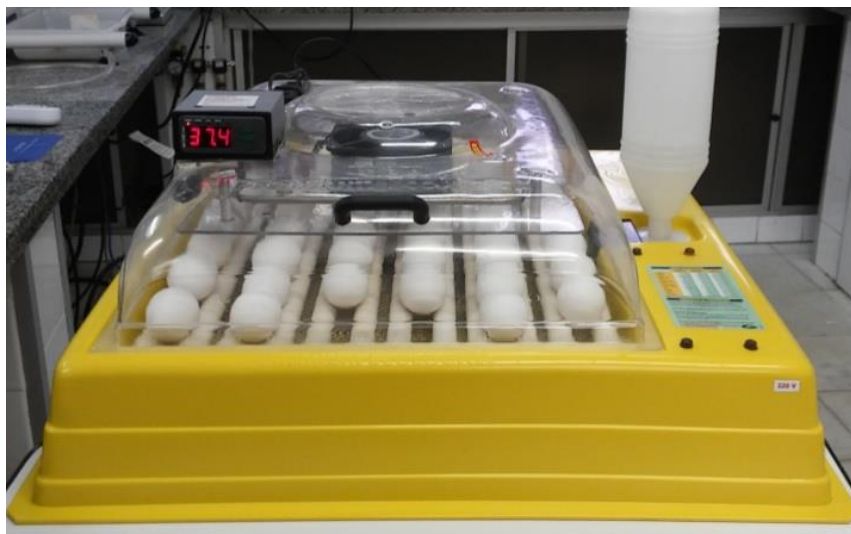
4.11 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE POR MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS

Com o objetivo de avaliar o potencial irritante das formulações desenvolvidas, foram utilizados dois métodos alternativos ao uso de animais que utilizam a membrana corioalantoide de ovos fertilizados de galinha. Em ambos os testes foi usado como controle negativo solução salina (NaCl 0,9% p/v) e como controle positivo, solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N. As microemulsões foram avaliadas sem diluição. Porém, devido à alta viscosidade, o creme de Betnovate® foi diluído 1: 1 com NaCl a 0,9%.

4.11.1 *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)*

O teste foi conduzido em sextuplicada para cada amostra testada, inclusive para os controles positivo e negativo, utilizando ovos de galinha fertilizados da raça White Leghorn, tipo *Specif Pathogen Free* (SPF). Estes ovos foram incubados em chocadeira com rotação automática sob temperatura controlada de $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65,0 \pm 2\%$ (Figura 8), o tempo de incubação foi iniciado no dia da postura dos ovos.

Figura 8 - Incubação dos ovos em chocadeira com rotação automática.



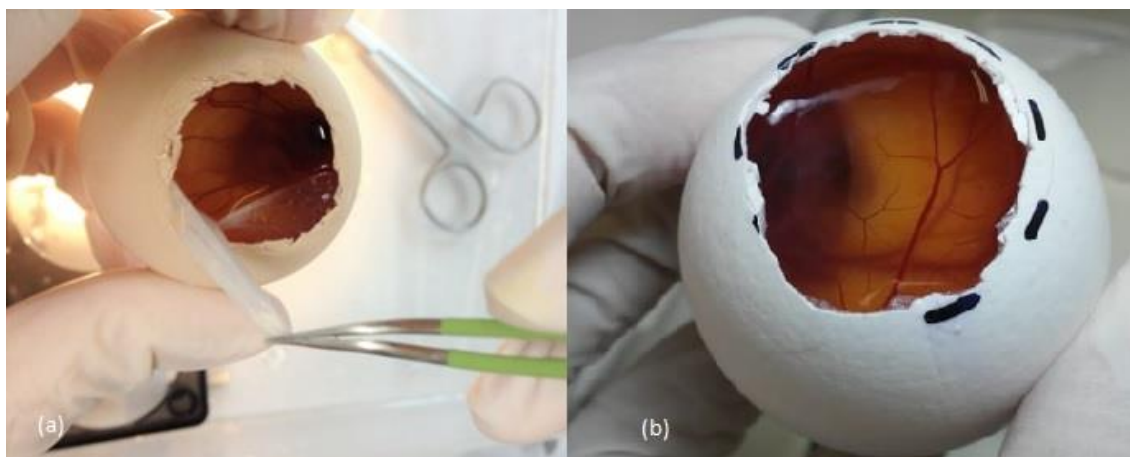
Fonte: acervo pessoal.

No décimo dia de incubação, a casca do ovo foi removida ao redor da câmara de ar, e a membrana da casca também foi retirada com auxílio de pinça (Figura 9a), para então expor o local do teste, a membrana corioalantoide (MCA), que foi avaliada visualmente para verificação da integridade e visualização, com auxílio de lupa, da disposição dos vasos sanguíneos presentes na membrana. Na superfície da membrana foi aplicado 300µL de cada formulação testada e removido após vinte segundos de contato, lavando o local com 5 mL de solução salina isotônica a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Após a remoção da formulação, a MCA (Figura 9b) foi examinada visualmente, durante 5 minutos, contados a partir do momento da aplicação, com a finalidade de avaliar o aparecimento de reações irritativas nos vasos como, hemorragia, coagulação e congestão.

Caso haja o aparecimento de uma ou mais das reações citadas acima, a formulação recebe uma pontuação de acordo com o tempo de em que essas reações surgem na membrana (Tabela 5), durante o tempo de observação. A classificação final do potencial irritante de cada produto pelo ensaio de HET-CAM, está descrita na Tabela 6. Essa classificação segue os critérios descritos no método de ensaio do Protocolo ICCVAM. (SCHEEL et al., 2011; ICCVAM, 2010).

Figura 9 - Remoção da membrana da casca.



(a) – Remoção da membrana da casca; (b) – Membrana Corioalantóide (MCA).

Fonte: acervo pessoal.

Tabela 5 - Graduação das alterações observadas na membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.

FENÔMENOS	TEMPO		
	≤ 30 segundos	$30 \text{ segundos} < t \leq 2 \text{ minutos}$	$2 \text{ minutos} < t \leq 5 \text{ minutos}$
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação/opacidade	9	7	5

Fonte: JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE (1996).

Tabela 6 - Classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM.

Faixa (graduação das lesões)	Classificação
0,00 a 0,99	Não irritante (NI)
1,00 a 4,99	Irritante leve (IL)
5,00 a 8,99	Irritante moderado (IM)
9,00 a 21,00	Irritante severo (IS)

Fonte: JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE (1996).

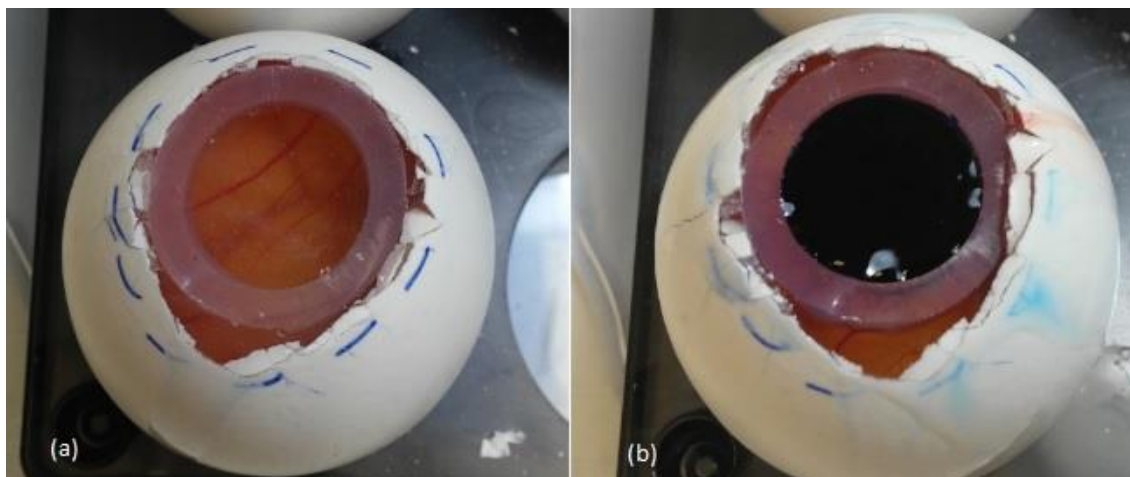
4.11.2 Chorioallantoic Membrane –Trypan Blue Staining (CAM-TBS)

O CAM-TBS é uma versão modificada do ensaio HET-CAM, que traz uma abordagem quantitativa na avaliação dos danos à membrana corioalantoide (MCA). Esse método foi concebido para examinar o efeito prejudicial das substâncias, medindo a quantidade de azul de tripan adsorvida na MCA após o contato da substância teste com essa membrana. Por ter um caráter quantitativo, estudos mostraram que existe uma maior sensibilidade e capacidade de predição do CAM-TBS em relação ao HET-CAM na avaliação de irritabilidade (HAGINO et al., 1999).

A parte inicial da metodologia, até a aplicação e consequente remoção da formulação se assemelha ao ensaio HET-CAM, porém, no método CAM-TBS, finaliza-se com a utilização do corante azul de trypan como um indicador de lesão da membrana.

Após aplicação e consequente remoção da formulação teste, colocamos 0,5 mL da solução de azul de trypan a 0,1% em tampão fosfato numa área da MCA delimitada por um anel de silicone (Figura 10). Posteriormente, a membrana foi lavada por 20 segundos com água destilada para retirada do excesso do corante.

Figura 10 - Membrana Corioalantoide (MCA) delimitada por anel de silicone.



(a) – Demarcação da área com anel de silicone; (b) – Área delimitada com adição do azul de trypan.

Fonte: Arquivo pessoal.

A área da MCA que esteve em contato com o corante foi excisada, colocada em um tubo de centrifugação contendo 5 mL de formamida e, em seguida, agitada em vórtex e centrifugada a 1500g por 10 min para extração do corante. A absorbância do sobrenadante foi medida no espectrofotômetro a 595 nm, e a quantidade de azul de trypan foi determinada a partir de uma curva de calibração do corante em formamida nas concentrações 10^{-6} , 10^{-5} e 5×10^{-5} M. As formulações foram classificadas de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 7 - Classificação final do ensaio CAM-TBS.

CORANTE ABSORVIDO	CLASSIFICAÇÃO
0 - 6,99	Não irritante/ligeiramente irritante (NI / LI)
7,00 - 14,50	Moderadamente irritante (MI)
> 14,50	Irritante severo (IS)

Fonte: LAGARTO et al., 2006.

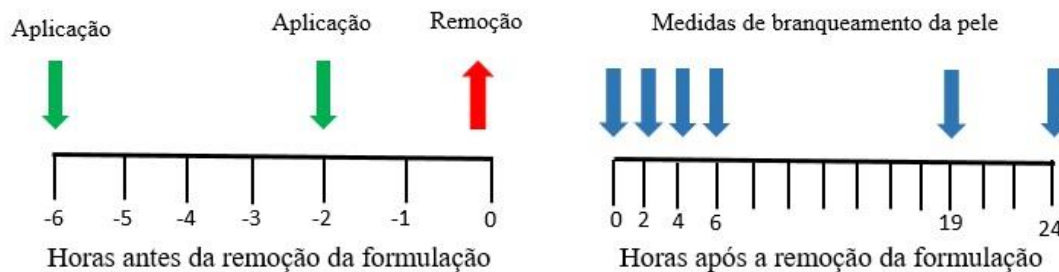
4.12 AVALIAÇÃO FARMACODINÂMICA *IN VIVO* – ENSAIO DE BRANQUEAMENTO

O ensaio de branqueamento para avaliação da vasoconstrição (efeito farmacodinâmico dos corticoides tópicos) foi realizado na porção ventral dos antebraços de 6 voluntários sadios, aplicando as formulações escolhidas em áreas de aproximadamente 2 cm², demarcadas com caneta de tinta permanente.

O teste foi conduzido com 3 formulações que foram aplicadas em 6 locais, sendo 3 em cada antebraço e dois locais a mais em cada antebraço foram destinados para serem controle negativo. Esses locais de controle não tratados em cada antebraço, são utilizados para permitir a correção dos locais da pele tratados com fármaco para alterações de cor durante o estudo.

Foram aplicadas uma formulação desenvolvida na concentração de 80% de saturação do Valerato de Betametasona; a mesma formulação na concentração de 0,1% e o Betnovate® creme como medicamento referência. Devido à maior praticidade, o método de aplicação e remoção escolhido foi a aplicação do tipo escalonada com remoção sincronizada, onde as formulações são aplicadas nos voluntários em diferentes tempos, porém são removidas juntas, como mostrado na figura abaixo:

Figura 11- Representação esquemática da aplicação sequenciada com remoção sincronizada e horários das medidas de branqueamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As formulações foram aplicadas manualmente, utilizando-se luva para procedimento, numa quantidade de 20 mg por área de contato e removidas após uma duração de dose de 2 e 6 horas. Na remoção, a área de pele foi limpa suavemente 3 vezes consecutivas, com auxílio de algodão seco.

Para a avaliação quantitativa do branqueamento da pele, o equipamento *Spectrophotometer (CM-700d Konica Minolta, Japan)* foi usado para leitura, em triplicata, dos locais de aplicação nos tempos de 0, 2, 4, 6, 19 e 24hs após a remoção das formulações. O aparelho foi calibrado a partir de aparato específico para esse fim. As leituras da linha de base foram ser realizadas em todas as áreas de aplicação e ajustadas sendo então expressa como parâmetro Δa .

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco/Brasil, sob o registro - CAAE Nº n°34657814.2.0000.5208. Todos os voluntários que participaram do estudo leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), declarando estar de acordo em participar da pesquisa, bem como, cientes dos procedimentos, riscos e benefícios.

A análise estatística foi realizada através do teste *t-student* e de ANOVA *one and two way*, com nível de significância estatística fixado em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SOLUBILIDADE DO VALERATO DE BETAMETASONA EM TENSOATIVOS, COTENSOATIVOS E ÓLEOS

O desenvolvimento de microemulsões tem como ponto de partida a seleção de seus componentes, além das propriedades físico-químicas do fármaco que será incorporado. Alguns requisitos são importantes no momento da escolha dos componentes, eles devem ter capacidade para solubilizar o fármaco escolhido, devem ser seguros, não apresentar toxicidade, irritabilidade, e devem ser capazes de formar o sistema desejado (LAWRENCE, REES, 2012; FORMARIZ et al., 2005). Os fármacos com caráter lipofílico, como é o caso do Valerato de Betametasona (VBM), apresentam preferência para serem encapsulados na fase oleosa de sistemas O/A, enquanto que fármacos hidrofílicos preferem a fase aquosa de sistemas A/O (SHAKEEL & RAMADAN, 2010).

A seleção dos componentes para o desenvolvimento das microemulsões desejadas foi realizada com base na solubilidade do VBM em alguns tensoativos e óleos (Tabela 8), visto que sistemas com maior capacidade de solubilização do fármaco, apresentam melhores liberações e aumentam a capacidade do fármaco permear as membranas biológicas (SAHOO et al., 2014; SHAH, et al., 2009).

Três óleos (Miristato de isopropila, ácido oleico e óleo de Licuri) foram testados para fundamentar a escolha da fase oleosa, e apesar do fármaco ter apresentado maior solubilidade em ácido oleico, considerado pouco irritante para a pele (ANTONIO, 2007), priorizou-se a utilização do óleo de Licuri, pois é um produto de origem vegetal extraído do fruto de uma palmeira nativa das regiões semiáridas e cerrado do Brasil, além de possuir excelente espalhabilidade e penetração (LEAL et al., 2013).

Tabela 8 - Solubilidade do VBM em diferentes tensoativos e óleos.

Tensoativos e óleos	Solubilidade (mg.mL⁻¹)
Kolliphor® EL	10,077 ± 0,092
Tween 20®	9,149 ± 0,236
Tween 80®	11,430 ± 0,030
Span 80®	0,051 ± 0,229
PEG 400	12,719 ± 0,062
Miristato de Isopropila	0,028 ± 0,178
Óleo de Licuri	0,15 ± 0,097
Ácido Oleico	1,385 ± 0,148

Fonte: Elaborado pelo autor.

Cinco tensoativos não iônicos (Kolliphor® EL, Tween 20®, Tween 80®, Span 80® e PEG400®), foram analisados. Foi verificado que dentre esses, o VBM apresentou maior solubilidade em PEG 400 (12,719 mg.mL⁻¹), que foi então escolhido como componente da formulação, assim como o Tween 80® (11,430 mg.mL⁻¹). O óleo e tensoativos escolhidos (Tween 80®, PEG400® e óleo de Licuri) são de fácil aquisição e baixo custo.

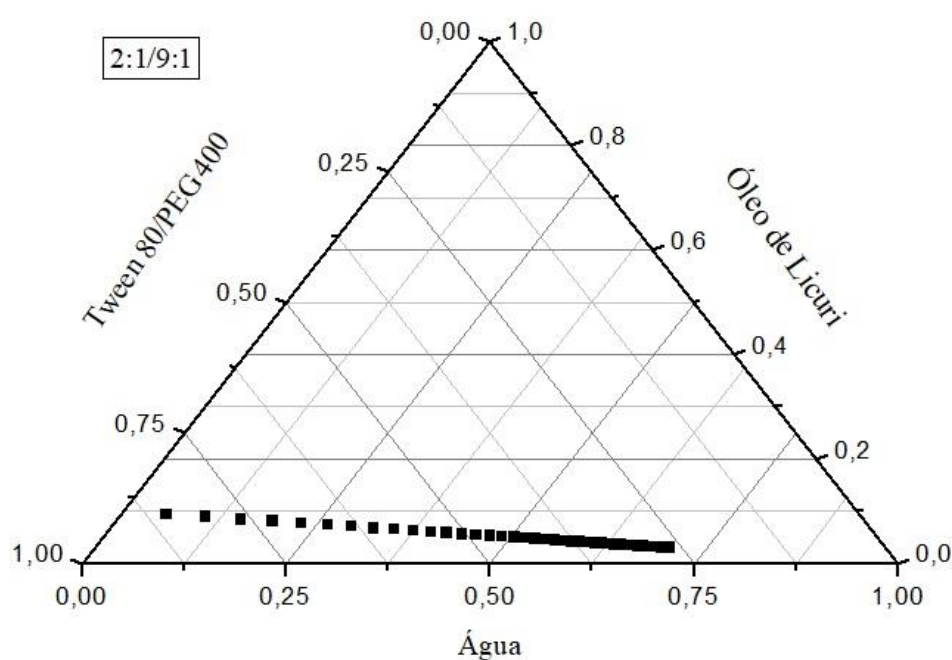
5.2 DESENVOLVIMENTO DOS DIAGRAMAS DE FASE PSEUDOTERNÁRIOS

Uma microemulsão é formada quando a tensão interfacial da interface água/óleo chega a um nível muito baixo e a camada interfacial é mantida altamente flexível e fluida (KOGAN & GARTI, 2006; AZEEM et al., 2009). Geralmente, essa condição é atendida diante da escolha cuidadosa e precisa dos componentes, suas respectivas proporções e pelo uso de um cotensoativo que traz flexibilidade a esta interface (LAWRENCE, REES, 2012).

Com base nos resultados da solubilidade do VBM, foram selecionados os componentes (par de tensoativos e óleo) para o desenvolvimento dos diagramas pseudoternários afim de se obter áreas com sistemas característicos de microemulsão, ou seja, sistemas homogêneos, de aspecto límpido e translúcido (SAHOO et al., 2014; DAMASCENO et al., 2011; SILVA et al., 2009). A construção desses diagramas é uma ferramenta fundamental para caracterizar em quais condições experimentais as microemulsões são formadas (FRANZINI, 2006).

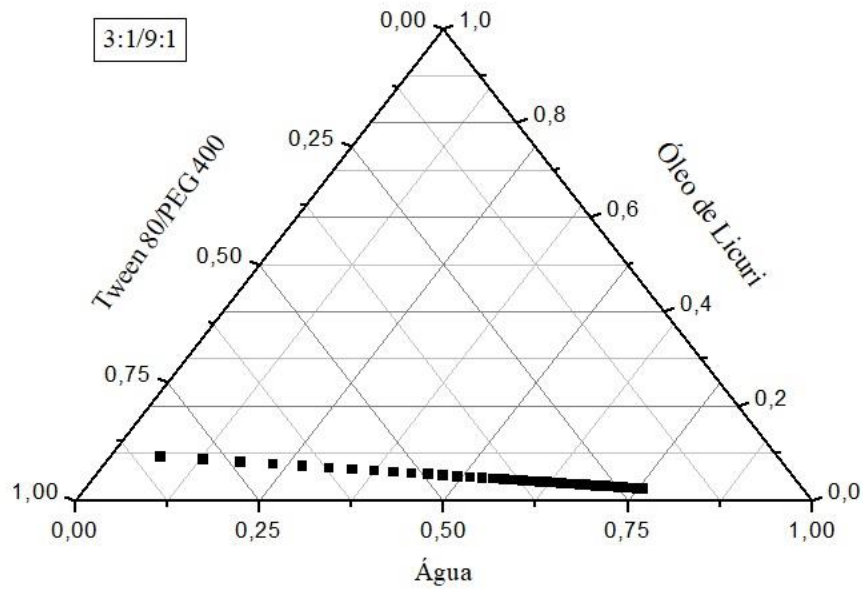
A técnica de titulação para a determinação dos diagramas apresentou-se simples e reprodutível, além de possibilitar a definição das proporções e os pontos de formação de microemulsão, representadas graficamente nas Figuras 12, 13, 14 e 15. Também foi possível verificar que a incorporação do VBM não alterou as regiões microemulsionadas dos sistemas, ou seja, todas permanecem isotrópicas e opticamente transparentes.

Figura 12 - Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 80®, PEG 400, óleo de Licuri e água para proporções T:óleo 9:1. EHL: 13,87.



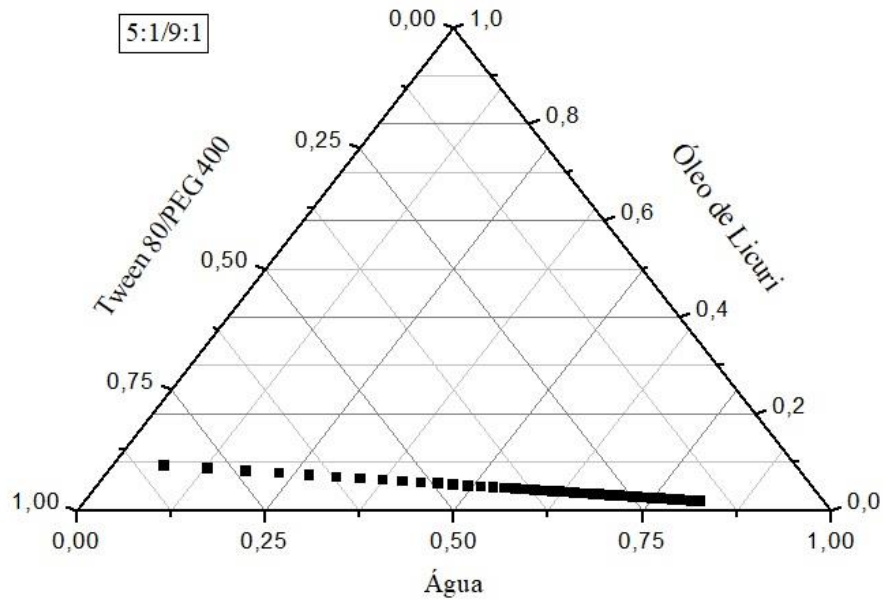
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 - Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 80®, PEG 400, óleo de Licuri e água para proporções T:óleo 9:1. EHL: 14,15.



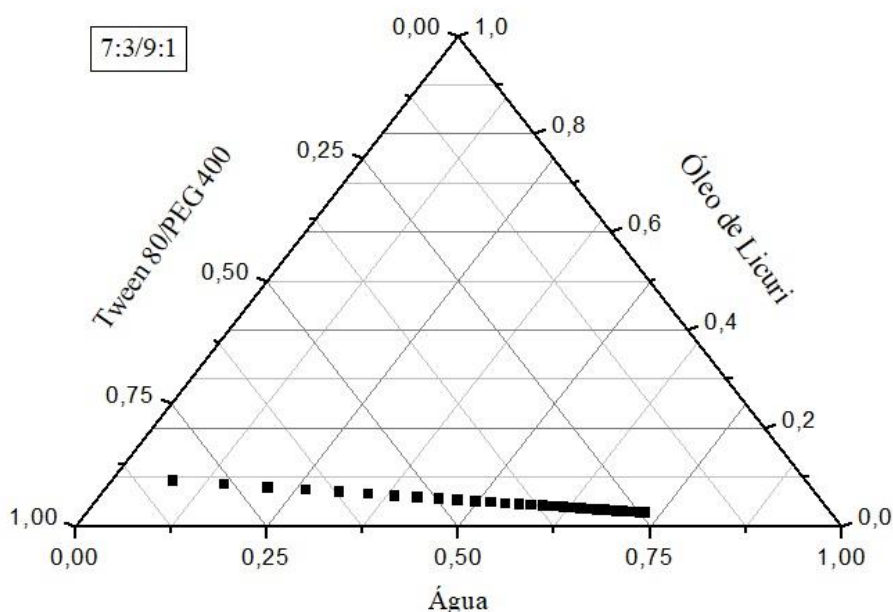
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 - Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 80®, PEG 400, óleo de Licuri e água para proporções T:óleo 9:1. EHL: 14,39.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 15 - Diagrama de fase pseudoternário para o sistema Tween 80®, PEG 400, óleo de Licuri e água para proporções T:óleo 9:1. EHL: 13,99.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi possível verificar pontos de existência de microemulsões (MEs) contendo o óleo de Licuri e combinações de Tween 80®/PEG 400 nas proporções de 2:1; 3:1; 5:1 e 7:3 conforme os diagramas apresentados, com proporção tensoativos:óleo de 9:1 em todos os diagramas obtidos. Os pontos microemulsionados expressos nos diagramas expandiam-se à medida que o percentual de água aumentava e a de tensoativos diminuía, tendo sistemas microemulsionados de até, aproximadamente 80% de água.

Após obtenção dos diagramas, foram selecionadas 11 microemulsões com diferentes concentrações de água (baixa, média e alta), dando prioridade à sistemas com alta concentração de água e baixa concentração de tensoativos e óleo, visto a necessidade do desenvolvimento de formulações menos irritantes para administração tópica. Foi realizada uma triagem, a partir da observação em microscópio de luz polarizada, e apenas 4 (Tabela 9) dentre as 11 preparações foram caracterizadas como sistemas microemulsionados e seguiram os demais testes, para posterior avaliação da liberação e absorção cutânea do fármaco em estudo.

Tabela 9 - Composição das formulações obtidas nos diagramas pseudoternários.

Composição (%)	ME1	ME2	ME3	ME4
Tween 80®	24	30	15,7	17,9
PEG 400	12	6,5	5,23	7,6
Óleo de Licuri	4	4,5	2,32	2,8
Água	60	59	76,75	71,7

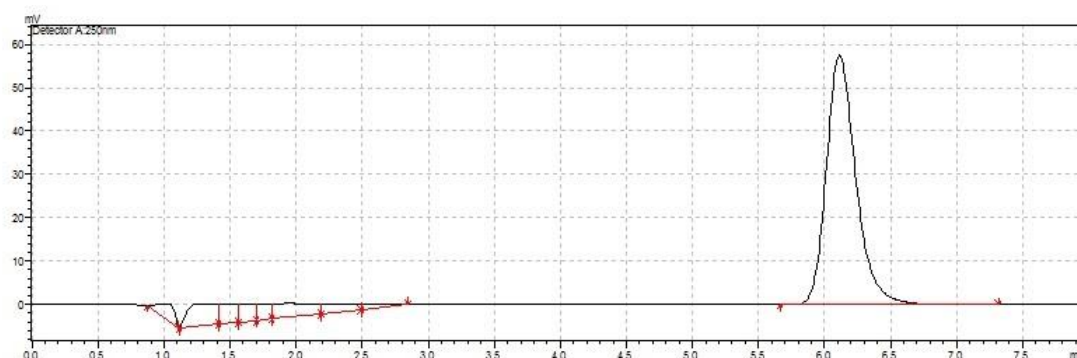
Fonte: Elaborado pelo autor.

Um dos problemas relacionados ao desenvolvimento de microemulsões é a toxicidade dos tensoativos. Uma grande quantidade de tensoativos no sistema pode causar irritação quando administrados por via tópica. De acordo com isso, espera-se que os sistemas obtidos, por não apresentarem alta concentração de tensoativos, não apresentem potencial de causar irritação dérmica. O potencial irritante das formulações será apresentado adiante por metodologias específicas.

5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ULTRAVIOLETA (CLAE–UV)

O método utilizado para quantificação do Valerato de Betametasona (VBM) mostrou seletividade, especificidade, linearidade e exatidão adequada. O cromatograma apresentado na Figura 16, mostra o tempo de retenção do fármaco em aproximadamente 6,1 minutos com boa definição do pico cromatográfico. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,1 e 0,3 µg/mL, respectivamente, para amostras em tampão fosfato e 0,02 e 0,05 µg/mL para amostras em fase móvel.

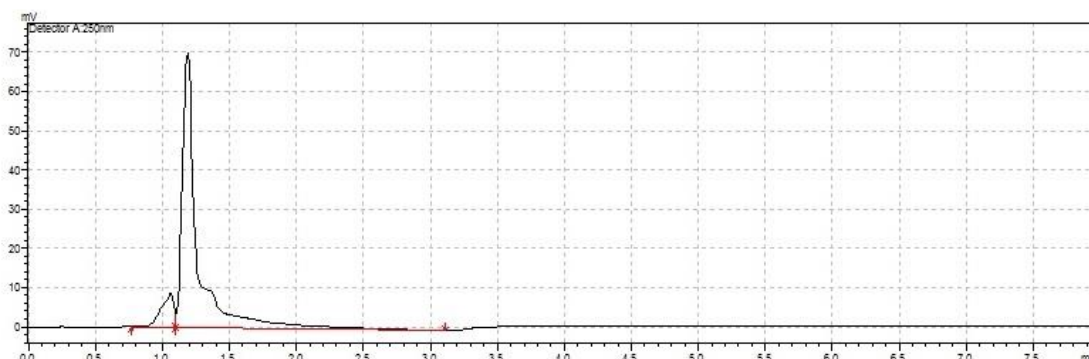
Figura 16 - Cromatograma referente ao ponto 5 µg/mL da curva padrão.



Fonte: Arquivo pessoal.

Foi verificado que nas análises de todos os meios testados para seletividade não houve detecção de pico cromatográfico interferente no tempo de retenção do VBM, representado aqui pela figura 17 (cromatograma referente a uma microemulsão placebo). Sendo assim, o método foi considerado seletivo para quantificação de VBM por CLAE-UV.

Figura 17 - Cromatograma referente à microemulsão placebo.



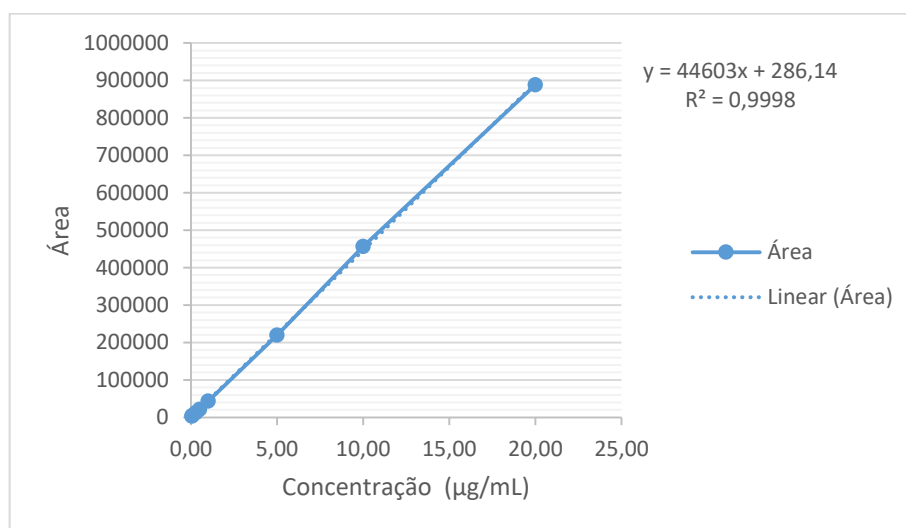
Fonte: Arquivo pessoal.

A linearidade foi realizada em triplicata, nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,3, 0,5, 1, 5, 10 e 20 µg/ml de VBM em fase móvel e de 0,3, 0,5, 1, 5, 10 e 20 µg/ml de VBM em tampão fosfato de sódio monobásico (20 mM) pH 7,4. As médias das áreas obtidas para cada ponto das três curvas foram plotados em gráficos, onde o eixo das abcissas representa a concentração de VBM em µg/mL e o das ordenadas, as áreas referentes as concentrações da curva de calibração.

Os gráficos de regressão linear (Figuras 18 e 19), mostram a equação da reta para amostras de fase móvel e tampão fosfato: $y = 44603x + 286,14$ e $y = 40819x - 19320$, respectivamente. Os dois gráficos demonstram valores de coeficiente de correlação $> 0,990$,

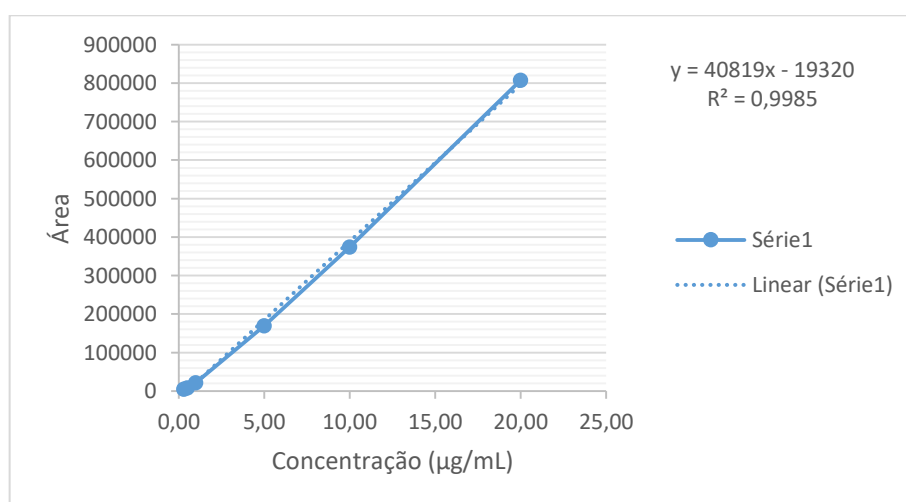
atendendo aos requisitos da RDC 166/2017 (ANVISA). O método mostrou ser capaz de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de VBM nas amostras.

Figura 18 - Curva de Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração do VBM em fase móvel.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Curva de Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração do VBM em tampão fosfato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para demonstrar a precisão do método, foi realizado o ensaio de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada em sextuplicata da concentração 1 µg/mL de VBM

e verificada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR), que demonstrou repetibilidade apropriada para o método, como apresentado nos resultados da tabela abaixo:

Tabela 10 - Repetibilidade do VBM

Concentração 1 µg/mL de VBM						Média	DPR (%)
1	2	3	4	5	6		
1,002	0,962	0,931	0,986	0,973	0,957	0,968	2,53

Fonte: Elaborado pelo autor.

A precisão intermediária foi avaliada conforme a repetibilidade, porém em dias diferentes por analistas diferentes e o método continuou sendo preciso, conforme a seguir:

Tabela 11 – Precisão intermediária em dias diferentes com analistas diferentes do VBM.

	Média ± DP	DPR (%)
Dia 1/Analista 1	0,968 ± 0,01	1,58
Dia 1/Analista 2	0,955 ± 0,03	2,94
Dia 2/ Analista 1	0,975 ± 0,009	0,93
Dia 2/Analista 2	0,974 ± 0,02	2,53

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para avaliar a exatidão do método, amostras em triplicata de três concentrações diferentes (baixa, média e alta) foram testadas, os resultados estão apresentados na Tabela 12, onde as concentrações experimentais apresentaram concordância com as concentrações teóricas testadas, e o método também foi considerado exato, apresentando desvio padrão relativo abaixo de 5%.

Tabela 12 - Exatidão VBM.

Concentração µg/mL				Dados estatísticos			
Teórica	Experimental			Média	DP	DPR	%
0,3	0,275	0,292	0,303	0,290	0,015	4,81	97
1,0	0,957	0,973	0,986	0,972	0,014	1,48	97,2
20,0	20,277	19,819	20,060	20,052	0,229	1,14	100,26

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na intenção de verificar se o método de extração do fármaco para avaliação de retenção cutânea era adequado, a recuperação do VBM foi determinada em estrato córneo e epiderme/derme de pele de porco. Os resultados estão expressos pelo percentual recuperado (Tabela 13).

Tabela 13 - Recuperação de VBM em estrato córneo e pele de porco (epiderme e derme).

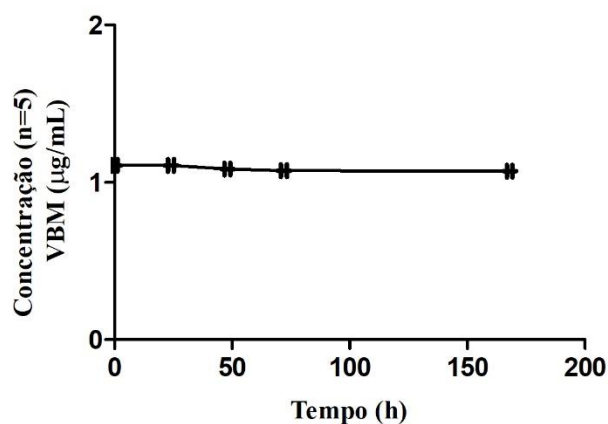
Concentração 10 µg/mL (n=3)			
	Média±DP (µg/mL)	CV (%)	Recuperação (%)
Estrato córnea	9,498±0,34	3,54	94,98
Epiderme/derme	9,154±0,1	1,13	91,55

Fonte: Elaborado pelo autor.

A recuperação está diretamente relacionada com a capacidade do método em extrair o fármaco da biomembrana utilizada, e esta deve ser de $100 \pm 10\%$, para garantir resultados confiáveis (OECD, 2004). Com base nos valores obtidos, é possível afirmar que o processo de extração é eficiente para a recuperação de VBM nas fitas e na pele de porco utilizada.

Por fim, na avaliação da estabilidade das amostras, as fitas com estrato córneo contaminadas com $1\mu\text{g/mL}$, permaneceram estáveis durante 7 dias em geladeira, onde as concentrações não foram significativamente modificadas no período avaliado (Figura 20). Com isso, na impossibilidade de quantificar as amostras imediatamente após o experimento de absorção cutânea, é possível fazê-lo em até 7 dias, sem perda significativa do analito.

Figura 20 - Gráfico referente à análise da estabilidade das amostras pré-extração por 7 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As análises realizadas demonstraram que o método analítico é adequado e capaz de produzir resultados confiáveis.

5.4 MÁXIMA INCORPORAÇÃO DE BETAMETASONA NAS MICROEMULSÕES

Um dos objetivos do desenvolvimento de novos sistemas como lipossomas, microemulsões e nanopartículas lipídicas é a possibilidade de melhora na solubilidade de fármacos (GANGADHAR et al., 2014). Por apresentar baixa solubilidade em água, o VBM é um fármaco candidato a ser incorporado em sistemas como as microemulsões (MEs), a fim de aumentar sua solubilidade e ter a possibilidade de melhora em relação a sua permeação em membranas biológicas.

De acordo com o banco de dados *DrugBank*, o VBM apresenta solubilidade em água, à 25°C, de 0,0665 mg/mL⁻¹, na Tabela 14, onde estão os resultados experimentais da máxima incorporação de VBM nas microemulsões, é possível observar a melhora da solubilidade nesses sistemas em comparação ao meio aquoso.

As formulações ME1 e ME2, que possuem basicamente a mesma proporção de constituintes, e maiores percentuais de tensoativos em relação a ME 3 e ME4, mostrou uma incorporação máxima em torno de 4 mg/mL⁻¹. Com isso, também é possível afirmar que a solubilização do VBM foi favorecida quando havia maior concentração de tensoativos na microemulsão, já que estes facilitam a solubilização do fármaco no sistema.

Tabela 14 - Máxima incorporação de VBM nas microemulsões.

Microemulsões	Máxima Incorporação (mg. mL ⁻¹) ± DP
ME1	4,345±0,08
ME2	4,446±0,06
ME3	3,101±0,10
ME4	3,238±0,10

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise estatística desses resultados por ANOVA *one-way*, no intervalo de confiança de 95%, mostrou que a máxima incorporação de VBM na formulação ME1 e ME2 são estatisticamente semelhantes entre si, bem como ME3 e ME4. Porém esses pares (ME1 e ME2; ME3 e ME4) são estatisticamente diferentes entre si.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Após o desenvolvimento dos diagramas de fase e do estudo da máxima incorporação do fármaco nas microemulsões, as quatro microemulsões selecionadas foram caracterizadas através de diversos métodos, apresentando os resultados a seguir.

5.5.1 Centrifugação

Em estado de repouso, a força da gravidade atua sobre as formulações, fazendo com que suas partículas ou gotículas se movam em seu interior. O teste de centrifugação produz estresse forçado na amostra, simulando um aumento dessa força da gravidade, gerando aumentando da mobilidade das gotículas e antecipando possíveis instabilidades (BRASIL, 2008).

As microemulsões testadas não apresentaram nenhum sinal de instabilidade física após a centrifugação, mantendo-se estáveis sem sinais de precipitação, turvação ou separação de fases.

5.5.2 Teste de solubilidade em corante

O teste de solubilidade foi realizado com a finalidade de sugerir, de forma visual, simples e rápida qual o sentido de fase das microemulsões desenvolvidas contendo VBM a 0,2%. A avaliação do tipo de microemulsão (ME) foi realizada dissolvendo um corante solúvel em água

nas MEs e observando sua distribuição visualmente após 5 min (THAKKAR et al., 2011). Uma dispersão rápida do corante solúvel em água no sistema geralmente indica sistemas do tipo O/A. Já o inverso ocorre quando se usa um corante solúvel em óleo (TANDEL et al., 2015).

Sabendo que o corante irá solubilizar de acordo com a natureza da fase externa das microemulsões, ao final da homogeneização, o corante se espalhou uniformemente em todos os sistemas microemulsionados (representado na Figura 21 pela ME1), indicando que as MEs formadas são do tipo O/A.

Figura 21 - Teste de corante realizado para a ME1 com 0,2% de VBM.



Fonte: Arquivo pessoal.

Normalmente, o EHL requerido para formar sistemas O/A encontra-se entre 12 e 18, valores abaixo, indicam a formação de sistemas A/O (KAWAKAMI et al., 2002). Como visto, os valores obtidos de EHL para todas as microemulsões (13,87 – 14,39), corrobora com a indicação que todas elas se caracterizam por sistemas do tipo O/A.

5.5.3 Determinação do pH

O potencial hidrogeniônico (pH) cutâneo é mantido por um sistema de tampão biológico ácido láctico/lactato, além dos ácidos dicarboxílicos do suor, ácidos graxos das glândulas sebáceas e pelos compostos ácidos oriundos da queratina (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

Um parâmetro importante a ser verificado em formulações de aplicação tópica é o pH, pois este precisa ser compatível com o pH da pele e com o pH de estabilidade dos componentes presentes na formulação, principalmente o pH de estabilidade do ativo. O pH cutâneo é normalmente ácido, apresentando valores entre 4,6 a 5,8, afim de promover a proteção bactericida e fungicida da sua superfície (GASPAR & CAMPOS, 2003). Já o VBM apresenta estabilidade máxima, no pH entre 4 e 5 (KHATTAK et al., 2012).

No caso das microemulsões (MEs) desenvolvidas, os pHs encontraram-se na faixa de 5,17 a 5,84 sem a presença do fármaco, e 5,18 a 5,89 na presença de 0,2% de VBM, mostrando que não houve alterações significativas de pH após a incorporação do fármaco, como pode ser observado na Tabela 15. Além disso, foi verificado o pH da formulação comercial Betnovate® creme ($4,78 \pm 0,01$) e o pH do gel de Carbopol® utilizado para veiculação das microemulsões ($5,29 \pm 0,01$). Portanto, todas as formulações permaneceram dentro da faixa de tolerabilidade para uso cutâneo e não se afastam do pH ótimo de estabilidade do fármaco.

5.5.4 Determinação do tamanho das gotículas e potencial zeta das microemulsões

Na avaliação do tamanho de gotícula, é possível observar na Tabela 15 que todas as preparações obtidas apresentaram pequenos diâmetros de gotícula, entre 14,67 e 37,56 nm, tanto na ausência quanto na presença de VBM, estando esses valores dentro da faixa de classificação de tamanho de gotícula para microemulsões (MEs), já que sistemas dessa natureza consistem nos menores tamanhos de gotículas (10 e 100 nm de diâmetro) dentre os sistemas emulsionados (ROSEN E KUNJAPPU, 2012; MCCLEMENTS, 2012).

Esses tamanhos reduzidos, quando comparados a emulsões convencionais, são resultado da formação de um filme interfacial de baixa energia livre na interface óleo/água (ALTHANYAN et al., 2011), levando a formação de uma estrutura estável. Os tamanhos de gotículas encontrados nas MEs desenvolvidas tornam viável a aplicação das mesmas como sistemas de liberação prolongada para administração via cutânea (TROTITA, 1999; SILVA et al., 2009).

Um parâmetro de qualidade associado ao tamanho de gotícula é o de índice de polidispersão (IPD), que representa a uniformidade na distribuição dos tamanhos de gotículas em toda a amostra testada. Nas MEs avaliadas, não houve valores de IPD maiores que 0,6 (Tabela 15) demonstrando certa homogeneidade dos sistemas.

Embora não se tenha estabelecido uma correlação numérica direta entre um valor de IPD e as amostras, em uma escala de 0 a 1, os valores mais próximos de 0, indicam sistemas

monodispersos com alta homogeneidade na população de gotículas. Em contrapartida, à medida que o IPD se aproxima de 1, é notável a existência de uma distribuição de tamanho do tipo polimodal, ou seja, várias populações de tamanhos diferentes numa mesma amostra. (CALVO et al., 1996; CONEAC et al., 2015).

Tabela 15 - Valores de pH, Potencial Zeta, tamanho de gotícula e índice de polidispersão das microemulsões desenvolvidas.

FORMULAÇÃO	pH	Potencial Zeta (mV)	Tamanho de gotícula IPD	
			(nm)	
ME 1 Placebo	5,43±0,02	-1,407±0,7	27,51±0,18	0,30±0,02
ME 1 0,2% VBM	5,39±0,01	-3,036±0,7	36,19±0,5	0,60±0,09
ME 2 Placebo	5,84±0,04	-1,953±0,3	14,67±0,2	0,48±0,03
ME 2 0,2% VBM	5,89±0,02	-2,816±0,7	20,2±1	0,30±0,05
ME 3 Placebo	5,44±0,05	-2,826±1,7	21,87±0,3	0,39±0,1
ME 3 0,2% VBM	5,29±0,01	-3,596±1,1	27,8±0,6	0,40±0,05
ME 4 Placebo	5,17±0,02	-1,570±0,23	33,09±0,5	0,56±0,14
ME 4 0,2% VBM	5,18±0,02	-2,16±0,15	37,56±0,8	0,50±0,09

Fonte: Elaborado pelo autor.

Outra caracterização importante é o potencial zeta dessas microemulsões, essa avaliação mede a magnitude da diferença de potencial (em mV) entre a superfície das gotículas e um meio, ou ainda da repulsão ou atração eletrostática entre elas e dá informação sobre a estabilidade física do sistema (KUMAR et al., 2017). O potencial positivo ou negativo confere à gotícula estabilidade devido ao grau de repulsão entre elas. Dessa maneira, é esperado que quanto maior for o valor do potencial zeta, maior será a estabilidade da formulação, uma vez que a repulsão gerada atrasará a coalescência, evitando a fusão de gotículas que poderia resultar em uma separação de fases (WU, ZHANG, WATANABE, 2011).

É por essa razão que este parâmetro é relacionado como indicador de estabilidade de emulsões, porém torna-se um erro associar o potencial zeta (e, em particular, valores superiores a 20 mV) como único fator que indica estabilidade (ROZENTUR et al., 2010).

Todas as formulações, com e sem a incorporação de VBM, apresentaram potenciais zeta negativos, entre -3,596 e -1,407 mV (Tabela 15). Considerando esses valores, a formação de

carga negativa confirma que há alguma repulsão entre as gotículas, apesar de valores baixos de potencial zeta e por isso, as MEs são propensas a permanecerem estáveis ao longo do estudo de estabilidade.

É dito que sistemas que apresentam valores de potencial zeta iguais ou superiores ao módulo de 20 mV são ainda mais estáveis, porém esta regra não pode ser aplicada sem restrição, pois existem formulações que possuem um potencial zeta menor e nem por isso são instáveis (KHAN et al., 2013).

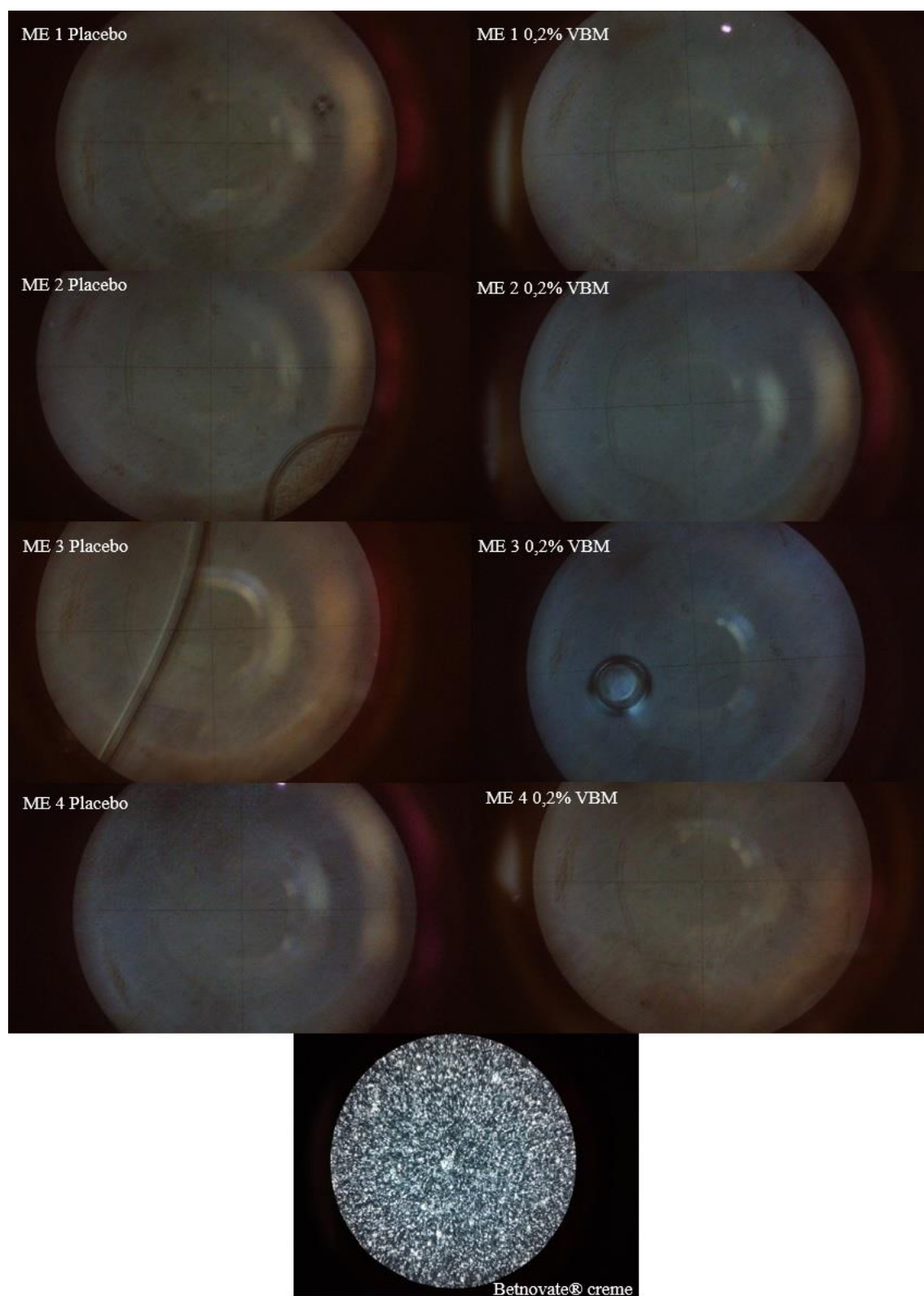
Além da observação visual, onde nenhuma ME mostrou sinais de instabilidade, todas elas apresentaram pH, potencial zeta, tamanho de gotícula e IPD dentro dos limites apropriados. Considerando esses parâmetros iniciais, as formulações foram classificadas como adequadas para a análise de estabilidade acelerada durante 180 dias.

5.5.5 Microscopia de luz polarizada

Esse tipo de análise é uma das maneiras de classificar as fases líquido cristalinas, determinando sua isotropia óptica. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas e microemulsões são isotrópicas (NORLING et al., 1992; BRINON et al., 1999; HYDE, 2001; PAREKH, 2011).

As formulações microemulsionadas (ME1, ME2, ME3 e ME4) mostraram ser isotrópicas, ou seja, não apresentaram desvio ou vibração de luz polarizada, podendo ser observado na forma de campo escuro (Figura 22). Todas as microemulsões apresentaram o mesmo comportamento óptico em todas as direções e os objetos presentes nas imagens são bolhas de ar. Como pode ser visto ainda na Figura 22 a incorporação de Betametasona a 0,2% não alterou o comportamento isotrópico das preparações. Além disso, temos a avaliação da formulação comercial, onde é possível observar que o Betnovate® creme sob a mesma metodologia, se apresenta de forma nítida como um sistema anisotrópico (GABBOUN et al., 2001).

Figura 22 - Fotomicrografias ao microscópio óptico de luz polarizada das microemulsões placebos; após adição de 0,2% de VBM e Betnovate® creme.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5.6 Doseamento de betametasona nas formulações desenvolvidas e formulação comercial Betnovate®creme

Como citado, a fim de aumentar a viscosidade das microemulsões (MEs) desenvolvidas com objetivo de adequá-las para aplicação tópica, as MEs com 0,2% de fármaco, foram adicionadas em gel de Carpobol® na proporção de 1:1, onde a concentração final ficou em 0,1% (de Valerato de Betametasona (VBM)). Na tabela abaixo, temos os resultados em percentual do teor encontrado nas formulações desenvolvidas e no Betnovate® creme, onde todas se encontram dentro do limite desejado e preconizado de 90 a 110% (USP, 2007).

Tabela 16 - Doseamento das formulações desenvolvidas e Betnovate® creme.

FORMULAÇÃO	TEOR (%)
F1	106,4±0,13
F2	99,0±0,05
F3	101,1±0,02
F4	107,0±0,01
Betnovate® creme	106,8±0,09

Fonte: Elaborado pelo autor.

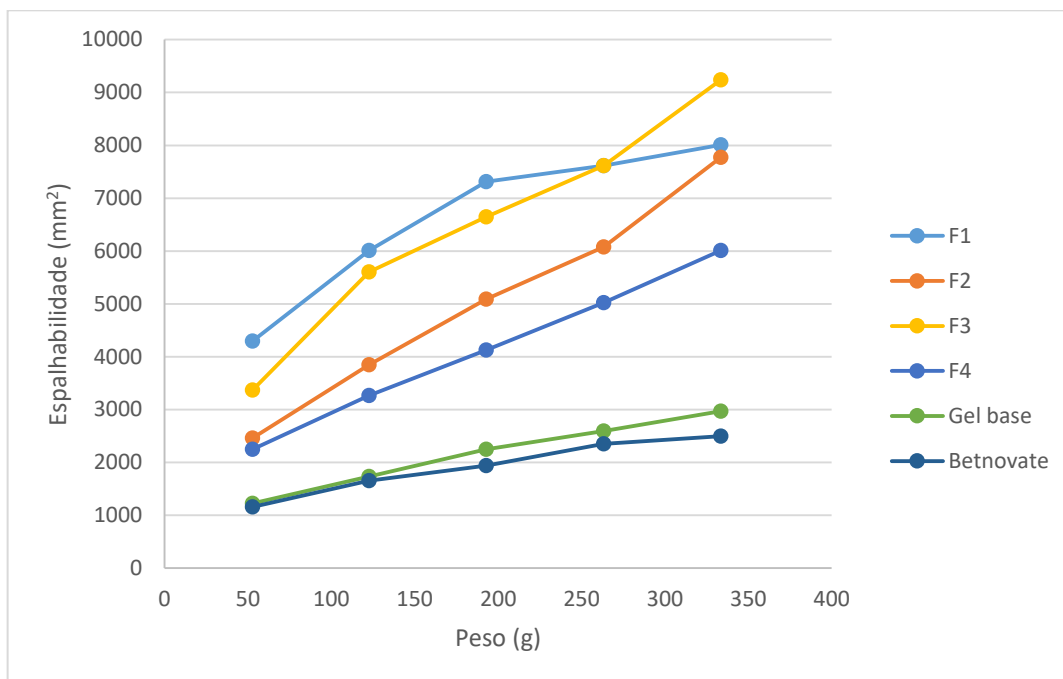
5.5.7 Determinação da espalhabilidade

A expansão de uma formulação semissólida sobre uma superfície após um determinado período de tempo é a definição para o parâmetro de espalhabilidade. Quando trabalhamos com formulações destinadas ao uso tópico, esse parâmetro é essencial, pois está diretamente relacionada com a aplicação da forma farmacêutica no local de ação (BORGUETTI & KNORST, 2006).

Os valores de espalhabilidade encontrados para as formulações finais em géis, em função do peso das placas adicionadas estão representados na Figura 23.

Visto que a espalhabilidade é inversamente proporcional a viscosidade do meio, é possível verificar que a veiculação de microemulsões nos géis, como ocorre em F1, F2, F3 e F4, foi capaz de aumentar a espalhabilidade quando comparadas aos valores obtidos do gel base (sem microemulsão) e também em relação ao Betnovate ®creme, que é uma formulação convencional de maior viscosidade quando comparada ao gel base composto de 0,5% de Carpobol®.

Figura 23 - Espalhabilidade das formulações estudadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES

Os resultados obtidos após a realização do estudo de estabilidade acelerada podem ser utilizados na avaliação do impacto que os efeitos físicos e químicos promovem no produto farmacêutico quando o mesmo é exposto a condições forçadas de armazenamento (BRASIL, 2005). Esse tipo de estudo demonstra empiricamente e com grande probabilidade de acerto o que ocorreria quando este produto fosse submetido a condições normais de armazenamento, visto que na maioria dos casos, o estudo de estabilidade de longa duração confirma a previsão dada pelo estudo acelerado.

As formulações desenvolvidas foram encaminhadas ao LAFEPE, para seguirem o estudo de estabilidade acelerada durante 180 dias. Na tabela abaixo, temos os resultados da avaliação da qualidade dos géis contendo as microemulsões com VBM no tempo zero.

Tabela 17 - Avaliação da estabilidade das formulações contendo VBM no tempo zero.

Formulações	Consistência	Cor	Odor	pH	Peso (g)	Teor de VBM
F1	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,41±0,02	30	109,2 %
F2	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,75±0,04	30	103,8 %
F3	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,34±0,11	30	99,6 %
F4	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,22±0,08	30	107,8 %

Consistência: ++ (gel viscoso); + (gel pouco viscoso); - (sem viscosidade). N=3.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode ser observado que todas as amostras apresentaram consistência característica de um gel fluido, com cor levemente amarelada, característico da mistura de tensoativos presentes nas MEs, e odor residual de óleo de licuri.

Todas as formulações permaneceram fisicamente estáveis ao longo do período de estudo, sem ocorrência de turbidez, separação de fases e alterações de coloração. Nas Tabelas 18 e 19, estão demonstrados os resultados quanto a consistência, cor, odor, pH, perda de água e teor de VBM, em 90 e 180 dias, respectivamente.

Tabela 18 - Avaliação da estabilidade das formulações contendo VBM no tempo 90 dias.

Formulações	Consistência	Cor	Odor	pH	Perda de água (%)	Teor de VBM
F1	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,47±0,05	0,861	108 %
F2	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,68±0,09	0,913	98 %
F3	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,29±0,16	1,124	95 %
F4	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,25±0,21	2,100	102 %

Consistência: ++ (gel viscoso); + (gel pouco viscoso); - (sem viscosidade). N=3.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 19 - Avaliação da estabilidade das formulações contendo VBM no tempo 180 dias.

Formulações	Consistência	Cor	Odor	pH	Perda de água (%)	Teor de VBM
F1	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,61±0,12	1,098	103 %
F2	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,53±0,08	1,540	96 %
F3	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,19±0,27	1,976	93,8 %
F4	+	Levemente amarelado	Residual de óleo	5,31±0,11	2,356	101,6%

Consistência: ++ (gel viscoso); + (gel pouco viscoso); - (sem viscosidade). N=3.

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com cada fármaco utilizado, o pH deve ser mantido em valores favoráveis à sua estabilidade de acordo com a formulação e com o local de aplicação, o pH das formulações após o estudo continuou dentro da faixa de tolerância da pele (4,6 – 5,8). Já de acordo com a resolução, para o estudo de estabilidade acelerada, a perda de água não deve ser maior do que 5% do valor inicial. Desta forma, a perda de água apresentada pelas formulações encontra-se dentro do limite especificado tanto após 90 dias quanto após 180 dias de teste.

Quanto ao teor do fármaco, durante os 180 dias de acomodação em câmara climática, as formulações apresentaram teores dentro do intervalo preconizado de 90 – 110%, como recomendado pela Farmacopeia Americana (USP, 2007). Considerando os dados obtidos, as formulações podem ser consideradas estáveis.

5.7 ESTUDOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO, ABSORÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DA BETAMETASONA

5.7.1 Análise dos perfis de liberação e absorção cutânea

A seleção do meio receptor para os experimentos de liberação e permeação *in vitro* do fármaco é um ponto crítico para a conduta correta desses ensaios. Algumas características são desejáveis para um meio receptor adequado, como a capacidade de manter as condições *sink* na temperatura do ensaio, ter pH compatível com fluidos biológicos, não alterar a composição da formulação por difusão inversa através da membrana usada e ser compatível com o método analítico de quantificação (SHAH et al., 1999).

A condição *sink* é obtida quando a concentração do fármaco dissolvido no meio receptor após difusão pela membrana se apresenta menor que 10% da sua concentração de saturação, evitando assim a saturação do meio (WESTER, MAIBACH, 1989).

A solubilidade determinada para o VBM em tampão fosfato pH 7,4; tampão fosfato pH 7,4 com *polyoxyethylene 20-oleyl ether* (Brij® 020) a 0,5%; tampão fosfato pH 7,4 com Brij® 020 a 1% e solução hidroalcoólica (água:etanol = 60:40), após 24 horas de agitação a temperatura controlada ($32 \pm 2^\circ\text{C}$), foi de 0,012; 0,05; 0,11 e 0,5 mg/mL, respectivamente. Mesmo não apresentando a maior solubilidade entre os meios testados, o tampão fosfato com 0,5% de Brij® 020 foi escolhido como meio receptor, visto que permitiu a manutenção das condições *sink*, possui pH desejável e é adequado para injeção direta no equipamento de CLAE-UV para quantificação do fármaco.

O estudo de liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas, foram realizados no sistema automatizado de células de Franz, com duração de 12 horas.

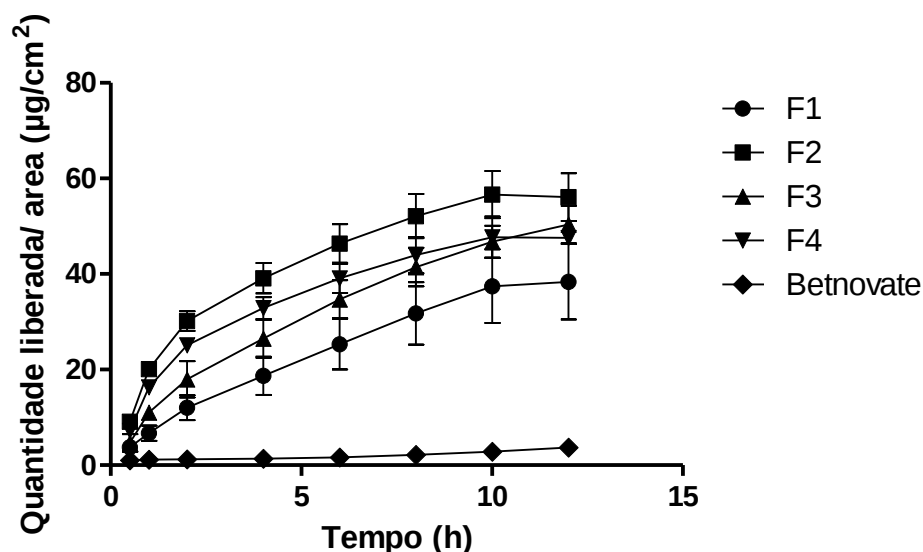
A partir da análise das quantidades liberadas apresentadas pelas formulações desenvolvidas, e após aplicação do método de regressão linear dos mínimos quadrados, o modelo cinético de Higuchi (avaliado entre 2 e 10h) demonstrou ser o mais adequado para explicar o comportamento da liberação apresentada pelas formulações, onde os valores dos coeficientes de determinação (Tabela 20) apresentam-se próximos de 1 quando comparado à aplicação de outros modelos. Esse modelo, também conhecido como pseudoprimeira ordem, indica que a difusão é controlada pelo sistema (HIGUCHI, 1960).

Tabela 20 - Quantidade liberada após 12h ($Q_{12} \pm D.P.$), Taxa de liberação $\pm D.P.$, e modelo cinético do VBM nas formulações.

Formulações	$Q_{12} \pm D.P.$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Taxa de liberação ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Coefficiente de determinação (r^2)	Modelo cinético
F1	$38,38 \pm 7,80$	$3,513 \pm 0,63$	0,993	Higuchi
F2	$56,06 \pm 4,90$	$3,296 \pm 0,36$	0,976	Higuchi
F3	$50,36 \pm 3,96$	$3,631 \pm 1$	0,998	Higuchi
F4	$47,58 \pm 4,32$	$2,808 \pm 0,35$	0,963	Higuchi
Betnovate®	$3,69 \pm 0,57$	$0,27 \pm 0,01$	0,991	Higuchi

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 - Perfil de liberação in vitro das formulações desenvolvidas utilizando membrana sintética de ésteres de celulose 0,45 μm .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após tratamento estatístico por ANOVA *one-way* ($P < 0,05$) no intervalo de confiança de 95%, observou-se que há diferença estatisticamente significativa nas quantidades liberadas entre as formulações estudadas, onde a F1 é estatisticamente diferente de F2 e F4, enquanto que o Betnovate® é diferente de todas as formulações desenvolvidas.

O gráfico da quantidade de fármaco liberada para o meio receptor em função do tempo fornece o perfil e a taxa de liberação do fármaco da formulação para o meio receptor, sendo representados pela inclinação da parte reta da curva. Como observado no gráfico, todas as formulações desenvolvidas apresentaram liberação cumulativa do fármaco após 12 horas em quantidade inferior a $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, no entanto, apresentaram valores aproximadamente entre 12 e 15x maior quando comparadas à formulação comercial (Betnovate®).

A difusão do fármaco em direção ao meio receptor reflete a capacidade da sua saída da matriz da formulação, segundo a influência das interações químicas do fármaco com os componentes da matriz presente na formulação.

Já no estudo de absorção cutânea do VBM a partir das formulações desenvolvidas, conduzido no mesmo sistema de células de difusão, a região dorsal da pele de porco foi usada como membrana. As condições do experimento foram semelhantes ao ensaio de liberação, porém com tempo total de 6 horas. As amostras de meio receptor foram quantificadas ao final do experimento, e não foi encontrado quantidade acima do limite de quantificação do método

analítico de doseamento de VBM para nenhuma amostra oriunda dos experimentos de absorção. Esse resultado foi demonstrado para todas as formulações desenvolvidas e a formulação comercial de Betnovate® creme.

Esse comportamento no estudo de absorção corrobora as informações geradas pelo estudo de liberação. Como somente uma pequena quantidade do fármaco presente nas formulações foi capaz de ser liberada da matriz para o meio receptor quando utilizamos uma membrana não limitante, era esperado que no uso de uma membrana animal, dotada de estrutura altamente complexa, sendo uma barreira para passagem de substâncias, tivéssemos praticamente ou nenhuma quantidade de VBM permeada e encontrada no meio receptor.

5.7.2 Avaliação de retenção cutânea

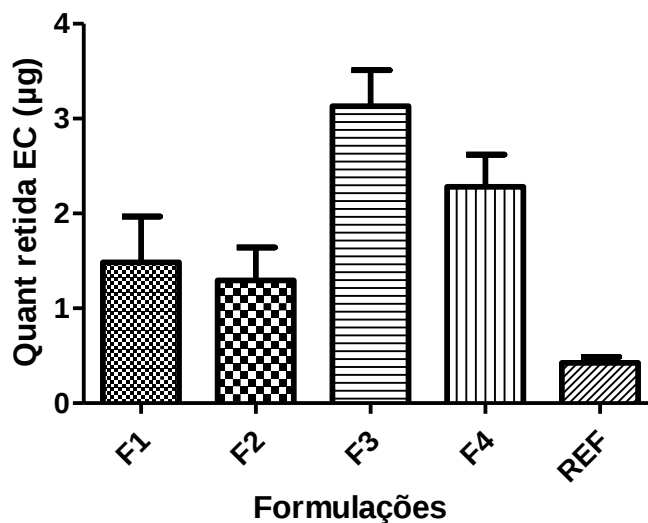
Quando avaliamos os produtos de uso tópico a partir de estudos *in vitro*, não somente a quantidade de ativo que permeia através da membrana é importante para a atividade final da formulação (SATO et al., 2007). Por esse motivo, a determinação da quantidade de fármaco retida na pele leva a considerações mais concretas sobre a eficácia do produto (MASINI et al., 1993). Isto pode ser realizado através da extração e quantificação do fármaco nas camadas de pele após determinado tempo de contato com a formulação.

A absorção percutânea de medicamentos aplicados topicamente é um processo complexo, após a liberação do fármaco da formulação, outra etapa crítica é a sua penetração na camada mais externa da pele, ou seja, o estrato córneo (EC), para que posteriormente possa seguir permeando essa estrutura até alcançar a epiderme e a derme (WIEDERSBERG et al., 2008).

Com isso, a concentração de fármaco presente no EC está diretamente relacionada com a concentração que permeia para as demais camadas, de modo que a biodisponibilidade na pele pode ser estimada ao se medir a quantidade de fármaco presente no EC pela técnica de *tape-stripping* (SHAH et al., 1998).

Em relação aos resultados da retenção cutânea, a Figura 25 apresenta a concentração do fármaco encontrada no estrato córneo da pele do dorso do porco, ao final de 6 horas do estudo de absorção cutânea, de todas as formulações analisadas inclusive o Benovate® (formulação referência).

Figura 25 - Gráfico da quantidade retida de VBM no EC (μg) pela técnica de tape stripping após 6 h de absorção das formulações desenvolvidas e Betnovate® (REF).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi observado que, após as 6 horas de experimento, a formulação F3 acumulou mais fármaco no estrato córneo, seguida de $F4 > F1 > F2 > \text{Betnovate}^{\circledR}$. Após tratamento estatístico (ANOVA *one way*) foi visto que F1 reteve de forma semelhante a F2 ($P > 0,05$) e todas as outras formulações foram estatisticamente diferentes entre si. Havendo destaque para a alta retentividade de F3 quando comparada com a formulação comercial Benovate® (aproximadamente 7 vezes maior), o que mostra a capacidade de sistemas microemulsionados, atuarem como promotores de permeação, devido ao tamanho reduzido das gotículas e ao seu conteúdo de tensoativo, que desorganiza os lipídeos da pele (DAMASCENO et al., 2011; SILVA et al., 2010). Na tabela a seguir constam os resultados da concentração retida de VBM para as diferentes formulações, no estrato córneo e da epiderme/derme.

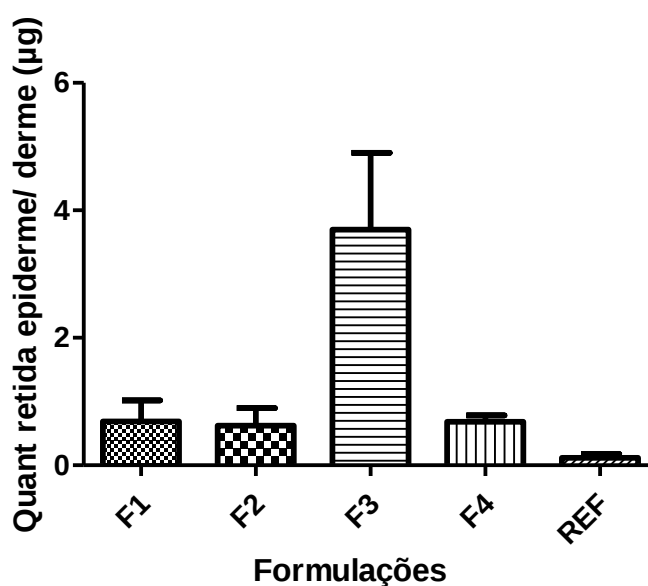
Tabela 21 - Média±DP da quantidade retirada de fármaco no EC e epiderme/derme após 6h de absorção das formulações desenvolvidas e Betnovate®.

Quantidade retida de fármaco (µg)		
FORMULAÇÃO	Estrato Córneo	Epiderme/derme
F1	1,5±0,5	1,02±0,001
F2	1,296±0,34	0,618±0,31
F3	3,195±0,39	3,679±1,32
F4	2,287±0,33	0,686±0,1
Betnovate®	0,424±0,06	0,114 ±0,07

Fonte: Elaborado pelo autor.

A concentração de VBM também foi determinada na epiderme/derme da pele de porco utilizada no estudo de absorção cutânea, após as 6 horas de experimento. Corroborando com os resultados da retenção no EC, onde a formulação F3 apresentou-se em maior quantidade, a mesma formulação apresentou o maior valor para retenção cutânea (epiderme/derme), como visto na tabela 21 e representado na figura 26, na ordem de aproximadamente 30 vezes superior à retenção apresentada pela formulação de referência no mercado, o Betnovate® creme.

Figura 26 - Gráfico da quantidade retida de VBM (µg) na epiderme/derme após 6 h de absorção das formulações desenvolvidas e Betnovate® (REF).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da análise dos dados obtidos na retenção cutânea por ANOVA *one way*, a formulação F3 retém o fármaco numa quantidade estatisticamente diferente ($P < 0,05$) e superior as demais formulações, que entre si, acumularam o fármaco de forma semelhante ($P > 0,05$).

Como pode ser observado, a formulação F3 apresentou maior retenção na epiderme/derme quando comparada com as demais formulações, porém, no estudo de liberação, comportou-se semelhante as outras formulações desenvolvidas, diferenciando-se somente do Betnovate. Considerando que as formulações F3 e F4 apresentam a mesma saturação do fármaco (seção 5.4) e quantidade de água semelhante em sua composição (seção 4.7), podemos comparar seus comportamentos, afim de justificar a maior retenção de F3 na pele, através dados de espalhabilidade e tamanho de gotícula. Dito isto, provavelmente a menor viscosidade da formulação F3 somado ao seu menor tamanho de gotículas, foram fundamentais na maior permeação obtida a partir desta formulação.

Um produto de uso tópico, destinado ao tratamento de condições patológicas cutâneas, exige que o fármaco fique retido na pele, com pequeno ou inexistente fluxo através dela (SHAH, 1999). Com isso, é possível verificar que a formulação desenvolvida F3 pode ser uma alternativa promissora no tratamento de inflamações cutâneas, visto que, como desejado, apresenta maior retentividade nas camadas da pele, sem passagem para o meio receptor, demonstrado pelos ensaios de permeação e retenção cutânea *in vitro*, utilizando pele de porco como modelo de membrana animal.

Diante disso, a formulação F3 foi selecionada para seguir com o estudo de branqueamento, método farmacodinâmico capaz de gerar informações acerca da eficácia dos corticóides tópicos.

5.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE POR MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS

A avaliação do potencial irritante de diversos produtos e substâncias químicas, como agrotóxicos, cosméticos e medicamentos, foi realizada durante muito tempo utilizando, exclusivamente, animais de laboratório. Os primeiros testes de irritação ocular e cutânea, foram descritos por John H. Draize e consolidados como testes clássicos até os tempos modernos (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944; DRAIZE, 1959).

A partir da consciência ética de vários pesquisadores durante a história, houve o interesse por iniciar o desenvolvimento de métodos alternativos que pudessem obter os mesmos resultados que os testes clássicos, porém, sem que houvesse o uso de tantos animais e com a possibilidade de evitar o sofrimento gerado (WHITE, 2001; MEYER, 2003).

Com base na atual tendência mundial de reavaliação dos testes que usam animais de laboratório, e a crescente busca por alternativas válidas para geração de resultados seguros e confiáveis no âmbito da toxicidade de produtos, as microemulsões desenvolvidas neste trabalho foram avaliadas quanto a irritabilidade ocular, por meio de duas metodologias alternativas ao uso de animais, o *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM) e o *Chorioallantoic Membrane – Trypan Blue Staining* (CAM-TBS), ambos são testes utilizando a membrana corioalantoide (MCA) de ovos embrionados de galinha. A MCA é uma membrana respiratória vascularizada que se encontra dentro do ovo embrionado, e possui processo vascular e inflamatório semelhante ao tecido conjuntival de olhos de coelho (ICCVAM, 2010).

O HET-CAM é um método útil em fornecer respostas qualitativas sobre os potenciais efeitos irritativos que podem ocorrer na conjuntiva após exposição da substância teste. Já o CAM-TBS, trata-se de uma variação do teste anterior, onde a resposta sobre a irritação é obtida por valores quantitativos da absorção de um corante marcador (LAGARTO et al., 2006).

5.8.1 Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)

Foram testadas as quatro microemulsões desenvolvidas contendo VBM a 0,1% e seus respectivos placebos. Além da formulação comercial, o Betnovate® creme a 0,1%. As formulações poderiam ser classificadas em não irritante; irritante leve; irritante moderado e irritante severo. Pelos resultados obtidos das médias das sextuplicada, foi possível classificar cada formulação conforme a metodologia utilizada (tabela 22). Como controle negativo foi

usado solução salina (NaCl 0,9% p/v) e como controle positivo, solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N. As microemulsões foram testadas puras e o Betnovate® creme diluído 1:1 com NaCl 0,9%.

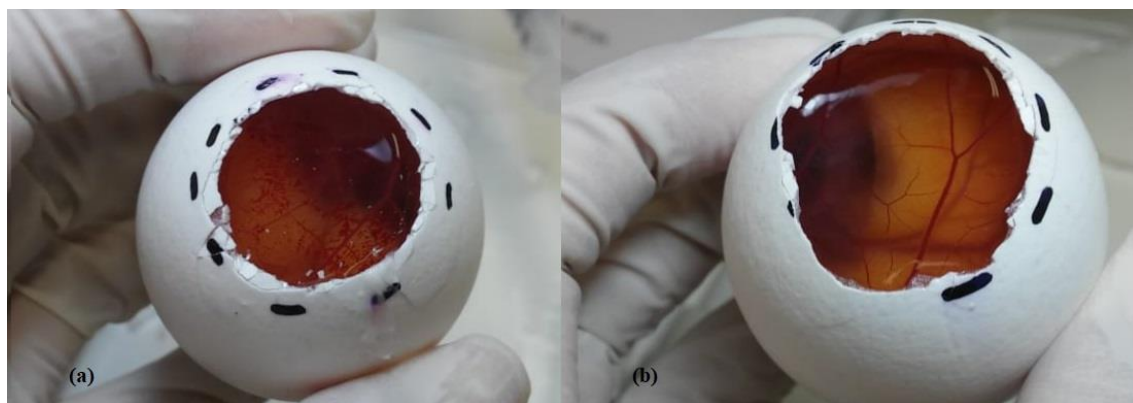
Tabela 22 - Resultados do teste HET-CAM (média $\pm$ D.P.) e classificação final.

MICROEMULSÃO	MÉDIA$\pm$D.P.	CLASSIFICAÇÃO FINAL
ME 1 0,1% VBM	2,33 $\pm$ 3,2	Irritante leve
ME 1 Placebo	0 $\pm$ 0	Não irritante
ME 2 0,1% VBM	1 $\pm$ 1,4	Irritante leve
ME 2 Placebo	0 $\pm$ 0	Não irritante
ME 3 0,1% VBM	1 $\pm$ 1,8	Irritante leve
ME 3 Placebo	0 $\pm$ 0	Não irritante
ME 4 0,1% VBM	0,33 $\pm$ 0,4	Não irritante
ME 4 Placebo	0 $\pm$ 0	Não irritante
Betnovate® creme	1,66 $\pm$ 2,3	Irritante leve
NaOH 0,1 N	12 $\pm$ 0,9	Irritante severo
NaCl 0,9%	0 $\pm$ 0	Não irritante

Fonte: Elaborado pelo autor.

A aplicação de solução salina a 0,9% nas membranas saudáveis não produziu resposta visual ao longo dos cinco minutos. Em contraste, a solução de NaOH 1N produziu pontos hemorrágicos (figura 27a), além da hiperemia dos vasos sanguíneos, que aumentou ao longo do tempo de análise, sendo classificada como um irritante severo. Tendo em vista o resultado do controle positivo e negativo, o método mostrou-se aceitável na avaliação da irritabilidade.

Figura 27 - MCA após aplicação dos controles.



(a) – Controle positivo (pontos hemorrágicos); (b) – Controle negativo.

Fonte: acervo pessoal.

Como pode ser observado nos resultados apresentados, todas as microemulsões placebo, ou seja, sem a incorporação do fármaco, foram classificadas como não irritantes. Essa resposta pode sugerir que os componentes utilizados nestas preparações (tensoativos e óleo de licuri), nas concentrações apresentadas, não mostraram potencial irritante ocular.

Porém quando o fármaco foi adicionado a estas preparações, três das quatro microemulsões (ME1; ME2 e ME3) passaram a ser classificadas como irritantes leves. A ME 4 teve sua média de resultado também aumentada, porém esse fato não foi suficiente para mudança de categoria na sua classificação final. Com isso, podemos levar em consideração que o aumento no potencial irritante das formulações foi devido ao VBM. Quando observamos o resultado referente ao Betnovate® creme, formulação disponível no mercado brasileiro, ela mostrou potencial irritante leve, assim como as ME1; ME2 e ME3 na presença do fármaco, corroborando com a ideia de que esse potencial irritante pode ser atribuído as características do princípio ativo.

Um parâmetro a ser levado em consideração, é o pH das formulações, essa informação é utilizada como triagem na avaliação da segurança de produtos. Produtos não irritantes aos olhos, geralmente possuem pH na faixa de 4,3 a 8,4, não sendo possível fazer previsões quando os valores estão fora dessa faixa, e mesmo que um produto ou substância apresente pH nesse intervalo, não se pode afirmar que o mesmo não seja irritante para os olhos (WORTH & CRONIN, 2001). Além disso, existe uma faixa de pH de conforto, que vai de 6,6 a 7,8 para produtos oculares, com base no pH lacrimal (CARNEY & FULLARD, 1979; TANG et. al., 1996). Neste quesito, todas as microemulsões apresentam pH dentro da faixa de produtos não irritantes e da faixa de pH de conforto lagrimal, o que reforça a ideia de que o potencial irritante

apresentado pelas microemulsões após incorporação do fármaco, é resultante de suas características intrínsecas.

Vale salientar que este método é considerado de uso limitado, devido a sua subjetividade, principalmente com base na variação de resultados encontrados por diferentes laboratórios. E apesar das informações obtidas serem de caráter qualitativo (observação do aparecimento de hiperemia, hemorragia e coagulação/opacidade), a subjetividade das leituras pode ser contornada com treinamento adequado de pessoal especializado (CORRADO et. al., 2007).

Mesmo o HET-CAM ainda não sendo uma metodologia oficialmente validada, ela é considerada válida na avaliação de segurança de produtos, sendo comumente utilizada por grandes indústrias de cosméticos, além de ser aceita por autoridades regulatórias de alguns países da comunidade europeia, como por exemplo, França e Alemanha (LIEBSCH & SPIELMANN, 2002).

Com o objetivo de contornar a limitação desse ensaio, alguns autores utilizam o método CAM-TBS, como uma variação do HET-CAM na avaliação do potencial irritante, cujo resultado é obtido de forma absolutamente quantitativa, pela detecção espectrofotométrica do corante azul de trypan absorvido pela MCA (HAGINO et al., 1991).

5.8.2 Chorioallantoic Membrane –Trypan Blue Staining (CAM-TBS)

As formulações microemulsionadas desenvolvidas também foram testadas pelo método CAM-TBS, onde, após a medida da absorbância do corante azul de trypan absorvido pelas MCAs dos ovos testados, os resultados foram calculados conforme a fórmula:

$$\text{Corante absorvido} = \text{Absorbância} \times 5 \text{ nmol} / 1000 \times 10^9,$$

e as formulações classificadas conforme as médias apresentadas na tabela a seguir:

Tabela 23 - Resultados do teste CAM-TBS (média $\pm$ D.P.) e classificação final.

MICROEMULSÃO	MÉDIA $\pm$ D.P.	CLASSIFICAÇÃO
		FINAL
ME 1 0,1% VBM	6,82 $\pm$ 2,65	Não irritante/ligeiramente irritante
ME 1 Placebo	5,24 $\pm$ 0,75	Não irritante/ligeiramente irritante
ME 2 0,1% VBM	6,40 $\pm$ 2,02	Não irritante/ligeiramente irritante
ME 2 Placebo	3,08 $\pm$ 0,09	Não irritante/ligeiramente irritante
ME 3 0,1% VBM	6,34 $\pm$ 0,73	Não irritante/ligeiramente irritante
ME 3 Placebo	4,33 $\pm$ 0,22	Não irritante/ligeiramente irritante
ME 4 0,1% VBM	4,91 $\pm$ 1,18	Não irritante/ligeiramente irritante
ME 4 Placebo	4,71 $\pm$ 0,98	Não irritante/ligeiramente irritante
Betnovate® creme	2,35 $\pm$ 0,45	Não irritante/ligeiramente irritante
NaOH 0,1 N	16,51 $\pm$ 5,56	Irritante severo
NaCl 0,9%	3,08 $\pm$ 0,09	Não irritante/ligeiramente irritante

Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim como no HET-CAM, a resposta obtida dos controles positivos e negativos foi adequada, onde o NaOH 1N comportou-se como substância irritante severa e o NaCl 0,9% como não irritante/ligeiramente irritante. De acordo com a classificação de Lagarto (2006), os produtos podem estar em três categorias, não irritante/ligeiramente irritante; moderadamente irritante ou irritante severo.

Como é possível observar nos resultados, todas as microemulsões, tanto placebo como com VBM, foram classificadas no menor nível de irritabilidade, como não irritante/ligeiramente irritante. Quando observamos os resultados das médias obtidas, é possível verificar que na presença do fármaco, o valor final é aumentado, porém sem magnitude para alterar sua classificação final. Essa informação corrobora com os resultados obtidos pelo HET-CAM, onde o leve potencial irritante de algumas formulações foi atribuído a presença do fármaco e não aos outros constituintes (tensoativos e óleo), nem ao pH das microemulsões.

Por se tratar de dois testes que avaliam o mesmo *endpoint*, a irritação ocular, e que utilizam o mesmo local como alvo do estudo (a MCA), os resultados mostram a coesão que existe entre estas metodologias, visto que podem ser utilizadas de forma complementar para dar mais robustez na avaliação de segurança desses produtos.

Além disso, não foi observado potencial de irritação moderado nem severo para nenhuma formulação em nenhum dos testes realizados, podendo assim sugerir que estas microemulsões são seguras para aplicação dérmica, pois sabe-se que se uma formulação não apresenta potencial irritante ao nível ocular muito dificilmente será irritante para pele.

Mesmo com o atual conhecimento, ainda não é possível substituir totalmente o uso de animais por uma única metodologia *in vitro* de avaliação de irritação ocular, dérmica e de mucosas, portanto, criar conjuntos de testes que possam reduzir substancialmente o número de animais usados, se faz necessário. Essa conduta significa também diminuir as chances de expor os animais ao sofrimento e a dor.

5.9 AVALIAÇÃO FARMACODINÂMICA *IN VIVO* – ENSAIO DE BRANQUEAMENTO

A eficácia de um corticoide tópico está relacionada à sua potência farmacológica e à sua capacidade de absorção nas células alvo dentro da epiderme viável e derme. Atualmente, os principais métodos para avaliação da entrega tópica de fármacos são divididos em duas abordagens: (a) ensaios *in vitro*, incluindo os ensaios de liberação e permeação cutânea; e (b) ensaios *in vivo*, que engloba os ensaios clínicos, a dermatofarmacodinâmica (ex: vasoconstricção para glicocorticóides), a dermatofarmacocinética (DPK) e a microdiálise cutânea (WIEDERSBERG, 2006; WIEDERSBERG et al., 2008).

No caso dos glicocorticóides tópicos, a biodisponibilidade pode ser avaliada pelo ensaio de branqueamento, devido a capacidade farmacodinâmica desses fármacos em gerar vasoconstricção. Neste trabalho, três formulações foram testadas para este ensaio: formulação F3 a 0,1%; a mesma formulação (F3) a 80% do nível de saturação do fármaco e Betnovate® creme a 0,1%.

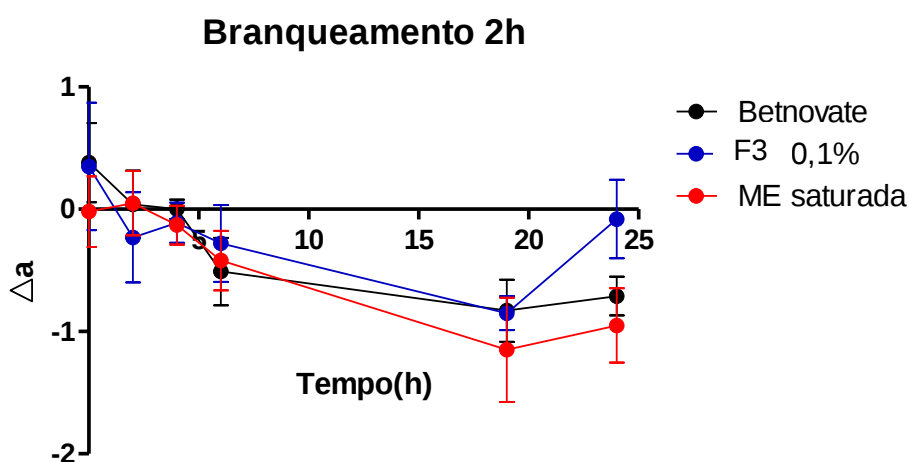
As leituras realizadas nos locais em teste foram corrigidas pelas linhas de bases e expressas como valores de Δa . A resposta média de branqueamento (Δa) *versus* horas após remoção da formulação, para os diferentes veículos, concentrações e tempos de contato, estão presentes nas Figuras 28 e 29.

Foi verificado o branqueamento da pele após a remoção das formulações, com 2 e 6 horas de contato, onde todas apresentaram pico máximo de branqueamento 19 horas após a remoção. O que mostra que o fármaco presente inicialmente no estrato córneo foi permeando aos poucos

a partir do local de aplicação mesmo após várias horas da remoção, um fenômeno conhecido como efeito reservatório (BACH & LIPPOLD, 1998).

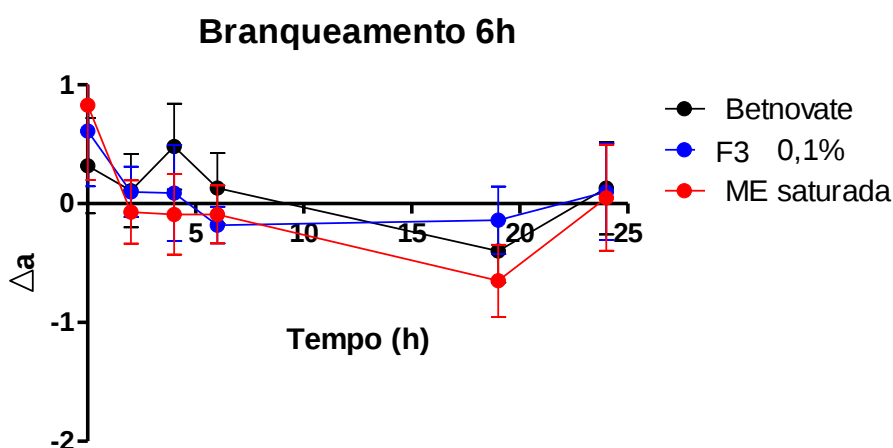
Porém, de acordo com a análise estatística aplicada (ANOVA *one way*), não houve diferença nesta resposta de branqueamento entre as diferentes formulações testadas nos dois tempos de duração de contato (2 e 6 horas), nas concentrações aplicadas (0,1% e 80% de saturação), mostrando que a avaliação do branqueamento não foi capaz de distinguir farmacodinamicamente as formulações, sendo, portanto, consideradas semelhantes.

Figura 28 - Gráfico do Δa x tempo após remoção das formulações de VBM, após 2 horas de contato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 - Gráfico do Δa x tempo após remoção das formulações de VBM, após 6 horas de contato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No entanto, estas conclusões são baseadas em medições de resposta farmacodinâmica, que é de natureza saturável, uma abordagem independente (dermatofarmacocinética *in vivo*) poderia ser usada para avaliar a permeação do fármaco.

6 CONCLUSÃO

- Após a seleção dos componentes para o desenvolvimento das microemulsões, foi escolhido como par de tensoativos o PEG 400 e Tween 80, devido à adequada solubilidade do ativo, além da facilidade de aquisição, assim como o óleo de licuri, que foi selecionado também por ser de origem vegetal, oriundo de uma palmeira característica da região de caatinga brasileira.
- Foram desenvolvidos os diagramas de fase pseudoternários, delineando os pontos onde existiu a formação de sistemas opticamente transparentes, dos quais foram selecionadas quatro microemulsões para seguirem os testes de caracterização.
- As formulações microemulsionadas contendo óleo de licuri, foram desenvolvidas com sucesso, mostrando a capacidade desse óleo em ser um candidato para utilização como adjuvante farmacêutico em formulações tópicas, como alternativa, inclusive, ao ácido oleico.
- Os estudos de centrifugação, solubilidade em corante, pH, tamanho de gotícula, potencial zeta e microscopia de luz polarizada permitiram caracterizar adequadamente os sistemas microemulsionados. Após incorporação do Valerato de Betametasona (VBM), todas as microemulsões permaneceram estáveis, sem alterações significativas das características avaliadas.
- O método analítico para quantificação do fármaco por cromatografia líquida de alta eficiência se mostrou adequado e capaz de produzir resultados confiáveis.
- Após veiculação das microemulsões contendo VBM 0,1% em gel de Carbopol a 0,5%, as formulações estavam adequadas para aplicação tópica, sem excesso de fluidez.
- De acordo com o estudo de estabilidade acelerada, realizada conforme RE 01/2005 da ANVISA, as formulações desenvolvidas permanecem estáveis durante os 180 dias de estudo.
- Nos estudos de liberação das formulações, utilizando células de Franz e membrana sintética, todas apresentaram modelo cinético de Higuchi, e liberaram aproximadamente 0,078% da quantidade de VBM aplicada. Nenhuma quantidade acima do limite de quantificação do método utilizado foi encontrada no líquido recepto nos estudos de absorção cutânea.
- Na avaliação da retenção cutânea, foi possível quantificar o VBM tanto no estrato córneo (EC) como na epiderme/derme. A formulação F3 acumulou significativamente mais fármaco no EC, em relação as outras formulações, incluindo Betnovate®creme

(formulação de mercado). A técnica de *tape-stripping* mostrou-se simples e adequada na remoção de EC após estudo de absorção cutânea *in vitro* com pele de porco. A mesma formulação (F3) reteve em maior quantidade na epiderme/derme, em relação as demais formulações.

- O comportamento de F3 em reter o VBM nos locais onde estão presentes as células-alvo é animador quando pensamos na possibilidade de aumento de potência do fármaco e melhora na eficácia.
- Os métodos alternativos utilizados (HET-CAM e CAM-TBS) para avaliar o potencial de irritação das formulações revelaram-se reprodutíveis, mostraram resultados semelhantes e determinaram que as formulações são seguras para aplicação tópica, apresentando níveis de irritação leve ou ausente.
- Estes métodos alternativos podem ser aceitáveis para avaliar o potencial irritante de novos sistemas, como as microemulsões, e não apenas formulações convencionais e substâncias puras.
- Devido à maior retentividade na pele, F3 foi conduzida para a avaliação farmacodinâmica *in vivo*, em diferentes concentrações. Houve branqueamento a partir de todas as formulações, nos tempos de 2 e 6 horas de contato, porém não houve diferença estatística entre os veículos, concentrações e tempos de contato. É possível sugerir a avaliação seguindo outras abordagens, como, por exemplo, a dermatofarmacocinética *in vivo*.
- Como esperado para formulações de ação na pele, a retenção do ativo nas suas camadas, sem passagem para corrente sanguínea é desejável, tornando F3 uma formulação promissora na otimização da administração tópica de VBM nas doenças dermatológicas de caráter inflamatório, como psoríase e dermatite tópica, onde os efeitos sistêmicos de corticoides seriam evitados e até eliminados pela administração de produtos adequadamente desenvolvidos e avaliados, levando a um aumento na adesão do tratamento.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOTTALEB, Mona MA et al. Nanoparticles enhance therapeutic outcome in inflamed skin therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 1, p. 151-157, 2012.
- ABOOFAZELI, R. et al. Investigations into the formation and characterization of hospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-sopropyl myristate and either an alkanoic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant. **International journal of pharmaceutics**, v. 111, n. 1, p. 63-72, 1994.
- ABREU, Clarice Lima do Canto et al. Metodologias alternativas à experimentação animal: aplicação no controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. 2008.
- AJITH, S.; RAKSHIT, Kumar. Studies of mixed surfactant microemulsion systems: Brij 35 with Tween 20 and sodium dodecyl sulfate. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 40, p. 14778-14783, 1995.
- ALTHANYAN, M. S. et al. Microemulsion high performance liquid chromatography (MELC) method for the determination of terbutaline in pharmaceutical preparation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 55, n. 3, p. 397-402, 2011.
- ANTONIO, M.E.C.O. **Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas**. 2007, 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- AZEEM, Adnan et al. Microemulsions as a surrogate carrier for dermal drug delivery. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 35, n. 5, p. 525-547, 2009.
- BACH, Monika; LIPPOLD, Bernhard C. Influence of penetration enhancers on the blanching intensity of betamethasone 17-benzoate. **International journal of pharmaceutics**, v. 168, n. 1, p. 97-108, 1998.
- BANCIU, Manuela et al. Anti-angiogenic effects of liposomal prednisolone phosphate on B16 melanoma in mice. **Journal of controlled release**, v. 113, n. 1, p. 1-8, 2006.
- BARRY, Brian W. Breaching the skin's barrier to drugs. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 165, 2004.
- BARTOSOVA, L.; BAJGAR, J. Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 27, p. 4671-4677, 2012.
- BLANKSCHTEIN, Daniel; THURSTON, George M.; BENEDEK, George B. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. **The Journal of chemical physics**, v. 85, n. 12, p. 7268-7288, 1986.

BOARDMAN, C.; CHACHI, L.; GAVRILA, A.; KEENAN, C.R.; PERRY, M.M.; XIA, Y.C.; MEURS, H.; SHARMA, P. Mechanisms of glucocorticoid action and insensitivity in airways disease. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, p. 129 -143, 2014.

BOLZINGER, Marie-Alexandrine et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BONDAR, G. **As Ceras no Brasil e o Licuri (cocos coronata Mart.) na Bahia**. Instituto, 1942.

BORGHETTI, Greice Stefani; KNORST, Miriam Teresinha. Development and evaluation of physical stability from O/W lotions containing sunscreens. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 531-537, 2006.

BRAIN, Keith R.; WALTERS, Kenneth A.; WATKINSON, Adam C. Methods for studying percutaneous absorption. **Drugs and the Pharmaceutical Sciences**, v. 119, p. 197-270, 2002.

BRASIL, 2017. Resolução RDC nº 166/2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 24 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. Volume II. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº 18, de 24 de Setembro de 2014. Diário Oficial da União 25 de setembro de 2014.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA nº 31, de 18 de Agosto de 2016. Diário Oficial da União 19 de Agosto de 2016. BRASIL. Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Diário Oficial da União. 16 de Julho de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos**. 2 ed. Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Lei n. 9787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9787.htm >. Acesso em: 28 dez. 2018.

BRINON, Laure et al. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **Journal of controlled release**, v. 60, n. 1, p. 67-76, 1999.

BUTANI, Dhruv; YEWALE, Chetan; MISRA, Ambikanandan. Amphotericin B topical microemulsion: formulation, characterization and evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 351-358, 2014.

CALLENDER, Shannon P. et al. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 526, n. 1-2, p. 425-442, 2017.

CALVO, Pilar; VILA-JATO, José L.; ALONSO, María J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.

CARNEY, L. G.; FULLARD, R. J. Ocular irritation and environmental pH. **The Australian Journal of Optometry**, v. 62, n. 8, p. 335-336, 1979.

CARVALHO, A. L. M. **Cinética de difusão in vitro e atividade in vivo de preparações magistrais de cetoprofeno**. 2007, 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Recife, 2007.

CONEAC, Georgeta et al. Development and evaluation of new microemulsion-based hydrogel formulations for topical delivery of fluconazole. **Aaps Pharmscitech**, v. 16, n. 4, p. 889-904, 2015.

CONSTANTINIDES, Panayiotis P.; YIV, Seang H. Particle size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 115, n. 2, p. 225-234, 1995.

CORRADO, Márcia da Conceição et al. **Uso do método HET-CAM como modelo alternativo ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters na avaliação do potencial**. 2007. Tese de Doutorado.

CREPALDI, IARA CÂNDIDO et al. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p. 155-159, 2001.

CROSS, Sheree E. et al. Determination of the effect of lipophilicity on the in vitro permeability and tissue reservoir characteristics of topically applied solutes in human skin layers. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 5, p. 759-764, 2003.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 9-18, 2011.

DANGELO, J.G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

DEL ROSSO, James; FRIEDLANDER, Sheila Fallon. Corticosteroids: options in the era of steroid-sparing therapy. **Journal of the American academy of dermatology**, v. 53, n. 1, p. S50-S58, 2005.

DRAIZE, J. H. Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs, and cosmetics-dermal toxicity, Assoc. of Food and Drug Officials of the United States. **Topeka, Kans.**, p. 46-59, 1959.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 377-390, 1944.

DRUMOND, Marcos Antônio. *Licuri Syagrus coronata (Mart.) Becc.* Documentos 199. Petrolina, EMBRAPA Semiárido, 2007. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/152644/1/SDC199.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2018.

FANG, Jia-You et al. In vitro topical application and in vivo pharmacodynamic evaluation of nonivamide hydrogels using Wistar rat as an animal model. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 15, n. 5, p. 417-423, 2002.

ERENCE, Jonathan D.; LAST, Allen R. Choosing topical corticosteroids. **American family physician**, v. 79, n. 2, 2009.

FINAMOR, L. P.; FINAMOR JR, F.; MUCCIOLI, C. Corticosteroid therapy and uveitis. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 65, n. 4, 2002.

FORMARIZ, T. F. **Incorporação de doxorrubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa in vitro através de cultura de células.** Araraquara, Dissertação, Universidade Estadual Paulista, 199f, 2005.

FORMARIZ, Thalita Pedroni et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, p. 301-313, 2005.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **J Invest Dermatology**. v. 64, p. 190-195, 1975.

FRANZ, Thomas J. et al. Betamethasone valerate foam 0.12%: a novel vehicle with enhanced delivery and efficacy. **International journal of dermatology**, v. 38, n. 8, p. 628-632, 1999.

FRANZINI, C.M. **Estudo de microemulsões e subemulsões contendo anfotericina B para administração oral.** 2006, 142f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP.

GABBOUN, Nancy H. et al. Release of salicylic acid, diclofenac acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **International journal of pharmaceutics**, v. 212, n. 1, p. 73-80, 2001.

GANGADHAR, Katkam N.; ADHIKARI, Kajiram; SRICHANA, Teerapol. Synthesis and evaluation of sodium deoxycholate sulfate as a lipid drug carrier to enhance the solubility, stability and safety of an amphotericin B inhalation formulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 471, n. 1-2, p. 430-438, 2014.

GASPAR, L. R.; CAMPOS, PMBG Maia. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International journal of pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 35-44, 2003.

GILLERON, L. et al. Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy. **Toxicology in vitro**, v. 10, n. 4, p. 431-446, 1996.

GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro, 2005.

HAGINO, S. et al. Further evaluation of the quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of chemicals. **Toxicology in vitro**, v. 7, n. 1, p. 35-39, 1993.

HAGINO, S. et al. Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients.(2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. **Toxicology in vitro**, v. 13, n. 1, p. 99-113, 1999.

HAGINO, S. et al. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: Modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue. **Toxicology in vitro**, v. 5, n. 4, p. 301-304, 1991.

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

HIGUCHI, Takeru. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. **J. Soc. Cosmet. Chem**, v. 11, p. 85-97, 1960.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. **Nature**, v. 152, n. 3847, p. 102, 1943.

HOLMES, Anthony M.; CRETON, Stuart; CHAPMAN, Kathryn. Working in partnership to advance the 3Rs in toxicity testing. **Toxicology**, v. 267, n. 1-3, p. 14-19, 2010.

HUGHES, Jenny; RUSTIN, Malcolm. Corticosteroids. **Clinics in dermatology**, v. 15, n. 5, p. 715-721, 1997.

HYDE, Stephen T. et al. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. **Handbook of applied surface and colloid chemistry**, v. 2, p. 299-332, 2001.

ICCVAM. Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication 10-7553. ResearchTriangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2010.

JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE. **Relatif aux méthodes d'analyse nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques. Annexe IV: méthode officielle d'évaluation du potentiel irritant par application sur la membrane chorioallantoidienne de l'oeuf de poule**, 1996. p. 19137–19138.

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

KALWEIT, S. et al. A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test. **Toxicology in vitro**, v. 4, n. 4-5, p. 702-706, 1990.

KALWEIT, S.; GERNER, I.; SPIELMANN, H. Validation project of alternatives for the Draize eye test. **Molecular toxicology**, v. 1, n. 4, p. 597-603, 1987.

KANFER, I. Strategies for the Bioequivalence Assessment of Topical Dermatological Dosage Forms. **J Bioequiv Availab** 2: 102-110, 2010.

KASTURI, Shanthini; SAMMARITANO, Lisa R. Corticosteroids in lupus. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 42, n. 1, p. 47-62, 2016.

KATZ, Martin; POULSEN, Boyd J. Corticoid, vehicle and skin interaction in percutaneous absorption. **J Soc Cosmet Chem**, v. 23, n. 9, p. 565-590, 1972.

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

KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu, 771p., 2003.

KHATTAK, S. U. R. et al. Kinetics of thermal degradation of betamethasone valerate and betamethasone dipropionate in different media. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 74, n. 2, p. 133, 2012.

KHAN, Junaid et al. Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. **Journal of controlled release**, v. 168, n. 1, p. 50-60, 2013.

KOGAN, Anna; GARTI, Nissim. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in colloid and interface science**, v. 123, p. 369-385, 2006.

KREILGAARD, Mads. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, p. S77-S98, 2002.

KUMAR, Vikas et al. Anti-inflammatory chromone alkaloids and glycoside from *Dysoxylum binectariferum*. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 42, p. 3974-3978, 2017.

LAGARTO, A. et al. In vitro quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 5, p. 699-702, 2006.

LAWRENCE, M. Jayne; REES, Gareth D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 175-193, 2012.

LEAL, Leila Bastos et al. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, p. 167-173, 2013.

LEBWOHL, Mark G. et al. Pathways to managing atopic dermatitis: consensus from the experts. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 6, n. 7 Suppl, p. S2, 2013.

LIEBSCH, Manfred; SPIELMANN, Horst. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. **Toxicology letters**, v. 127, n. 1-3, p. 127-134, 2002.

LIPPOLD, Bernhard C.; SCHNEEMANN, Hubert. The influence of vehicles on the local bioavailability of betamethasone-17-benzoate from solution-and suspension-type ointments. **International journal of pharmaceutics**, v. 22, n. 1, p. 31-43, 1984.

LOYD, V.; ALLEN, J. R. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. Editora: ARTMED, Edição, v. 8, 2007.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

LUEPKE, N. P.; WALLAT, S. HET-CAM reproducibility studies. **Alternative Methods in Toxicology**, v. 5, p. 353-363, 1987.

MAIA, Michelle de Oliveira et al. Consumo, digestibilidade de nutrientes e parâmetros sanguíneos de cabras mestiças moxotó suplementadas com óleos de licuri ou mamona. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 149-155, 2010.

MANDAL, Sarthak et al. A novel ionic liquid-in-oil microemulsion composed of biologically acceptable components: an excitation wavelength dependent fluorescence resonance energy transfer study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 11, p. 3221-3231, 2013.

MARTÍNEZ-HIDALGO, M. P. **Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual**. Acta bioethica, v. 13, n. 1, p. 41-52, 2007.

MASINI, V. et al. Cutaneous bioavailability in hairless rats of tretinoin in liposomes or gel. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 82, n. 1, p. 17-21, 1993.

MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MCCLEMENTS, David Julian. Nanoscale nutrient delivery systems for food applications: improving bioactive dispersibility, stability, and bioavailability. **Journal of food science**, v. 80, n. 7, p. N1602-N1611, 2015.

MCKENZIE, A. W.; STOUGHTON, R. B. Method for comparing percutaneous absorption of steroids. *Archives of Dermatology*, v. 86, n. 5, p. 608-610, 1962.

MEYER, Otto. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology letters**, v. 140, p. 21-30, 2003.

MICHAELS, A. S.; CHANDRASEKARAN, S. K.; SHAW, J. E. Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. **AIChE Journal**, v. 21, n. 5, p. 985-996, 1975.

MIOLO, Giorgia et al. UVB photolysis of betamethasone and its esters: characterization of photoproducts in solution, in pig skin and in drug formulations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 96, n. 1, p. 75-81, 2009.

MITJANS, M.; INFANTE, M. R.; VINARDELL, M. P. Human hemoglobin denaturation as an alternative to the Draize test for predicting eye irritancy of surfactants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 52, n. 2, p. 89-93, 2008.

MONTENEGRO, Lucia et al. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 100-112, 2016.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

N'DRI-STEMPFER, Berthe et al. Optimizing metrics for the assessment of bioequivalence between topical drug products. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 7, p. 1621-1630, 2008.

NARKAR, Y. Bioequivalence for Topical Products—An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 2590-2601, 2010.

NOBLICK, L. R. Palmeiras das caatingas da Bahia e as potencialidades econômicas. **Simpósio sobre a Caatinga e sua Exploração Racional, Brasília, DF, EMBRAPA**, p. 99-115, 1986.

NÓBREGA, A. M. et al. Determination of eye irritation potential of low-irritant products: comparison of in vitro results with the in vivo draize rabbit test. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 3, p. 381-388, 2012.

NOON, J. P. et al. A comparison of techniques to assess skin blanching following the topical application of glucocorticoids. **British Journal of Dermatology**, v. 134, n. 5, p. 837-842, 1996.

NORLING, Tomas. et al. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **Journal of clinical periodontology**, v. 19, n. 9, p. 687-692, 1992.

OECD. Guideline for the testing of chemical, nº 428. Skin Absorption: in vitro Method, Paris, France, 2004.

OH, KYU-SEON. et al. Anti-Inflammatory Chromatinscape Suggests Alternative Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action. **Immunity**, v. 47, n. 2, p. 298 - 309, 2017.

PAREKH, Khushboo K. **Preparation, characterization, and in vitro protein release studies in pharmaceutically relevant lecithin microemulsions**. 2011. Tese de Doutorado. University of Toledo.

PATEL, Hetal K. et al. Topical delivery of clobetasol propionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: ex vivo permeation and skin irritation studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 86-94, 2013.

PATHAN, Inayat Bashir; SETTY, C. Mallikarjuna. Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 2, 2009.

PEIRA, Elena; SCOLARI, Paola; GASCO, Maria Rosa. Transdermal permeation of apomorphine through hairless mouse skin from microemulsions. **International journal of pharmaceutics**, v. 226, n. 1-2, p. 47-51, 2001.

PEREIRA, N. P.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Composição química do óleo fixo obtido dos frutos secos da [Chamomilla recutita (L.) Rauschert] produzida no município de Mandirituba, PR. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, p. 334-337, 2005.

PESTANA, K. C. et al. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 253-259, 2008.

PONEC, M.; POLANO, M. K. Penetration of various corticosteroids through epidermis in vitro. **Archives of dermatological research**, v. 265, n. 1, p. 101-104, 1979.

PONEC, Maria; KEMPENAR, Johanna A.; DE KLOET, E. Ronald. Corticoids and cultured human epidermal keratinocytes: specific intracellular binding and clinical efficacy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 76, n. 3, p. 211-214, 1981.

PRESGRAVE, O.A.F. Métodos alternativos. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. (Org.). Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo: Atheneu, 2009.

PROSSER, Alissa J.; FRANCES, Elias I. Adsorption and surface tension of ionic surfactants at the air–water interface: review and evaluation of equilibrium models. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 178, n. 1-3, p. 1-40, 2001.

PUBCHEM, 2018. Disponível em: <
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/betamethasone#section=Top>>. Acesso em: 03 de janeiro 2018.

QUEIROGA, R. C. R. E. et al. Produção e composição química do leite de cabras mestiças Moxotó sob suplementação com óleo de licuri ou de mamona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n.1, 2010.

ROSEN, Milton J.; KUNJAPPU, Joy T. **Surfactants and interfacial phenomena**. John Wiley & Sons, 2012.

ROSSETI, F. C. **Microemulsões como sistemas de liberação cutânea para zinco ftalocianina tetrasulfonada na terapia fotodinâmica do câncer de pele. 2006. 104f.** 2006. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

ROSSI, Cátia Guaraciara Fernandes Teixeira et al. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para a aplicabilidade industrial. **Revista de Ciências Exatas**, v. 26, n. 1-2, p. 22, 2009.

ROZENTUR, E., NASSAR, T., BENITA, S. CHAPTER 12: materials for nanoemulsions and their influence on the biofate. In: TORCHILLIN, V., AMIJI, M.M. (Eds.), Handbook of Materials for Nanomedicine. Pan Stanford, 2010.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L.; HUME, C. W. **The principles of humane experimental technique**. 1959.

SAHOO, Susijit; PANI, Nihar Ranjan; SAHOO, Sunit Kumar. Microemulsion based topical hydrogel of sertaconazole: Formulation, characterization and evaluation. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 120, p. 193-199, 2014.

SANTOS, Hamilton. Toxicologia: a garantia de cosméticos seguros. **Cosmetics and Toiletries Brasil, São Paulo, SP**, v. 20, p. 20-24, 2008.

SATO, Mayumi Eliza Otsuka et al. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

SCHEEL, Julia et al. Eye irritation potential: usefulness of the HET-CAM under the globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 59, n. 3, p. 471-492, 2011.

SCHMOOK, Fritz P.; MEINGASSNER, Josef G.; BILLICH, Andreas. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International journal of pharmaceutics**, v. 215, n. 1-2, p. 51-56, 2001.

SCHULMAN, Jack H.; STOECKENIUS, Walter; PRINCE, Leon M. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. **The Journal of physical chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1677-1680, 1959.

SHAH, Rohit R. et al. Fluconazole topical microemulsion: preparation and evaluation. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 2, n. 2, p. 353-357, 2009.

SHAH, Vinod P. et al. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms—methods of evaluation of bioequivalence. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 11, n. 2, p. 117-124, 1998.

SHAH, Vinod P.; ELKINS, Jerome S.; WILLIAMS, Roger L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharmaceutical development and technology**, v. 4, n. 3, p. 377-385, 1999.

SHAKEEL, Faiyaz; RAMADAN, Wafa. Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 356-362, 2010.

SHEN, J. et al. An in silico skin absorption model for fragrance materials. **Food and Chemical Toxicology**. USA, v.74, p.164-176, 2014.

SILVA, J. A. et al. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.

SILVA, JOSé ALEXSANDRO et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SIMON, A. et al. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 234-241, 2016.

SMITH, E. W.; HAIGH, J. M.; KANFER, I. A stability-indicating HPLC assay with on-line clean-up for betamethasone 17-valerate in topical dosage forms. **International journal of pharmaceutics**, v. 27, n. 2-3, p. 185-192, 1985.

SMITH, E. W.; HAIGHB, J. M.; SURBERC, C. Quantification of Corticosteroid-Induced Skin Vasoconstriction: Visual Ranking, Chromameter Measurement or Digital Imaging Analysis. **Dermatology**, v. 205, p. 3 - 10, 2002.

STEILING, W. et al. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology in vitro**, v. 13, n. 2, p. 375-384, 1999.

STILBS, Peter; RAPACKI, Krzysztof; LINDMAN, Björn. Effect of alcohol cosurfactant length on microemulsion structure. **J. Colloid Interface Sci. (United States)**, v. 95, n. 2, 1983.

STOUGHTON, Richard B. Are generic formulations equivalent to trade name topical glucocorticoids?. **Archives of dermatology**, v. 123, n. 10, p. 1312-1314, 1987.

TANDEL, H.; PATEL, P.; JANI, P. Preparation and study of efavirenz microemulsion drug delivery system for enhancement of bioavailability. **Eur. J. Pharm. Med. Res.**, v. 2, p. 1156-1174, 2015.

TANG, I. et al. The pH of multi-purpose soft contact lens solutions. **Optometry & Vision Science**, v. 73, n. 12, p. 746-749, 1996.

TAVASZI, J.; BUDAI, P. The use of HET-CAM test in detecting the ocular irritation. **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v. 72, n. 2, p. 137-141, 2007.

THAKKAR, Hetal et al. Formulation and characterization of lipid-based drug delivery system of raloxifene-microemulsion and self-microemulsifying drug delivery system. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 442, 2011.

TOSATO, M. G. **Análise dos constituintes da pele humana sob efeitos de cosmeceúticos por espectroscopia Raman**. 105 f. 2010. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)—Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

TREVIZAM, Claudemar José; CORREIA, Dicesar; DUARTE, Virginia Tânia Rita. Otimização do processo de extração do óleo de licuri (*Syagrus coronata*). **Rev Engenho**, v. 10, p. 1-19, 2014.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; GASCO, M. R. Influence of counter ions on the skin permeation of methotrexate from water-oil microemulsions. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 71, n. 2, p. 135-140, 1996.

TROTTA, Michele. Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. **Journal of Controlled Release**, v. 60, n. 2-3, p. 399-405, 1999.

US FDA (1998). **Guidance for industry: Topical dermatological drug product ndas and andas- in vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies**. Draft guidance, June 1998, US. Development of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).

USA. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Center of Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance: Topic Dermatologic Corticosteroids: in Vivo Bioequivalence**. Division of Bioequivalence, Office of Generic, Food and Drug Administration. 1995.

USA. **Pharmacopeia and National Formulary USP30-NF25**. Rockville: United States Pharmacopeia Convention; 2007.

VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 1, p. 46-59, 2008.

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.

WHITE, W. J. The use of laboratory animals in toxicologic research. In: HAYES, A. W. *Principles and methods of toxicology*. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001. cap. 16, p. 773-818.

WIEDERSBERG, Sandra et al. Pharmacodynamics and dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: assessment of topical bioavailability. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 3, p. 676-686, 2009.

WIEDERSBERG, Sandra; LEOPOLD, Claudia S.; GUY, Richard H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 453-466, 2008.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced. Drug Delivery Reviews**, v.56, n.5, p. 603-618, 2004.

WILLIAMS, Patrick L.; RIVIERE, Jim E. A biophysically based dermatopharmacokinetic compartment model for quantifying percutaneous penetration and absorption of topically applied agents. I. Theory. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 84, n. 5, p. 599-608, 1995.

WORTH, A.; BALLS, Michael. Alternative (Non-animal) Methods for Chemicals Testing: Current Status and Future Prospects A Report prepared by ECVAM and the ECVAM Working Group on Chemicals. **ATLA-NOTTINGHAM-**, v. 30, 2002.

WORTH, A. P.; CRONIN, M. T. D. The use of pH measurements to predict the potential of chemicals to cause acute dermal and ocular toxicity. **Toxicology**, v. 169, n. 2, p. 119-131, 2001.

WU, Libo; ZHANG, Jian; WATANABE, Wiwik. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

YANG, Ying et al. A procedure for application of eye irritation alternative methods on cosmetic ingredients. **ALTEX**, p. 139-143, 1991.

ZAMBIAZI, R. C., et al. Acid Composition of vegetable oils and fats - **B.CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 111-120, jan./jun. 2007.

ZHANG, Jin; SMITH, Eric. Percutaneous permeation of betamethasone 17-valerate incorporated in lipid nanoparticles. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 3, p. 896-903, 2011.

ZHAO, Yan-Guo; DING, Wei; WEI, Jie. Preparation of a bis-demethoxy curcumin microemulsion based on pseudo-ternary phase diagrams and an orthogonal test analysis. **Journal of Pesticide Science**, v. 36, n. 2, p. 248-251, 2011.