



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AIRLLA LAANA DE MEDEIROS CAVALCANTI

**SISTEMA MICROEMULSIONADO CONTENDO PENTOXIFILINA PARA
TRATAMENTO DE AFECÇÕES DERMATOLÓGICAS**

CAMPINA GRANDE – PB

2015

AIRLLA LAANA DE MEDEIROS CAVALCANTI

**SISTEMA MICROEMULSIONADO CONTENDO PENTOXIFILINA PARA
TRATAMENTO DE AFECÇÕES DERMATOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

Coorientadora: Prof^a Dr^a Karina Lidianne Alcântara Saraiva

CAMPINA GRANDE – PB

2015

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

C376s Cavalcanti, Airla Laana de Medeiros.
Sistema microemulsionado contendo pentoxifilina para tratamento de afecções dermatológicas [manuscrito] / Airla Laana de Medeiros Cavalcanti. - 2015.
130 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.
"Orientação: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia".
"Co-Orientação: Profa. Dra. Karina Lidiane Alcântara Saraiva, Departamento de Biologia".
1. Doenças dermatológicas inflamatórias. 2. Anti-inflamatório. 3. Pentoxifilina. 4. Microemulsão. I. Título.
21. ed. CDD 615.6

AIRLLA LAANA DE MEDEIROS CAVALCANTI

**SISTEMA MICROEMULSIONADO CONTENDO PENTOXIFILINA PARA
TRATAMENTO DE AFECÇÕES DERMATOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 13/02/2015.



Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

Orientador



Prof. Dr. Rodrigo José de Oliveira / UEPB

Examinador Interno



Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito/ UFRN

Examinador Externo

Aos meus pais, Ednan Custódio e Maria Betânia, essência do meu existir e minha razão para lutar pelos meus sonhos e através deles poder retribuir tudo que já fizeram por mim.

À minha irmã, Ednamarah Luana, pela nossa amizade, companheirismo, amor, apoio e pelas boas e velhas risadas extravagantes.

A vocês dedico este trabalho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Deus, por ter me dado uma das maiores oportunidades da minha vida, trabalhar e estudar, e fazer com que tudo culminasse neste momento, por todas as graças que me proporcionou ao longo dessa jornada, por ter me dado força nas dificuldades e uma alegria imensa diante das vitórias. À Ele toda minha gratidão e júbilo, não há palavras suficientes para exaltá-Lo.

Aos meus pais, Ednan Custódio Cavalcanti e Maria Betânia de Medeiros Cavalcanti. Até meu respirar é por vocês e para vocês... Obrigada por todo o esforço em fazer com que eu me tornasse o que sou hoje e se estou aqui é porque vocês me ensinaram a lutar pelos meus sonhos. Obrigada por me darem asas e por confiarem em meus voos, pois cada um deles faço pensando a cada instante em uma maneira de retribuir todo o amor e dedicação que vocês me proporcionam. Obrigada por compreenderem as ausências em tantas situações, experimentando o gosto amargo da saudade, que já conhecemos há algum tempo, obrigada pelo colo amoroso quando volto para casa, obrigada por chorar comigo e por vibrar junto também, obrigada pelas orações diárias, obrigada pelo amor e principalmente pelo exemplo.

À minha irmã, Ednamarah Luana, por ser minha companheinha de loucuras, pela amizade verdadeira na qual sei que poderei contar para sempre, pelo apoio em situações difíceis, pelas enormes gargalhadas super extravagantes que já demos juntas, pelas compreensões nas ausências e pelo amor que sei que temos uma pela outra. Te amo muito doidinha!!

À minha família, envolvendo minha avó materna, tios, tias e primos, por serem minha base para a vida, por terem compreendido todos os momentos de ausência, por todo o apoio aos meus objetivos e sonhos mais profundos. Vocês são os melhores amigos, pois quando todos forem embora, sei que vocês estarão ai...

Ao meu orientador, Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, pela grande oportunidade que me proporcionou ao me aceitar como sua aluna e me tornar sua funcionária. Com esta dupla oportunidade pude aprender inúmeras coisas das quais

nunca pensei ser capaz, me tornei mais responsável, mais ética, mais profissional, mais inteligente... Não tenho como agradecer por ter feito com que eu crescesse tanto no meu lado profissional. Obrigada por sua imensurável paciência com minhas loucuras e teimosias, obrigada pelos seus ensinamentos, pelo seu exemplo como professor e pesquisador, pela confiança em meu trabalho, do qual nunca me cobrou com rispidez e ignorância e, finalmente, obrigada pelas risadas que tornaram este trabalho mais ameno para ser concluído.

À minha coorientadora, Karina Saraiva, por ter me mostrado como pode ser empolgante fazer pesquisa. Professora, sua ética, inteligência, dedicação, responsabilidade, caráter, espírito de cobrança, humor e liderança me servem de inspiração para que eu possa me tornar uma profissional parecida com você! Obrigada pela imensa e decisiva ajuda neste trabalho.

Ao professor José Alexsandro, por todos os ensinamentos transmitidos na área de liberação de fármacos, dando uma grande contribuição na finalização desse trabalho, por sua paciência e pela generosidade e ética como um dos meus chefes imediatos.

Aos professores Ana Cláudia e José Germano, pela incomensurável compreensão ao longo desses dois anos de uma mistura de vida acadêmica, vida profissional, doenças pessoais e problemas familiares, onde em momento algum puseram dificuldades para que eu realizasse as minhas inúmeras atividades ou tivesse que me ausentar. Obrigada pelos ensinamentos, pela confiança, pela amizade, pela minha valorização, fazendo com que eu sempre queira dar o meu melhor pelo seu laboratório. Vocês são profissionais exemplares!

A Seu Crispim, bioterista chefe do Biotério Thomas George da Universidade Federal da Paraíba, pela sua imensa ajuda para que eu pudesse realizar os experimentos de atividade anti-inflamatória. Obrigada por sua gentileza, por sua disponibilidade, solidariedade, pelo seu sempre bom humor e pela sua ética profissional.

Aos meus queridos alunos de Iniciação Científica, Yargo Araújo, Geilza Carla e Ízola Ramalho, pois sem a ajuda de vocês este trabalho teria sido mais árduo, mais tedioso, mais triste. Obrigada por me ajudarem em cada detalhe, seja em

experimentos simples ou naqueles mais trabalhosos, obrigada por abdicarem de aulas, de horários para estudar ou simplesmente para descansar, obrigada pelo bom humor, presente na maioria das vezes e obrigada, principalmente, por me aguentarem, participarem das minhas loucuras e das minhas cantorias que enfeitaram nossos experimentos. Vocês se tornaram mais que simples alunos, são agora meus amigos e sei que posso contar com vocês em qualquer momento e a recíproca é verdadeira!!

A todos os alunos pertencentes ao Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) e ao Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM), pela receptividade, pelos ensinamentos, pela paciência, pela ajuda em alguns experimentos, pelas palhaçadas e pela amizade construída ao longo dessa jornada. Agradeço de forma especial a Danielle Rocha, por sua amizade e acolhimento em Recife, a Alexandra Apolinário, João Paulo Malheiros e Juliana Luna, por me acolherem tão bem no laboratório e me ensinarem bastante, além dos infinitos momentos de risadas, a Yuri & Natan, meus “irmãos” científicos, a Deysiane Oliveira, pelas inúmeras ajudas, ensinamentos, saídas e pela paciência e o gentleman Jôffly Vandenberg, pelos favores, ajudas, pelo ombro amigo e pelos vários momentos engraçados que vivemos (eita professor!!)... Sem vocês, teria sido mais difícil...

Aos amigos da turma do mestrado, por todas as experiências divididas, pelos momentos de alegria, de desespero, pelas histórias de vida e pelas palavras de apoio que demos uns aos outros, reavivando a ideia de que “sim, um dia vamos terminar, tá com a gota ??”

A todos os técnicos da UEPB, especialmente Camilla Pinheiro, Robson, Renata, Patrícia, Andeilma, Paulo, Wilma, Juliana e George, que acompanharam de perto essa minha caminhada acadêmica, me dando apoio e espaço quando foi preciso. No entanto, o agradecimento mais que especial vai para minha amiga-irmã Climélia, por ter estado presente em cada uma das mínimas etapas desse mestrado me ajudando psicologicamente com seu amor, compreensão, alegria e momentos de aventuras. Sou muito feliz por ter conhecido você!!

As minhas melhores amigas Laysa e Gerlanny, pela amizade verdadeira, pela compreensão das minhas ausências e pelos inúmeros incentivos ao longo dessa jornada.

Aos meus amigos maravilhosos Lucas, Henrique, Cíntia, Lílian, Maurinho, Naíla, Jocelmo, Solange, Leandro, Rayanne, Tays Amanda e Júlio por me presentarem com a amizade ao longo de todos esses anos, por me entenderem quando não pude estar perto, por me darem opiniões e me escutarem sempre, tendo as palavras certas e necessárias para eu renovar as forças para lutar. Obrigada por serem tão especiais!!

À Jamilly Kelly e Yargo Araújo, mais que amigos, verdadeiros irmãos. Nada é por acaso, são as providências de Deus e conhecer vocês foi uma delas. Obrigada pela receptividade, pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha, pelos conselhos, por segurarem minha mão na hora da tristeza, pelas inúmeras alegrias, gaitadas, canções, mensagens de voz no whatssap, pelas saídas divertidíssimas, pelas aventuras por aí e pelas bagunças lá em casa... Obrigada por existirem, amo vocês!!

A Geovani Pereira Guimarães, que chegou de uma forma tão inesperada e aos poucos foi fazendo parte do meu dia a dia. Deus sabe de todas as coisas e só Ele foi capaz de trilhar o caminho, não tão perfeito aos olhos humanos, para eu chegar até esse momento ao seu lado. Obrigada por sua estranha receptividade ao lado da compressora, sua solidariedade, por seus ensinamentos, opiniões, conselhos e broncas enormes. Obrigada pela paciência com minhas loucuras, gaiatices, desesperos e dramas, pela delicadeza em me animar e por me valorizar de tal forma que me fez sentir ser capaz de tudo. Agradeço suas loucuras, seus exageros, seu companheirismo e seu amor que me faz lembrar todos os dias de como sou sortuda.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CertBio/UEPB) e ao Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (LNFarm/LIKA-UFPE) na pessoa de Milena por disponibilizar sua infraestrutura, tornando viável a realização de algumas técnicas ausentes no nosso laboratório.

RESUMO

Algumas doenças dermatológicas inflamatórias são tratadas com fármacos veiculados em formas farmacêuticas convencionais, que muitas vezes não atingem concentrações teciduais adequadas para gerar o efeito farmacológico máximo. A pentoxifilina (PTX) é um desses fármacos e tem sido amplamente estudada com relação a sua atividade anti-inflamatória por inibir a produção de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias. O uso da PTX incorporada a uma microemulsão (ME) seria uma alternativa inédita para o tratamento de afecções dermatológicas inflamatórias. Esse novo sistema transportador de fármaco pode ser utilizado topicamente e é capaz de aumentar a permeação cutânea e a eficácia de vários fármacos em relação aos tratamentos convencionais. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema microemulsionado contendo PTX para aplicação tópica. A formulação obtida a partir de um diagrama de fase pseudoternário foi caracterizada e avaliada utilizando métodos como microscopia de luz polarizada (MLP), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). O perfil de liberação *in vitro* foi determinado utilizando o modelo de células de Franz e a atividade antiedematogênica *in vivo* foi determinada através da técnica de edema de pata induzido por carragenina. A ME desenvolvida foi constituída por 5% de água destilada, 51% de triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico, 39,6% de Tween[®] 80 e 4,4% Brij[®] 52. Através das análises de MLP, DSC e MET foi possível confirmar a estruturação do sistema como ME do tipo água em óleo (A/O). A formulação apresentou-se estável frente a estresses térmicos, além de possuir características físico-químicas que possibilitam seu uso por via tópica. A liberação *in vitro* da ME-PTX obedeceu ao modelo cinético de Higuchi e apresentou atividade anti-inflamatória significativa em edema de pata induzido por carragenina em todas as etapas do ensaio. Portanto, pôde-se concluir, que a veiculação da PTX através de um sistema microemulsionado mostrou-se uma alternativa interessante e inédita para o tratamento de afecções dermatológicas.

Palavras-chave: Anti-inflamatório, microemulsão, liberação de fármaco, pentoxifilina, via tópica.

ABSTRACT

Some inflammatory skin diseases are treated with drugs carried on conventional dosage forms that often fail to achieve adequate concentrations in the tissue to generate maximum pharmacological effect. Pentoxifylline (PTX) is one of these drugs widely studied due to its anti-inflammatory activity by inhibiting the production of TNF- α and other proinflammatory cytokines. The use of PTX incorporated into microemulsions (ME) would be a novel alternative for the treatment of inflammatory skin disorders. This new drug delivery system can be used topically and can be able to increase the permeation through skin and the effectiveness of several drugs compared to conventional treatments. The aim of this work was to develop a microemulsion containing PTX (PTX-ME) for topical use. The formulation obtained from the pseudoternary phase diagrams was characterized and evaluated using methods such as polarized light microscopy (MLP), differential scanning calorimetry (DSC) and transmission electron microscopy (TEM). The *in vitro* release profile was determined using the model of Franz cells and antiedematogenic activity *in vivo* was determined using the technique of paw edema induced by carrageenan. The ME was composed of distilled water (5%), acid-capric/caprylic triglycerides (51%), TweenTM 80 (39.6%) and BrijTM 52 (4.4%). Analyzes of MLP, DSC, and TEM were able to confirm that the ME obtained was water-in-oil (W/O) type. The formulation was thermodynamically stable against thermic stress. Beside this, it had physical-chemical characteristics that allow its topical use. *In vitro* release of PTX-ME followed the Higuchi kinetic model. Additionally, it showed significant anti-inflammatory activity in paw edema induced by carrageenan in all stages of the assay. Consequently, the PTX-ME showed an interesting alternative for treatment of dermatological disorders.

Keywords: Anti-inflammatory, drug release, microemulsion, pentoxifylline, topical drug delivery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Camadas estruturais da pele.	25
Figura 2 - Fórmula estrutural plana da pentoxifilina.	31
Figura 3 - Diagrama de fases pseudoternário contendo Tween® 80 e Brij® 52 nas proporções 6:4 e 7:3, respectivamente.	60
Figura 4 - Diagrama de fases pseudoternário contendo Tween® 80 e Brij® 52 na proporção 8:2 e 9:1, respectivamente.	61
Figura 5 - Diagrama de fases pseudoternário contendo Tween®80 e Brij® 52 na proporção 9:1, com destaque para os pontos selecionados numerados de 1 a 3. ...	63
Figura 6 - Aspecto visual das formulações selecionadas para os estudos de caracterização da estrutura.	65
Figura 7 - Fotomicrografias sob microscópio óptico com luz polarizada da formulação 2 (branca e incorporada).	66
Figura 8 - Instabilidade da formulação 3 após ciclo de aquecimento-resfriamento. ...	69
Figura 9 - Curva DSC da água.	71
Figura 10 - Curva DSC do óleo (TACC).	71
Figura 11 - Curva DSC da formulação 1 - branca.	72
Figura 12 - Curva DSC da formulação 1 incorporada com PTX.	72
Figura 13 - Fotomicrografia da formulação 1, obtida por microscopia eletrônica de transmissão.	75
Figura 14 - Varredura espectrofotométrica da solução de PTX (16 µg/mL) na faixa de comprimento de onda de 200 a 350 nm.	80
Figura 15 - Varredura espectrofotométrica da ME1 na faixa de comprimento de onda de 200 a 350nm.	81

Figura 16 – Curva analítica obtida a partir de soluções de PTX nas concentrações de 4 a 30 µg/mL para determinação do parâmetro linearidade.....	82
Figura 17- Difratoograma da PTX pura.	88
Figura 18 - Difratoogramas da ME1-branca e da ME1-PTX.....	89
Figura 19 - Perfil de liberação da PTX (µg/cm ²) em função do tempo (h) a partir das formulações envolvidas no estudo.	93
Figura 20 – Perfil dos modelos cinéticos testados para a ME ₁ -PTX em tampão fosfato pH 7,4.	94
Figura 21 - Extrapolação linear para cálculo do <i>lag time</i> da liberação da PTX incorporada no sistema microemulsionado.....	96
Figura 22 - Efeito anti-inflamatório da PTX em solução ou incorporada a sistemas microemulsionados após uma hora de indução do edema de pata pela carragenina	98
Figura 23 - Efeito anti-inflamatório da PTX em solução ou incorporada a sistemas microemulsionados após duas horas de indução do edema de pata pela carragenina.	100
Figura 24 - Efeito anti-inflamatório da PTX em solução ou incorporada a sistemas microemulsionados após três horas de indução do edema de pata pela carragenina.....	101
Figura 25 - Efeito anti-inflamatório da PTX em solução ou incorporada a sistemas microemulsionados após quatro horas de indução do edema de pata pela carragenina.	103
Figura 26 - Análise histológica da pele retirada das patas dos animais submetidos aos tratamentos com PTX em solução ou incorporada ao sistema microemulsionado quatro horas após a indução do edema por carragenina. Magnitude: 10x.....	106
Figura 27 - Análise histológica da pele retirada das patas dos animais submetidos aos tratamentos com PTX em solução ou incorporada ao sistema microemulsionado quatro horas após a indução do edema por carragenina. Magnitude: 40x.....	107

Figura 28 – Curva analítica obtida a partir de soluções de PTX em tampão fosfato pH 7,4 nas concentrações de 4 a 28 µg/mL para determinação do parâmetro linearidade..... 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição percentual (m/m) das formulações selecionadas.	63
Tabela 2 - Determinação do parâmetro precisão repetibilidade e precisão intercorrida (n=6) para validação do método espectrofotométrico.	83
Tabela 3 - Determinação do parâmetro exatidão (n=3) para validação do método espectrofotométrico.	84
Tabela 4 - Determinação do parâmetro robustez (n=3) para validação do método espectrofotométrico.	84
Tabela 5 - Determinação do doseamento da PTX no sistema microemulsionado. ...	85
Tabela 6 - Determinação da eficiência de encapsulação da PTX no sistema microemulsionado.	86
Tabela 7 - Quantidades cumulativas liberadas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e percentual de liberação (%) da PTX em cada tempo no compartimento doador.	92
Tabela 8 - Determinação da ordem de liberação da PTX a partir das diferentes amostras utilizando-se como parâmetro o coeficiente de correlação (r).	95
Tabela 9 - Parâmetros cinéticos obtidos a partir da liberação in vitro da PTX da solução em tampão fosfato pH 7,4 e da ME1.	97
Tabela 10 - Determinação do parâmetro precisão repetibilidade e precisão intercorrida (n=6) para validação do método espectrofotométrico utilizando tampão fosfato pH 7,4.	133
Tabela 11 - Determinação do parâmetro exatidão (n=3) para validação do método espectrofotométrico utilizando tampão fosfato pH 7,4.	134
Tabela 12 - Determinação do parâmetro robustez (n=3) para validação do método espectrofotométrico utilizando tampão fosfato pH 7,4.	134

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O	Água em óleo
Abs	Absorbância
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância de uma única via
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Proteína ativadora – 1
Carr	Carragenina
CAS	Chemical Abstracts Service
CMD	Concentração média determinada
CT	Cotensoativo
CV%	Coefficiente de variação
DFPT	Diagrama de fases Pseudoternário
DP	Desvio padrão
DRX	Difração de raios-X
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> / Calorimetria Exploratória Diferencial
EC	Estrato córneo
EE	Eficiência de encapsulação
GMPc	Monofostado de guanosina cíclico
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1

IL-10	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
ME	Microemulsão/microemulsões
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa-b
O/A	Óleo em água
PA	Para análise
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PDEs	Fosfodiesterases
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Constante de ionização
PKA	Proteína quinase A
PMNs	Polimorfonucleares
PTX	Pentoxifilina
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo
SF	Separação de fases
SI	Solução intermediária
SLL	Sistema líquido leitoso
SLO	Sistema líquido opaco

SMEDDS	Sistemas de liberação de fármacos auto-microemulsionáveis
SSSL	Sistema semissólido leitoso
SSSO	Sistema semissólido opaco
ST	Sistema transparente
T	Tensoativo
TACC	Triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
t_{lag}	Lag time
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-visível
γ-IP-10	Quimiocina IP-10

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	25
2.1 PELE.....	25
2.2 PROCESSOS INFLAMATÓRIOS NA PELE.....	28
2.3 PENTOXIFILINA.....	30
2.4 O USO TÓPICO DE MICROEMULSÕES.....	35
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 MATERIAL.....	42
4.2 MÉTODOS.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 SELEÇÃO DOS COMPONENTES	57
5.2 DIAGRAMAS DE FASES PSEUDOTERNÁRIO (DFPT)	59
5.3 SELEÇÃO DOS PONTOS NO DIAGRAMA E INCORPORAÇÃO DA PENTOXIFILINA.....	62
5.4 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA	64
5.5 ISOTROPIA	66
5.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE	68
5.7 ANÁLISE TÉRMICA.....	70
5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	74
5.9 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO- QUÍMICA	75

5.10 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DOSEAMENTO DA PENTOXIFILINA NO SISTEMA MICROEMULSIONADO.....	79
5.11 DOSEAMENTO DA PENTOXIFILINA.....	85
5.12 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE)	86
5.13 DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	87
5.14 LIBERAÇÃO <i>in vitro</i> DA PENTOXIFILINA DO SISTEMA MICROEMULSIONADO	90
5.15 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ME ₁ -PTX UTILIZANDO O MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	97
6 CONCLUSÕES	110
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8 APÊNDICE A - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS) PARA QUANTIFICAÇÃO DA PENTOXIFILINA EM COMPARTIMENTO RECEPTOR DE CÉLULA DE FRANZ	
9 ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	

** Introdução **

1 INTRODUÇÃO

Difícilmente todas as expectativas em torno de um determinado agente terapêutico são satisfatórias, podendo não serem alcançadas em relação aos parâmetros farmacocinéticos, resultados pré-clínicos e até mesmo os clínicos. Na atualidade, a maioria dos fármacos é veiculada em formas farmacêuticas ditas convencionais e, geralmente, elas não conseguem atingir concentrações apreciáveis no tecido alvo do organismo porque entre o local de aplicação e o alvo, onde devem exercer seu efeito farmacológico, interpõem-se uma série de barreiras anatômicas, químicas ou biológicas que contrariam a obtenção do efeito terapêutico desejado (SILVA et al., 2010a).

É nesse contexto que se inserem os recentes avanços na nanotecnologia farmacêutica e o conceito dos novos sistemas transportadores de fármacos, sendo estes capazes de compartimentalizar uma substância ativa e direcioná-la para os sítios onde deverão exercer o seu efeito farmacológico. A aplicação desses novos sistemas, como lipossomas, micro/nanopartículas e microemulsões vem ganhando mais atenção por parte dos laboratórios farmacêuticos e da comunidade científica e a grande maioria dos trabalhos investiga uma melhoria na liberação, biodisponibilidade e/ou dissolução dos fármacos contidos nestes novos veículos (ASTIER, 2006).

Houve também um significativo aumento de interesse no uso desses novos sistemas através da via tópica, demonstrando a capacidade de modificar a penetração de diversos fármacos na pele (BUTANI et al., 2014). A nanotecnologia, por intermédio desses novos transportadores de fármacos, vem sendo utilizada em formulações destinadas à aplicação tópica por ser minimamente invasiva, reduzir a dor ou o perigo de infecções, permitir algum controle sobre a deposição do fármaco e ter possibilidade de melhora na biodistribuição e no *clearance* (CEVC & VIERL, 2010).

Dentre esses novos sistemas de liberação, um dos mais estudados são as microemulsões (ME). Elas possuem a capacidade de incorporar fármacos hidrofílicos, lipofílicos ou anfifílicos, podendo agir como sistemas reservatórios, diminuir a toxicidade da substância ativa, assim como proporcionar a alteração da biodisponibilidade, dependendo do tipo de interação entre o fármaco e o sistema de administração, permitindo a redução da dose administrada e minimizando os efeitos

colaterais potenciais do fármaco (FANUN, 2012). Além disso, as ME permitem altas taxas de penetração do fármaco em camadas profundas do estrato córneo quando comparadas a formulações ditas convencionais, sendo consideradas como sistemas terapêuticos promissores que facilitam a permeação e o direcionamento eficiente do ativo através da pele (SILVA et al., 2010b).

Diante dessas inovações farmacêuticas, surge uma perspectiva de resolução para a problemática terapêutica envolvendo o fármaco pentoxifilina (PTX) que, nos últimos anos, tem sido amplamente estudado com relação a sua atividade anti-inflamatória em doenças dermatológicas (WONG & HOLT, 1992, WAHBA-YAHAV, 1992, NOZ et al., 1993, CALDERON et al., 1993, SCHWARZ et al., 1993, GILHAR, 1996; OMULECKI, 1996, BÁFICA, et al 2003; SADEGHIAN et al, 2006; MACHADO et al, 2007, BRITO et al., 2014). Dessa forma, afecções dermatológicas que antes eram tratadas apenas com suas formas farmacêuticas convencionais, oral e injetável, poderiam ser tratadas de uma forma mais específica, já que suas doses orais ficam a desejar em relação a concentrações adequadas para o tratamento de inflamações na pele (TEKSIN et al., 2009) e sua utilização pela via parenteral é dolorosa e dependente de profissionais treinados. Portanto, o uso desses novos sistemas transportadores de fármacos poderia ajudar a alcançar o efeito desejado de uma maneira mais adequada.

Microemulsões contendo a PTX permitiriam inúmeras vantagens na aplicação desse fármaco em doenças dermatológicas, tendo em vista que este sistema é capaz de induzir mudanças termodinâmicas no ativo, modificando seu equilíbrio particional em direção as camadas da pele e a função barreira do estrato córneo seria desfeita devido a quantidade de tensoativos presentes em sua composição, fazendo com que a bicamada lipídica fosse desestruturada e a permeabilidade ao fármaco facilitada, podendo atingir concentrações locais ideais para um efeito farmacológico máximo (SILVA et al., 2010b, SAHOO et al., 2014). O uso tópico desse sistema seria um método atraente para o tratamento dessas desordens da pele devido à grande área de superfície epitelial disponível, fácil acessibilidade, degradação enzimática relativamente baixa e a redução do risco de efeitos secundários sistêmicos.

Dessa forma, diante da necessidade de inovação em tratamentos das afecções dermatológicas inflamatórias e do crescente surgimento de novas formas farmacêuticas que possibilitam um aumento de alternativas de aplicação de uma

determinada substância farmacologicamente ativa, o presente estudo torna-se promissor ao apoiar a hipótese de que ao veicular a PTX em um sistema microemulsionado, esta poderá possivelmente promover uma melhora de modo mais efetivo em quadros inflamatórios cutâneos.

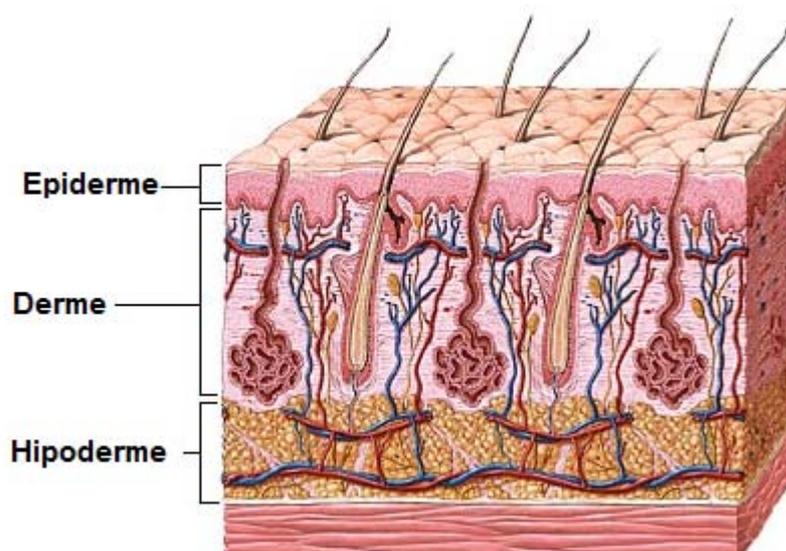
** Fundamentação Teórica **

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano e é responsável por aproximadamente 16% do peso corporal, sendo de 102 a 104 vezes menos permeável que uma parede capilar. Possui diversas funções consideradas vitais como a regulação térmica e metabólica, a sensação de tato e de dor por conta de suas terminações nervosas sensitivas, a presença de suas células queratinizadas é capaz de evitar a perda de água transepitelial, retardando assim os processos de desidratação e evitando processos bruscos de atrito, além de ser uma excelente barreira biológica contra patógenos e agressões ambientais, como a radiação ultravioleta (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; CEVC; VIERL, 2010; KENDALL; NICOLAOU, 2013). A associação de várias camadas de tecido faz com que a pele seja uma estrutura organizada e funcional, sendo estas a epiderme, porção epitelial de origem ectodérmica e a derme, porção conjuntiva de origem mesodérmica. A hipoderme é uma camada de tecido conjuntivo frouxo que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes (Figura 1) (BOWSTRA et al., 2003, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Figura 1 - Camadas estruturais da pele.



Fonte: <http://www.healthcentral.com/skin-cancer/000425.html>

A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado sendo o tecido mais externo da pele, caracterizado por ser avascular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Ela é composta principalmente por queratinócitos, células que constantemente migram da derme para a epiderme amadurecendo e transformando-se em corneócitos, células anucleadas, constituídas por queratina que formam o estrato córneo (EC) da pele, camada epitelial que está em constante renovação celular sendo formada por uma matriz rica em lipídeos composta por ceramida (45-50%), colesterol (20 a 25%), sulfato de colestera (10%), éster de colestera (0,7%), fosfolipídios (0,1%), triacilgliceróis (2,6%) e ácidos graxos livres (10-15%) (STORPIRTIS et al., 2009; BERTHAUD; BONCHEVA, 2011; KENDALL; NICOLAOU, 2013).

O EC é considerado como a barreira primária do processo de difusão, interferindo na permeação dos fármacos através da pele (CHORILLI et al., 2007; CEVC; VIERL, 2010). A fluidez dos lipídeos presentes nessa camada é indispensável para a difusão transepitelial de moléculas lipofílicas, anfifílicas e hidrofílicas, assegurando o espaço intermolecular necessário para a inserção e migração dos fármacos através dessa barreira (MOSS et al., 2002; MITRAGOTRI, 2004; GEINOZ et al., 2004).

Essa camada epitelial é constantemente exposta a fatores externos que a desestabilizam como estresses mecânicos, contatos frequentes com água, ação de tensoativos e a presença de produtos químicos no ambiente. Além disso, a sua espessura e integridade (cristalinidade e quantidades totais de lipídeos) podem sofrer alterações de acordo com a idade, sexo, raça e região corporal, variando sua capacidade funcional (HARRIS, 2009). Dessa forma, uma alta integridade e a coesão intercelular apropriada dos corneócitos são aspectos fundamentais para que o EC funcione como barreira eficaz para o controle de fluxos de água e produtos químicos através da pele (BERTHAUD; BONCHEVA, 2011).

Subjacente à epiderme, têm-se a derme, tecido conjuntivo delimitado externamente por sua junção com a epiderme e internamente pela gordura subcutânea, sendo a derme normalmente de 5-20 vezes mais espessa do que a epiderme. É uma região que apresenta uma quantidade significativa de colágeno, aproximadamente 70%, no entanto é formada por poucas células, destacando-se os fibroblastos, histiócitos e os adipócitos, que se encontram inseridos em uma substância amorfa responsável pela elasticidade e suporte mecânico, formando o

tecido conjuntivo (CEVC & VIERL, 2010). Além disso, é a partir da derme que se originam os folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas, os vasos sanguíneos e nervos sensoriais, sendo todas essas estruturas envolvidas por fibras colágenas e elásticas (LAI-CHEONG; McGRATH, 2009).

A derme também é residência de células imunológicas que são responsáveis pela manutenção da homeostase dessa camada, incluindo-se nessa função os neutrófilos, monócitos/macrófagos, os linfócitos do tipo T e B, mastócitos, eosinófilos e células dendríticas que, no surgimento de um processo inflamatório, deixam os pequenos vasos sanguíneos da derme e se infiltram no tecido cutâneo, através de estímulos dos mediadores inflamatórios como as citocinas, para tentar reverter a inflamação e restaurar o tecido (FRIEDMANN et al., 1993; KENDALL; NICOLAOU, 2013).

Por fim, a hipoderme, também chamada de tecido celular subcutâneo ou pânículo adiposo. É formada por tecido conjuntivo frouxo sendo a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apóia. É caracterizada pela presença de adipócitos, formando o tecido adiposo constituído de lóbulos de lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Esse tecido possui propriedades de armazenamento energético, funcionando como reserva de ácidos graxos, de proteção contra traumatismos e de regulador de variações térmicas. Além disso, os adipócitos são os principais produtores de uma ampla variedade de mediadores lipídicos, que incluem prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas, ácidos epoxieicosatrienoicos, epóxidos de ácidos graxos, fator ativador de plaquetas (PAF), ácido lisofosfatídico, 2-araquidonilglicerol, amidas lipídicas e outras citocinas inflamatórias que influenciam nas demais células cutâneas (IYER et al., 2010).

Em síntese, a pele é a barreira primária do organismo, sendo altamente especializada, complexa e eficiente para o transporte de moléculas, tendo a epiderme como passo limitante mais importante para o processo difusional, a derme como região de abrigo para as células funcionais da pele e para todas as fibras que permitem a estabilidade mecânica desse órgão e a hipoderme como suporte para fenômenos traumáticos e térmicos.

2.2 PROCESSOS INFLAMATÓRIOS NA PELE

Sendo a pele a interface entre o interior do nosso organismo e o ambiente externo, ela corresponde ao primeiro alvo para injúrias físicas, químicas ou microbiológicas que são capazes de modificar sua estrutura e função, desencadeando um processo inflamatório (BICKERS; ATHAR, 2006).

A inflamação refere-se a uma resposta biológica intrínseca formada por um conjunto de reações celulares envolvendo os sistemas imunológico e vascular. As características clínicas da resposta inflamatória, descritas por Celsus há mais de 2000 anos, estão bem estabelecidas pelos sinais clássicos de calor, rubor, edema e dor (DORWARD et al., 2012). A cascata dos eventos inflamatórios iniciada é controlada especificamente por mediadores químicos endógenos que promovem o aumento do fluxo de sangue e da permeabilidade vascular, em capilares e vênulas, permitindo intensa infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e mononucleares para o tecido lesionado, associado a uma maior sensibilização dos neurônios aferentes primários (JÄNIG, GREEN, 2014).

Uma das finalidades do processo inflamatório é restaurar a homeostase do tecido danificado através da indução de vários mecanismos reparadores (EREN et al., 2015). No entanto, embora a inflamação seja considerada uma resposta protetora contra lesões, esse fenômeno constitui um *feedback* positivo, que se mantido em ação constantemente, pode resultar em uma lesão tecidual ainda mais acentuada (JÄNIG, GREEN, 2014). Dessa forma, embora tenha um caráter reparador, ela pode ser associada a um grande número de doenças da pele incluindo psoríase, dermatite atópica e câncer (JOHNSON-HUANG et al., 2009; MUELLER, 2006).

As afecções dermatológicas inflamatórias em nada diferem quanto à cascata da inflamação, onde o estímulo induz a produção de citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células da pele em resposta a injúria tissular provocada (ELIAS et al., 1999). Os queratinócitos podem secretar diversas citocinas em resposta a lesão, como por exemplo, TNF- α , IL-1 α , IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TGF- α , TGF- β , IFN- γ e MCP-1, considerados com os principais mediadores da resposta inflamatória cutânea. Esses mediadores são capazes de promover a ativação de moléculas de adesão, como os membros da família das selectinas e integrinas, que auxiliam no processo de transmigração dos leucócitos através do endotélio vascular, atraídos

para o local inflamado graças a ação de quimiocinas (COUSSENS; WERB, 2002). A magnitude desse influxo é controlada pelo gradiente de citocinas e quimiocinas presentes no local (PATEL et al., 2014). Concomitantemente, ocorre a passagem de proteínas plasmáticas para o local onde foi iniciada a resposta inflamatória, dando origem ao edema, que é resultante do acúmulo de exsudato composto por proteínas plasmáticas, leucócitos e mediadores inflamatórios (POBER; SESSA, 2007).

Na presença de um agente flogístico, ocorre o recrutamento de macrófagos para o local, primeiras células imunológicas a serem ativadas e funcionarem como gatilho para todo o desenvolvimento da cascata de sinalização inflamatória, seguido dos neutrófilos. (FUJIWARA & KOBAYASHI, 2005). Estando ativados, os macrófagos são a principal fonte de citocinas e fatores de crescimento que influenciam profundamente as células endoteliais, epiteliais e mesenquimais do local inflamado. A presença dos mastócitos também é fundamental no processo inflamatório tendo em vista ser ele o responsável pela liberação de mediadores estocados, como a histamina, serotonina e proteases, e pela produção de novos mediadores, como as citocinas e mediadores lipídicos (COUSSENS; WERB, 2002).

Todas as citocinas secretadas pelos diversos tipos celulares citados são produzidas como resultado da ativação celular pela ação de agentes de transcrição gênica, como o fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B) e a proteína ativadora - 1 (AP-1) (MEDZHITOV; HORNG, 2009). Dentre todas as citocinas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) merece destaque por possuir um papel imunomodulador central nos processos inflamatórios da pele já que ele é capaz de promover a expressão de outras citocinas (como a IL-6, por exemplo), amplificando o processo inflamatório.

Este fator é produzido por diferentes células da linhagem monocítica/macrofágica residentes no tecido lesionado, que sinalizam o dano tecidual através da secreção desta citocina, resultando em diferentes tipos de respostas celulares. É uma citocina multifuncional que quando liberada dos queratinócitos pode estimular o acúmulo de células inflamatórias via indução da expressão de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e quando liberado pela derme, promove a proliferação de fibroblastos, dilatação dos vasos sanguíneos e o aumento da angiogênese (KUMAR et al., 2011). Pode agir sobre os neutrófilos aumentando a atividade fagocítica, a citotoxicidade, estimulando sua degranulação e a produção de espécies reativas do oxigênio, que

podem exacerbar o processo inflamatório (BEYAERT & FIERS, 1998; ZHOU et al., 2009).

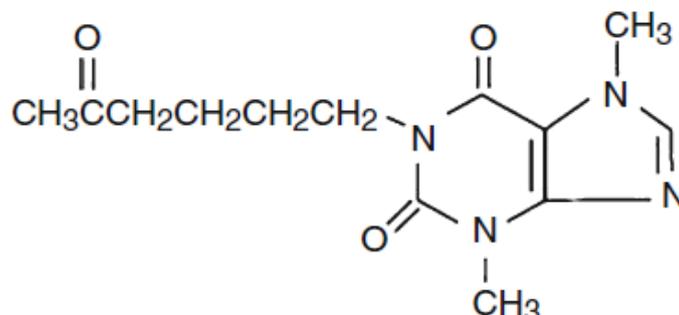
Além disso, essa citocina possui a capacidade de ativar a fosfolipase A₂ e desencadear a produção de fator ativador de plaquetas (PAF), aumentando a síntese de catecolaminas, induzindo a febre e a expressão de antígenos de superfície das células endoteliais (BARTON et al., 1996). O TNF- α está envolvido em uma variedade de doenças dermatológicas inflamatórias agudas e crônicas, como a psoríase, doença do enxerto contra hospedeiro, dermatite de contato, entre outras.

A intensidade da resposta inflamatória está diretamente relacionada à natureza e a intensidade da lesão, ao local e ao sistema imunológico do indivíduo. Em muitos casos, se faz necessária a utilização de medicamentos para que haja a modulação desse processo e uma rápida recuperação do paciente. Uma série de novas substâncias tem se tornado alvo de estudos devido à descoberta de suas propriedades anti-inflamatórias com mecanismos de ação não convencionais, como a capacidade de modular a ação do TNF- α . Esse mecanismo de regulação, levando a uma menor produção dessa citocina, é de interesse clínico imediato e tem se tornado promissor pois impede, já a nível celular, a interação desse fator com seu receptor e evita toda a cascata que é gerada após essa ligação. Um dos fármacos com essa propriedade é a pentoxifilina, capaz de agir em todas as etapas da cascata da inflamação em doenças dermatológicas (GONZÁLEZ, 2007).

2.3 PENTOXIFILINA

A pentoxifilina (PTX), também conhecida como oxpentifilina, é quimicamente denominada de 3,7- diidro-3,7-dimetil-1-(5-oxoexil)-1H-purina-2,6-diona, sendo um derivado do grupo das metilxantinas (HONDA; MAGALHÃES, 2001; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009). Sua fórmula molecular é C₁₃H₁₈N₄O₃ e peso molecular de 278,31 daltons (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009). O fármaco encontra-se descrito nas farmacopeias Britânica, Europeia e Japonesa, e pode ser administrado por via oral ou intravenosa (HONDA; MAGALHÃES, 2001). Sua fórmula estrutural plana é vista conforme Figura 2.

Figura 2 - Fórmula estrutural plana da pentoxifilina.



FONTE: TITA et al., 2013.

Este fármaco é um pó branco ou quase branco, cristalino, possui odor característico e sabor amargo (GUNAWAN et al., 1998). É bastante solúvel em água e em ácido acético, livremente solúvel em cloreto de metileno, clorofórmio, metanol e acetona, pouco solúvel em etanol, levemente solúvel no éter e praticamente insolúvel em hexano. Sua solubilidade em água tem sido reportada como 77mg/mL a 25°C, e 191mg/mL a 37°C (HONDA; MAGALHÃES, 2001; BP 2009).

Com relação ao pH, têm-se que o valor deste em uma solução aquosa de pentoxifilina a 1% situa-se entre 5,0-5,7. O valor da sua constante de ionização (pKa) têm sido reportada como 0,28 e seu coeficiente de partição n-octanol/água foi encontrado como sendo 1,96 quando medido a 20°C, e 2,82 quando medido a 37°C (BRITAIN, 1998).

Seu ponto de fusão apresenta-se na faixa entre 103 e 107°C. Em se falando de sua higroscopicidade, este fármaco é capaz de sorver e dessorver aproximadamente 1% de água de acordo com os estudos de absorção de umidade da pentoxifilina. O composto parece não ser capaz de formar espécies de hidratos genuínos (BRITAIN, 1998).

O comprimento de onda de absorção máxima da pentoxifilina em água e em metanol são essencialmente idênticos, tendo um pico em 272nm para a solução metanólica e em 273nm para a solução aquosa, mostrando que a absorvidade da pentoxifilina não é extensivamente afetada pelo solvente usado (BP,2009).

A PTX foi sintetizada no ano de 1963 e introduzida comercialmente pela primeira vez na década de 1970, na Alemanha. Produtos contendo este fármaco chegaram ao mercado brasileiro em novembro de 1979, sob a forma comprimidos

de ação prolongada e em abril de 1980, sob a forma de solução injetável e nos últimos anos sua prescrição tem aumentado progressivamente (DEF, 2000). Possui registro CAS sob o número 6493-05-6 (BP, 2009).

Em relação a suas características farmacológicas, a PTX – 1-(5-oxohexil)-3,7-dimetilxantina ou 1-(5-oxohexil) teobromina ou ainda 1-hexil-3,7-dimetilxantina – é um derivado de metilxantina com uma 3,7-dimetil substituição similar àquela da teobromina (ELY, 1988). Ela foi inicialmente caracterizada como um agente hemorreológico e relaxante da musculatura lisa, principalmente a nível periférico, sendo bem utilizada para transtornos circulatórios como doenças vasculares periféricas (SAMLASKA & WINFIELD, 1994), úlceras vasculares de membros inferiores sendo, desde 1972, usada na Europa e desde 1984 usada nos Estados Unidos para claudicação intermitente (MAGNUSSON et al., 2008).

Estes benefícios hemorreológicos se devem a capacidade de agir sobre as hemácias de maneira a aumentar sua deformabilidade, por atuar na fosforilação e nas ligações cruzadas de proteínas presentes na membrana dos eritrócitos (PÓVOA, 2008), por promover a redução da viscosidade do sangue, estimular a liberação de prostaciclina, um potente vasodilatador e inibidor de agregação plaquetária (BAUMGARTNER, 2007) e estimular mecanismos fibrinolíticos (AVIADO & DETTELACH, 1984) resultando na melhora da microcirculação e oxigenação dos tecidos. Além disso, esse fármaco diminui a adesão e agregação leucocitária e plaquetária, diminui a degranulação neutrofílica, sem afetar o processo de fagocitose e a liberação de radicais livres, que levam ao aumento de danos celulares (ARIAS-DIAZ et al., 1997).

Nos últimos anos, surgiu um outro interesse nas pesquisas sobre PTX, destacando suas propriedades anti-inflamatórias pelos efeitos inibitórios na cascata da inflamação, possuindo capacidade de modulação imunológica (ZHANG et al., 2004; CHRISTOVA-BAGDASSARIAN et al., 2007). Ela é um inibidor não seletivo das fosfodiesterases de nucleotídeo cíclico, possuindo atividade anti-inflamatória devido a habilidade de inibir a síntese de TNF- α (FERNANDES et al., 2008; GONZALEZ-ESPINOZA et al., 2012; TURHAN et al., 2012).

As fosfodiesterases (PDEs) compreendem uma ampla família de enzimas que metabolizam os segundos mensageiros, monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e de guanosina cíclico (GMPc), em suas formas inativas por meio de uma hidrólise das ligações fosfodiéster. O AMPc e GMPc são formados pela ação da adenilato ciclase

e guanilato ciclase, respectivamente, e atuam na transdução da ação de muitos hormônios, neurotransmissores e outros efetores celulares. Esses monofosfatos cíclicos modulam uma variedade de enzimas envolvidas em processos fisiológicos essenciais para as células, entre elas as proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA) e de GMPc (PKG), nucleotídeos cíclicos acoplados a canais iônicos e fatores de troca de guanina (BUFFONE et al., 2014).

A via de sinalização AMPc/PKA regula o metabolismo, a atividade gênica, principalmente na produção na citocinas inflamatórias, bem como o crescimento e divisão celular, a diferenciação celular e o funcionamento dos canais iônicos (HANSSON et al., 2000). Além disso, níveis aumentados de AMPc/GMPc ativam vias de fosforilação de proteínas envolvidas em respostas funcionais que podem afetar diferentes processos, como por exemplo as funções dos sistemas nervoso, cardiovascular e imune/inflamatório, a adesão celular e processos metabólicos (CASTRO et al., 2005).

A PTX, bem como outros inibidores de fosfodiesterases, faz parte de um grupo interessante de substâncias com atividade anti-inflamatória, sendo considerados como agente de grande potencial no tratamento de doenças inflamatórias da pele. Este fármaco é capaz de atuar em todas as fases do processo inflamatório desencadeado na pele, pois ao aumentar as concentrações de nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) ocorre o aumento na ativação da PKA, resultando na fosforilação de um número de proteínas reguladoras, incluindo a proteína CREB que pode inibir o NFK- β (*factor nuclear kappa* β), inibindo consequentemente a produção de várias citocinas, entre elas o TNF- α em monócitos e macrófagos devido a uma alteração na transcrição proteica do mesmo (GONZÁLEZ, 2007; WEI et al., 2009).

A supressão desta citocina faz com que ocorra uma inexpressão de moléculas de adesão em células endoteliais, como a ICAM-1, impedindo a adesão e migração de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos) para o sítio da inflamação, diminuição da liberação de enzimas lisossomais, redução da ativação dos leucócitos, da agregação plaquetária e diminuição da formação de radicais superóxidos (GONZÁLEZ, 2007).

Além disso, o fármaco inibe a produção de interferon (IFN)- γ , IL-1, IL-6 e IL-8 em leucócitos, bem como IL-1 e IL-6 em queratinócitos. Nestas células, a expressão da quimiocina IP-10 (γ -IP-10) induzida por IFN- γ , que potencializa a adesão de

células T ao endotélio, é inibida. A PTX também promove uma inibição no processo de apoptose celular, modulando a resposta do tipo Th2, reduzindo a de IL-12 e aumentando a produção da IL-10 e da IL-4 (KINDLER et al., 1989). Esses dados sugerem que a PTX é capaz de prevenir ou reduzir a fase inicial dos processos inflamatórios, pela regulação de citocinas e influxo de células inflamatórias no tecido-alvo (BRUYNZEEL et al., 1998). Outro mecanismo de sinalização consiste na inibição dos receptores de adenosina na superfície celular pela PTX, sendo estes responsáveis pela modulação da atividade da adenilato ciclase. A adenosina é capaz de provocar a contração do músculo liso das vias aéreas e promove a indução da liberação de histamina por mastócitos (PÓVOA, 2008).

Várias enfermidades dermatológicas inflamatórias podem ser tratadas com a PTX, são elas: a necrobiose lipoídica (NOZ et al, 1993), úlceras venosas, poliarterite nodosa cutânea (CALDERON et al, 1993), morfeia generalizada (WONG & HOLT, 1992), a prevenção de furunculose recorrente (WAHBA-YAHAV, 1992), reações de hipersensibilidade de contato (SCHWARZ et al, 1993), doença de Schamberg e pacientes com psoríase (GILHAR, 1996; OMULECKI, 1996), podendo este fármaco também ser utilizado como adjuvante no tratamento de casos de leishmaniose cutâneo-mucosa, sendo uma ferramenta efetiva quando associada aos antimoniais pentavalentes (BÁFICA, et al 2003; SADEGHIAN et al, 2006; MACHADO et al, 2007).

No entanto, dados clínicos sugerem que as doses orais de PTX que são comumente usadas nem sempre são suficientes para obter as concentrações que desencadearão a atividade anti-inflamatória adequada no tecido (DEVAULT, 1994). E, se forem utilizadas altas doses de PTX, esse fato pode gerar um efeito contrário, ou seja, a indução a um processo inflamatório. Isso se deve ao fato de que há alguns mecanismos moleculares pelos quais o AMPc regula positivamente a expressão do gene iNOS, que atua na produção de óxido nítrico (um importante marcador inflamatório) em diferentes tipos celulares (KIM et al., 2002).

Ao ser tomada de forma oral, a PTX é prontamente absorvida pelo trato gastrointestinal, ultrapassando níveis de 95% de absorção, porém, sofre intenso metabolismo de primeira passagem, cerca de 60 a 70% (HOSNY; ALI, 2012). Sua biodisponibilidade oral é apenas de 20% a 30% devido sua biotransformação hepática (TEKSIN et al., 2009) que gera sete metabólitos, designados de M1 a M7, identificados em urina humana (HINZE, 1972). Desses metabólitos três são

hidroxilados (M1, M2, M3a, e M3b), dois carboxilados (M4, M5) e dois metabolitos desmetilados (M6, M7), sendo o M5 o principal metabólito eliminado na urina, seguido do M4 (MAGNUSSON et al., 2008).

Sua meia-vida biológica varia de 0,4 a 0,8 hora (HARDMAN et al., 1992) e seu primeiro pico plasmático ocorre em 2 a 3 horas após a administração oral de uma dose de 400 mg de PTX (GRIGOLEIT et al., 1997). Devido a PTX possuir um tempo de meia-vida curto, o uso frequente desse fármaco em formas farmacêuticas convencionais é necessário para manter os níveis terapêuticos adequados. Dessa maneira, a dosagem recomendada para adultos de PTX oral é de 400 mg, três vezes ao dia, podendo ser reduzida ao se apresentarem muitos efeitos colaterais e em relação a forma injetável, a constante administração intravenosa desse fármaco mostrou que o efeito adverso predominante dessa infusão foi dependente da dose e caracterizou-se por náuseas e vômitos (WINDMEIER; GRESSNER, 1997).

Dessa maneira, a PTX torna-se um potencial candidato para a encapsulação em veículos diferenciados que possam oferecer a possibilidade da produção de formas farmacêuticas de liberação controlada capazes de diminuir a frequência do seu uso. Observa-se assim a necessidade da utilização de novas formas farmacêuticas que possibilitem o aumento das alternativas de aplicação da PTX, fazendo com que se administre de modo mais seguro, com efeitos colaterais minimizados e com um aumento significativo de parâmetros farmacocinéticos. Uma dessas alternativas em questão são as microemulsões.

2.4 O USO TÓPICO DE MICROEMULSÕES

A administração por via tópica seria uma opção satisfatória a ser utilizada em pacientes que sofrem de enfermidades dermatológicas inflamatórias. Ela é um adequado método de administração de fármacos por proporcionar melhor adesão por parte do paciente, evitar variabilidades nas taxas de absorção e no metabolismo, o que geralmente ocorre em um tratamento que seja por via oral, oferecendo várias vantagens sobre formas convencionais como comprimidos e injeções, pois impede o metabolismo de primeira passagem, minimizam a dor e podem reduzir alguns efeitos adversos (CHARLES; BOZENA, 2000, EL MAGHRABY, 2010).

No entanto, a via tópica também possui limitações em relação ao seu uso, pois a pele representa um desafio, sendo uma barreira natural para a penetração de

substâncias, portanto, dificilmente um fármaco administrado topicamente, sem uma formulação adequada, conseguirá atingir as camadas da pele em concentrações suficientes para desencadear um efeito terapêutico desejado. Dessa maneira, a escolha de um veículo para o desenvolvimento de uma formulação tópica tem um papel importante na minimização dos efeitos adversos e na influência da velocidade e extensão do processo de permeação através da pele.

Com o aprimoramento da tecnologia farmacêutica surgiram vários tipos de sistemas que podem ser utilizados para melhorar a penetração cutânea de princípios ativos, dentre os quais podem ser citados os sistemas vesiculares, lipossomas, niossomas, microemulsões, nano e micropartículas, entre outros (MOSER, 2001). Entre estes, as microemulsões são mais estáveis que os demais (ABOOD et al., 2013), sendo, portanto, o veículo adequado para a incorporação da PTX para uso tópico.

Em 1943, Hoar e Schulman, evidenciaram a formação espontânea de sistemas transparentes quando óleo e água eram misturados com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico e um álcool graxo de cadeia média e, a partir disso, introduziram o conceito de microemulsões (ME) como sendo microdispersões líquidas contendo água, óleo e tensoativos e que apresentam isotropia óptica e estabilidade termodinâmica (HOAR; SCHULMAN, 1943).

Atualmente conceitua-se ME como sistemas coloidais transparentes, termodinamicamente estáveis, isotrópicos, formados por uma fase aquosa, uma fase oleosa e a presença de concentrações adequadas de uma mistura de agentes tensoativos que reduzem a tensão interfacial entre os dois líquidos imiscíveis (DJEKIC et al., 2012; FANUN, 2012; ZHAO; 2014). A proporção destes componentes é capaz de propiciar a formação de diferentes estruturas influenciadas por propriedades físico-químicas dos agentes utilizados (FANUN, 2012).

Do ponto de vista farmacotécnico, as MEs possuem três tipos: óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) ou sistemas bicontínuos (DAMASCENO et al., 2011). No primeiro tipo, a fase interna ou descontínua é a substância lipossolúvel que se encontra dispersa sob a forma de gotícula coloidal na fase externa, dispersante ou contínua, que é a água. Já para as ME A/O, ocorre o inverso, possuindo como fase interna o componente aquoso disperso sob forma de gotículas na fase externa oleosa. O último tipo não possui como característica a presença de gotículas, pois o componente lipofílico e hidrofílico se caracterizam por canais adjacentes alongados

com nanogotículas contendo volumes semelhantes entre a fase aquosa e oleosa (FORMARIZ et al, 2005; DAMASCENO et al., 2011).

O tamanho das gotículas formadas geralmente está dentro da faixa de 10-100 nm (KIM et al., 2008), sendo aproximadamente 100 vezes menor do que o tamanho médio das gotículas formadas em uma emulsão (1- 10 μm) (DAMASCENO et al., 2011). Esse sistema é caracterizado por uma baixa tensão interfacial entre as fases imiscíveis entre si e oferecem várias vantagens como a estabilidade termodinâmica, a simplicidade em seu preparo, a capacidade de incorporar uma ampla gama de moléculas, tanto hidrofílicas, lipofílicas quanto anfifílicas, aumentando sua solubilização, biodisponibilidade e o potencial de permeação na pele, além de reduzir a toxicidade do fármaco (PESTANA et al., 2008; FANUN, 2012).

As ME surgiram como novos veículos para a incorporação de fármacos, permitindo que houvesse uma liberação controlada ou sustentada para várias vias de administração como tópica local, transdérmica, oral, nasal, ocular e parenteral (GRAMPUROHIT et al., 2011; FANUN et al., 2012). Uma vasta gama de estudos tem utilizado as ME para incorporar fármacos destinados ao uso dérmico ou transdérmico (KREILGAARD et al., 2000; ALVAREZ-FIGUEROA; KREILGAARD, 2001; RHEE et al., 2001; LEE et al., 2003; SINTOV; SHAPIRO, 2004; HUA et al., 2004; SINTOV; BOTNER, 2006a; SINTOV; BRANDYS-SITTON, 2006b; LIU et al., 2007; SHEVACHMAN et al., 2008; HEUSCHKEL et al., 2008; GANNU et al., 2010; ZHAO et al., 2011; ZHANG et al., 2011b; ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2011a; WANG et al., 2012; ABOOD et al., 2013; SAHOO et al., 2014).

Estes sistemas mostraram-se capazes de aumentar a absorção cutânea tanto de fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos quando comparado aos veículos tradicionalmente utilizados por esta via, como óleos, loções e soluções aquosas (GRAMPUROHIT et al., 2011). O interesse nas ME para uso tópico se deu devido aos diversos mecanismos que permitem que este veículo aumente a permeação de fármacos. É a combinação desses mecanismos que resulta em um maior efeito de penetração e nenhum desses fenômenos isolados parece ser suficiente para explicar a superioridade das ME quando comparadas aos outros sistemas (LOPES, 2014).

Os componentes presentes no sistema microemulsionado representam um fator imprescindível para aumentar a permeação do fármaco, pois a mistura de tensoativos presentes na formulação permite a interação com o extrato córneo da

pele fazendo com que a bicamada lipídica seja desestruturada e a permeabilidade dos fármacos facilitada (SILVA et al, 2009; SILVA et al, 2010b). Estes monômeros de tensoativos iriam difundir-se pela superfície da pele e atuariam como promotores tanto por romperem a estrutura lipídica do estrato córneo, melhorando a difusão do fármaco pela pele, como por aumentarem assim o coeficiente de partição entre a pele e o veículo, promovendo aumento na penetração (PATEL et al., 2013) e a absorção cutânea dos fármacos.

O estudo e o desenvolvimento de ME de uso tópico podem ser considerados como uma nova e ampla área dos novos sistemas de liberação de fármacos que irá permitir o desenvolvimento de diversas aplicações terapêuticas, como neste caso, para uma utilização anti-inflamatória, mas também para outras finalidades como uso destes sistemas em cosméticos, na incorporação de fármacos antimicrobianos, antineoplásicos, entre outros, surgindo uma ampla gama de produtos a partir desta nova técnica de liberação de fármacos.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar um sistema microemulsionado de uso tópico contendo a pentoxifilina como fármaco visando utilização em afecções dermatológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e utilizar diagramas de fases pseudoternários para a identificação de possíveis regiões de formação de sistemas opticamente límpidos e transparentes, dedutíveis de serem microemulsões;
- Formular o sistema carreador adequado incorporando o fármaco pentoxifilina a sua fase hidrofílica;
- Realizar metodologias de caracterização das formulações selecionadas abrangendo análises como: verificação do aspecto macroscópico, pH, condutividade elétrica, índice de refração, determinação da isotropia e da morfologia dos sistemas, tamanho de gotícula, índice de polidispersidade e calorimetria exploratória diferencial;
- Realizar estudos de estabilidade na microemulsão;
- Desenvolver e validar metodologias analíticas para quantificação da pentoxifilina no sistema obtido, realizando seu doseamento e a eficiência de encapsulação utilizando a técnica de espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-VIS);
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* da pentoxifilina contida na microemulsão utilizando modelo de células de difusão de Franz;
- Avaliar *in vivo* a atividade anti-inflamatória da microemulsão contendo a pentoxifilina utilizando o modelo inflamatório de edema de pata em ratos induzido por carragenina;
- Realizar a análise histológica de cortes provenientes das patas utilizadas no ensaio de indução inflamatória.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matérias-primas, reagentes, soluções e solventes

- Água deionizada, GEHAKA, Brasil;
- Álcool Etílico, Neon, Brasil;
- Brij[®] 52, Sigma-Aldrich, Alemanha;
- Carragenina, Sigma, Suíça.
- Cloreto de Sódio, Cinética, Brasil;
- Fosfato de sódio dibásico anidro PA, Nuclear, Brasil;
- Fosfato de sódio monobásico anidro PA, Nuclear, Brasil;
- Pentoxifilina, Sigma-Aldrich, Alemanha;
- Polissorbato 80 (Tween[®] 80), Sigma-Aldrich, Alemanha;
- Triglicerídeos do Ácido Cáprico Caprílico, Croda (Campinas, Brasil).

4.1.2 Equipamentos e Vidraria

- Aparato de Franz
- Balança Analítica, Adventurer, Ohaus, México;
- Banho-maria SL 155/10, Solab, Brasil;
- Banho de Ultrassom, Unique, Brasil;
- Condutivímetro mCA 150, MS Tecnopon, Brasil;
- Desruptor de células ultrassônico (sonicador), Unique, Brasil;
- Difrator de Raios-X modelo D8 ADVANCE, Bruker;
- Espectrofotômetro Lambda 750, UV-Vis, NIR, PerkinElmer, Brasil.
- Espectrofotômetro UV-Vis 1240, Shimadzu, Japão;
- Estufa microprocessada de secagem Q317M-32, Quimis, Brasil;
- Freezer, Brastemp, Brasil;
- Geladeira CFC 28A, Consul, Brasil;
- Hidropletismômetro, Ugo Basile, 21025 Comerio Varese, Itália;
- Medidor de pH Instrutemp, ITmPA 210, Brasil;

- Membrana de acetato de celulose 45 micra, 47 mm, Millipore Indústria e Comércio LTDA, Brasil.
- Microcentrífuga de bancada NI1801, Nova Instruments, Brasil;
- Microscópio de luz polarizada modelo BX-50, Olympus Start, Japão;
- Microscópio Eletrônico de Transmissão, Morgagni, FEI Company, EUA;
- Módulo calorimétrico exploratório diferencial DSC Q20, TA Instruments, E.U.A;
- Refratômetro de bancada ABBE, Biobrix, São Paulo, Brasil;
- Sistema purificador de água OS10LX, Gehaka, Brasil.
- Vórtex V1, IKA, Alemanha;

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Seleção dos componentes da formulação

Os componentes utilizados para compor as formulações foram selecionados com base na literatura de modo a priorizar componentes que tivessem amplo uso na área farmacêutica e de cosméticos, boa estabilidade oxidativa, não fossem irritantes e possuíssem utilização conhecida em sistemas tópicos.

4.2.2 Diagrama de fases Pseudoternário (DFPT)

Todo o preparo e a otimização das formulações foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

No intuito de obter as proporções ideais dos componentes que formariam a faixa correspondente a sistemas transparentes e/ou translúcidos, os diagramas de fases pseudoternários foram obtidos através do método de titulação da fase aquosa à temperatura ambiente (25 °C) seguida de inspeção visual do resultado da mistura dos componentes (Chen et al, 2004). Os triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (TACC) foram utilizados como fase oleosa, o Tween® 80 e o Brij®52 foram utilizados como tensoativos (T) e a água como fase aquosa.

Quatro DFPT foram construídos mediante a preparação de misturas iniciais de T nas proporções 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. À esta mistura foi adicionada a fase oleosa nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1, respectivamente. A fase aquosa foi titulada através de um pipetador automático em cada uma das proporções obtidas entre óleo e tensoativos. Após cada titulação, a homogeneização foi feita em um desruptor de células ultrassônico por 1 minuto na potência de 250 Watts, seguido de retirada de possíveis bolhas em banho de ultrassom por 1 minuto e um período de repouso de 2 minutos antes da observação final do seu aspecto.

Posteriormente ao período de equilíbrio, todas as mudanças no aspecto visual das misturas foram analisadas contra um fundo escuro e classificadas em: sistema transparente (ST), sistema semissólido opaco (SSSO), sistema semissólido leitoso (SSSL), sistema líquido opaco (SLO), sistema líquido leitoso (SLL) e separação de fases (SF). Os resultados obtidos foram plotados em um triângulo equilátero com o auxílio do software Origin Pro® 8.0, onde cada ponto da superfície corresponde à proporção definida dos componentes da mistura.

4.2.3 Seleção das formulações e incorporação da pentoxifilina

Após a construção do DFPT, a partir da região de formação dos sistemas transparentes foram selecionadas as proporções dos componentes que iriam formar o sistema carreador, gerando diferentes formulações a serem testadas. Estas foram preparadas através de 3 ciclos de homogeneização ultrassônica por 1 minuto, seguindo-se da retirada de excesso de bolhas de ar em banho de ultrassom por 1 minuto.

O fármaco PTX, por possuir características hidrofílicas, foi dissolvido na fase aquosa antes da adição dos outros componentes e sua concentração final em cada formulação foi de 1% (m/m). Todos os sistemas foram preparados 48 horas antes da realização dos testes de caracterização para que permitisse sua estabilização termodinâmica em temperatura ambiente (SILVA et al., 2010).

4.2.4 Avaliação de aspectos macroscópicos

As características macroscópicas das formulações selecionadas foram analisadas através de observação visual. Aspectos como coloração,

homogeneidade, separação de fases, transição de sistema transparente para opaco ou a presença de precipitados foram avaliados 48 horas após a obtenção do sistema microemulsionado.

4.2.5 Isotropia

A isotropia das formulações escolhidas, com e sem o fármaco, foi analisada por meio de um microscópio de luz polarizada. Uma gota da amostra foi colocada sobre uma lâmina de vidro, coberta com uma lamínula e examinada através de uma luz submetida a um polarizador. As fotomicrografias foram obtidas para determinar se as amostras exibiam ou não birrefringência óptica. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Petrográfica da Universidade de São Paulo (USP).

4.2.6 Estudos de Estabilidade

4.2.6.1 Ciclo aquecimento - resfriamento

Este teste foi realizado para verificar o efeito da variação da temperatura na estabilidade das formulações. As amostras foram submetidas a quatro ciclos, cada um destes consistindo de 48 horas à temperatura de $4,0 \pm 2,0$ °C em geladeira, seguido de 48 horas a $40,0 \pm 2,0$ °C em estufa. As formulações que não apresentaram nenhuma instabilidade, como fenômeno de cremagem ou separação de fases, foram escolhidas para serem submetidas ao estresse de congelamento – descongelamento (GHOSH, 2013).

4.2.6.2 Ciclo congelamento – descongelamento

Para este estudo, as formulações foram submetidas a estresse de congelamento – descongelamento em temperaturas de -21 °C e 25 °C, respectivamente, permanecendo em cada uma das temperaturas por um período de 48 horas. As amostras remanescentes passaram por 3 ciclos de congelamento – descongelamento e aquelas que não apresentaram nenhuma característica de instabilidade, foram as escolhidas para os estudos posteriores (GHOSH, 2013).

4.2.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de calorimetria exploratória diferencial foram realizadas a fim de verificar a microestrutura do sistema. A calibração do equipamento foi realizada com o metal índio (99,99%) em relação à temperatura e entalpia e as curvas foram analisadas em atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Alíquotas de 4-5 mg da ME e dos componentes água e óleo foram acondicionadas em cadinhos de alumínio que foram hermeticamente fechados. As amostras foram inicialmente equilibradas à temperatura de 37 °C por 10 minutos, para simular a temperatura utilizada em experimentos de permeação na pele e em seguida foram resfriadas até -70 °C a uma razão de 5 °C/min, mantendo a isoterma por 0,5 minuto. Posteriormente, as amostras foram aquecidas na mesma razão de 5 °C/min até a temperatura de 40°C (ZHANG, 2011a). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CertBio/UEPB) do Departamento de Farmácia da UEPB.

4.2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A MET foi utilizada para determinar a morfologia da formulação. Volumes de 5 -10µL das amostras com e sem o fármaco foram adicionados em grades de níquel de 300 mesh revestidas com um filme de *holey carbon*. Posteriormente foi realizado o método de contrastação negativa em ácido fosfotúngstico a 2% (p/v), aguardou-se a secagem das amostras e estas foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão com aceleração de voltagem de 80KV (ZHANG, 2010). Todas as análises foram feitas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.2.9 Caracterização Físico-Química

4.2.9.1 pH

O pH da formulação escolhida foi determinado em pHmetro digital com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, calibrado previamente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de 25 ± 0,5 °C. As medidas foram

realizadas em triplicata através de imersão do eletrodo diretamente em diluições aquosas na proporção de 10%.

4.2.9.2 Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica dos sistemas foi medida utilizando o condutivímetro digital e, baseado em seu valor, a microestrutura das formulações foi determinada. O equipamento foi previamente calibrado com solução padrão 146,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à temperatura de 25 °C e as medidas foram feitas através do mergulho da célula de platina do condutivímetro diretamente na amostra. Os resultados foram expressos como a média e o desvio padrão em triplicata.

4.2.9.3 Índice de Refração

O índice de refração foi determinado, utilizando-se Refratômetro de Abbé, Carl Zeiss-Jena, aferido com água destilada (índice de refração 1,3325) à temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. As determinações foram feitas em triplicata. A refringência de cada amostra foi medida de acordo com a escala interna do equipamento.

4.2.9.4 Tamanho de gotícula

O tamanho das gotículas da ME foi determinados através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic light scattering – DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS9 (Malvern, Worcestershire, UK), em que 1 mL de cada amostra foi adicionada a célula de leitura. Todas as medidas foram feitas a temperatura constante de 25 °C com feixe de luz de comprimento de onda de 635 nm, com ângulo de incidência de 90°C. Para cada amostra foram feitas 3 leituras de 1 minuto cada. A análise foi feita para a ME-branca e a ME-PTX sem prévia diluição.

4.2.10 Desenvolvimento da metodologia analítica espectrofotométrica para quantificação da pentoxifilina em sistemas microemulsionados

O processo de validação deve garantir que o método escolhido atenda às exigências das aplicações analíticas, gerando resultados confiáveis (Brasil, 2003). A validação do método analítico desenvolvido, baseado em espectrofotometria UV-Vis, foi conduzida seguindo as recomendações expostas na Resolução da ANVISA RE nº 899, de maio de 2003, seguindo os parâmetros exigidos pela categoria I, na qual os testes possuíram a finalidade de determinar quantitativamente o princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Os parâmetros avaliados foram especificidade e seletividade, linearidade e faixa de aplicação (intervalo), precisão, exatidão e robustez.

O desenvolvimento do método iniciou-se com a realização de uma varredura espectrofotométrica (200 a 350 nm) de uma solução da PTX em etanol PA, na concentração de 16µg/mL. Esta análise teve como objetivo identificar e confirmar o comprimento de onda (λ) predito na literatura no qual o fármaco apresentava o valor máximo de absorvância (HONDA, 2001).

A especificidade e seletividade foram determinadas através comparação entre as curvas de absorvâncias em função do comprimento de onda da solução do fármaco puro em relação à curva gerada pela leitura espectral do sistema microemulsionado sem o fármaco (ME-branca) na faixa de comprimento de onda de 200 a 350 nm.

O parâmetro linearidade e o intervalo foram obtidos a partir do preparo de uma solução padrão (n=3) de PTX na concentração de 1 mg/mL, seguido da diluição desta solução em etanol para a obtenção de solução intermediária (SI) (n=3) na concentração de 200 µg/mL. A partir destas, foram feitas sucessivas diluições de modo a se obter soluções com concentrações de 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 30 µg/mL de PTX em etanol. Todas as concentrações foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis a fim de verificar a absorvância de cada diluição e, os resultados foram tratados para a construção da curva de calibração e a determinação do coeficiente de correlação linear (r) através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (BRASIL, 2003).

A precisão foi obtida através da leitura em sextuplicata de soluções na concentração do ponto médio da curva de calibração (16 µg/mL) no comprimento de onda de 273 nm. Este parâmetro foi avaliado em dois níveis: a repetitividade (precisão intra-corrída) e a precisão intermediária (precisão inter-corrídas), por analistas distintos. A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV%), obtido através da Equação 1:

$$CV (\%) = \frac{DP}{CMD} \quad (1)$$

Em que DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada, não se admitindo valores superiores a 5%.

A exatidão foi determinada a partir de nove leituras contemplando o intervalo linear do procedimento, sendo feita análise em triplicata de soluções do fármaco em diferentes faixas de concentração, sendo elas em baixa (8 µg/mL), em média (16 µg/mL) e em alta concentração (24 µg/mL). O cálculo para este parâmetro foi feito através da Equação (2):

$$Exatidão = \frac{\text{Concentração média}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

A análise da robustez foi realizada através da alteração de parâmetros como mudança no solvente utilizado para a validação, em que foram usados como solventes para o fármaco a água deionizada e o etanol PA. A outra alteração referiu-se a utilização de espectrofotômetros de modelos diferentes. A análise foi feita em triplicata no comprimento de onda relacionado ao fármaco, 273 nm. Os valores das absorbâncias foram analisados e verificados quanto ao seu coeficiente de variação (%).

4.2.11 Doseamento da pentoxifilina no sistema microemulsionado

A quantificação da PTX na formulação selecionada foi baseada na metodologia analítica desenvolvida e validada (UV). Foram feitas diluições em triplicata dos sistemas contendo o fármaco em etanol PA de modo a obter soluções com concentração teórica igual a 16 µg/mL. A partir destas soluções, foram feitas as

leituras no espectrofotômetro no comprimento de onda de 273 nm. As médias das absorvâncias foram utilizadas para o cálculo da concentração real de PTX na formulação por meio da equação da reta obtida durante a determinação da linearidade do método.

4.2.12 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação da PTX foi determinada utilizando-se 1mL da formulação submetida à centrifugação (15000 g) por 30 minutos (DJORDJEVIC, 2005). Ao término do ciclo de centrifugação, uma alíquota do sobrenadante do sistema foi cuidadosamente extraída e diluída em etanol com a finalidade de se obter a concentração média observada na curva de calibração gerada (16 µg/mL). A eficiência de encapsulação foi calculada conforme Equação (3) sugerida por DAMASCENO (2005).

$$EE = \frac{ABS_{sob}}{ABS_{form}} \times 100 \quad (3)$$

Onde, EE é a eficiência de encapsulação; Abs_{sob} é a absorvância do sobrenadante da formulação pós-centrifugação no λ de 273 nm; Abs_{form} é a absorvância da formulação antes da centrifugação no λ de 273 nm.

4.2.13 Difração de raios-X (DRX)

O grau de cristalinidade ou o estado amorfo da PTX e das formulações com e sem o fármaco foram analisados. As amostras foram expostas a uma radiação de cobre monocromatizada, a varredura angular 2θ possuiu intervalo angular de 4° a 70°, com velocidade de varredura de 0,1 segundo para passo de 0,05° (SILVA et al., 2014). Todas as análises foram feitas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.2.14 Estudos de Liberação *in vitro* da pentoxifilina

4.2.14.1 Preparo da membrana sintética e montagem da célula de difusão de Franz

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF). A membrana sintética utilizada foi de acetato de celulose 0,45 μm , sendo estas deixadas 24 horas em imersão numa solução de tampão fosfato (0,1 mol/L) pH 7,4. As células de difusão tipo Franz utilizadas possuíam uma área difusional de 0,7539 cm^2 e volume de aproximadamente 6 mL. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato (0,1 mol/L), pH 7,4, num sistema composto de seis células individuais, que estavam conectadas a um banho termostaticado à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, sendo mantidas sob agitação constante em agitador magnético por um período de 24 horas. As membranas de acetato de celulose foram colocadas na parte superior do compartimento receptor de uma maneira a evitar a formação de bolhas. O compartimento doador foi preenchido com um volume de 300 μL da solução de PTX (1%) ou ME-PTX a ser testada.

4.2.14.2 Coleta e leitura da amostra

A difusão do fármaco é determinada pela quantificação do mesmo no compartimento receptor. Para tanto, as amostras foram coletadas em A cada intervalo de tempo todo o volume do compartimento receptor foi retirado e adequadamente diluído para a determinação da quantidade de PTX liberada neste compartimento através de leitura espectrofotométrica no comprimento de 273 nm.

O volume total da fase receptora foi substituído a cada amostragem com tampão fosfato pH 7,4 para manutenção das condições *sink* do sistema.

4.2.14.3 Análise cinética do ensaio de liberação *in vitro*

Para a avaliação da cinética da PTX no sistema microemulsionado, os resultados da liberação *in vitro* foram compilados em gráficos de dispersão xy, característicos de três modelos cinéticos:

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

A partir dos gráficos, realizou-se análise de regressão linear, determinando-se o coeficiente linear (r) para cada modelo cinético proposto. O modelo que apresentou o maior valor de r foi o selecionado.

O valor de fluxo (J), velocidade de liberação, da PTX foi calculado através de regressão linear e correspondeu a inclinação (a) na porção linear dos pontos experimentais selecionados a partir do tempo de 60 minutos, assumindo-se que a partir deste ponto o equilíbrio de difusão já estaria alcançado, obtendo-se então o fluxo no estado estacionário (trecho constante do gráfico) (MOSER et al., 2001; COSTA & LOBO, 2001).

Quando extrapola-se a linha do estado estacionário até o eixo do tempo, o intercepto obtido corresponde ao *lag time* (STORPIRTIS et al., 2009). Dessa forma, o t_{lag} pode ser definido como o tempo necessário para que a passagem de uma substância através de uma membrana atinja o equilíbrio (AULTON, 2005).

O coeficiente de liberação, K_r , foi calculado através da relação entre o fluxo no estado estacionário e a concentração inicial de PTX no veículo utilizado (ROTTKE et al., 2014), como mostrado na Equação 4:

$$K_r = \frac{J_{ss}}{C_0} \quad (4)$$

Onde, K_r é o coeficiente de liberação, J_{ss} é o fluxo no estado estacionário através das membranas de acetato de celulose ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\sqrt{\text{h}}$) e C_0 é a concentração inicial de PTX na formulação ($\mu\text{g}/\text{mg}$).

Além disso, realizou-se o cálculo do percentual de liberação da PTX tanto da solução quanto da ME ao longo do tempo através da Equação 5 (POPA et al., 2010):

$$\text{Percentual de liberação (\%)} = \frac{Rt}{L} \times 100 \quad (5)$$

Onde R_t corresponde a quantidade de PTX liberada no tempo t e L representa a quantidade inicial de PTX na ME.

4.2.15 Atividade anti-inflamatória de ME-PTX utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina

4.2.15.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus* var. *albinus*) machos, com idade entre 3 e 5 meses, pesando entre 200-250 g, os quais foram fornecidos pelo Biotério Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBIOTEC) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus de João Pessoa. Os animais foram mantidos a temperatura de $22 \pm 3^\circ\text{C}$, sob ciclo claro-escuro de 12 horas, alimentados com ração Purina tipo pellets® e com livre acesso à água. O referido estudo foi realizado mediante aprovação prévia, por escrito, da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/CESED – PB (Anexo A).

4.2.15.2 Indução do edema de pata por carragenina

O teste de edema de pata é um modelo de fácil manipulação e efetivo para testar substâncias com potencial anti-inflamatório. Os animais a serem submetidos ao teste foram mantidos em jejum, porém com livre acesso à água, por um período de 24 horas e posteriormente receberam uma injeção subplantar de 100 μL de uma suspensão de carragenina a 1% (p/v) (WINTER, 1962). O volume (mL) adquirido pela pata foi medido por um hidropletismômetro imediatamente antes da injeção subplantar e em 1, 2, 3 e 4 horas após este procedimento.

O hidropletismômetro contém um aparato cilíndrico preenchido com uma solução de baixa concentração eletrolítica, conectado a uma célula, dentro da qual existe um eletrodo onde é realizada a medida do volume da pata do animal. Um sistema de tubos conectantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica no aparato onde a pata do animal é mergulhada resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo. Após ter sido calibrado, o aparelho converte o deslocamento do líquido em volume, que é indicado em um visor digital.

4.2.17.3 Tratamentos

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais (n= 6) e todos receberam seu respectivo tratamento 30 minutos antes da administração da suspensão de carragenina, excetuando-se o grupo que recebeu unicamente a injeção do agente flogístico. Os grupos relativos ao fármaco de referência foram tratados via intraperitoneal com solução de PTX (36 ou 72 mg.kg⁻¹) (ABDEL-SALAM et al., 2003) e o grupo que utilizou apenas o veículo recebeu a ME sem o fármaco incorporado através da via tópica. Os grupos restantes receberam a ME-PTX, também por via tópica, nas concentrações tópicas a serem calculadas.

O resultado foi dado como aumento do volume (mL) em função do tempo (t), onde este aumento foi calculado como a variação do volume da pata no tempo t quando comparado ao valor obtido antes da injeção do agente flogístico (SADEGHI et al., 2011). Além disso, o percentual de inibição do edema (OLAJIDE et al., 1999) induzido pela carragenina foi calculado em cada hora do ensaio utilizando a Equação 6:

$$\text{Percentual de inibição(\%)} = \frac{(C_t - C_o)_{\text{controle}} - (C_t - C_o)_{\text{tratado}}}{(C_t - C_o)_{\text{controle}}} \quad (6)$$

Sendo C_t, o volume da pata em x horas após a injeção de carragenina e C_o, é o volume da pata antes da injeção de carragenina.

4.2.15.4 Cálculo da Dose

A dose a ser administrada de maneira tópica para os ratos foi calculada com base no peso corporal dos animais de acordo com a razão da área de superfície corporal. Para um rato de 200 g esta razão corresponde a 5, e, para um homem de 70 Kg, corresponde a 56 (GHOS, 2005). Para a realização da conversão da dose oral para uma dose tópica/transdérmica em um rato, a dose humana foi utilizada. A dose oral de PTX indicada para o tratamento de várias doenças varia entre 400 – 1200 mg/dia. No entanto, as doses mais utilizadas são as de 400 e 800 mg/dia, portanto, estas foram as escolhidas para serem tomadas como base na conversão.

A dose oral para ratos (mg/Kg) foi calculada com base na Equação 7 (ABOOD et al., 2013):

$$\text{Dose oral para rato} = \text{Dose oral humana} \times \frac{F}{F_H} \quad (7)$$

Considerando a baixa biodisponibilidade oral da PTX (aproximadamente 20%), a dose tópica/transdérmica para este fármaco em ratos foi calculada utilizando a Equação 8 (ABOOD et al., 2013):

$$\text{Dose para aplicação tópica} = \text{Dose oral para ratos} \times \frac{\text{Biodisponibilidade oral do fármaco}}{100} \quad (8)$$

4.2.16 Análise histológica

Após a última medida das patas, os animais foram devidamente eutanasiados segundo a metodologia proposta para roedores e outros pequenos mamíferos contida na Resolução nº 1000 de 11 de maio de 2012. Amostras de patas tratadas com carragenina (n=3) foram retiradas de cada um dos grupos e os fragmentos foram fixados por imersão em uma solução de formaldeído 10% por 12 horas. Posteriormente, os tecidos fixados foram desidratados em séries crescentes de etanol, tratados com xilol e embebidos em parafina. Secções de 3-4 µm foram preparadas e coradas com hematoxilina-eosina para análise em microscópio óptico (SADEGHI et al., 2013).

4.2.17 Análise estatística do estudo *in vivo*

Os dados foram expressos como a média ± desvio padrão e foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey-Kramer. Os resultados foram plotados no programa GraphPad Prism® versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e o nível de significância mínimo considerado foi de 0,05 (p < 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DOS COMPONENTES

A seleção dos componentes é um fator crítico para a formação de sistemas microemulsionados. Em relação a ME destinadas ao uso tópico, a escolha de uma fase oleosa e de tensoativos adequados que não provoquem irritabilidade na pele e auxiliem na permeação do fármaco é uma etapa decisiva para seu desenvolvimento.

Algumas características devem ser levadas em consideração para a escolha da fase oleosa de uma formulação, tais como a ausência de toxicidade, de irritabilidade e elevada estabilidade físico-química. Um óleo que merece destaque, sendo considerado um óleo adequado para aplicações cosméticas e farmacêuticas, são os triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (TACC).

O TACC é um éster constituído por triglicerídeos de cadeia média (TCM) produzido através da esterificação da glicerina e dos ácidos graxos (ácido cáprico e caprílico) proveniente do óleo de coco (ANFARMAG, 2004). É um óleo neutro, de aparência clara, praticamente incolor, possui baixa viscosidade, ótimo espalhamento devido sua característica saturada, não é sensível ao calor, não tem tendências a sofrer hidrólise e nem instabilidades microbianas, possui vantagens como alta estabilidade contra oxidação e boa solubilidade (HIPALGAONKAR et al., 2010).

A partir da década de 1970, estudos demonstraram os efeitos dos ácidos graxos sobre a resposta imunológica, sendo capazes de interferir em diversas etapas do processo inflamatório como a contração vascular, quimiotaxia, adesão, diapedese, ativação de células e morte celular, sendo a maioria dessas influências realizadas via derivados do ácido araquidônico (HATANAKA & CURI, 2007). No entanto, os TACC merecem um destaque como ésteres, pois são úteis como solvente, veículo e estabilizador de produtos a serem administrados de forma oral, tópica ou parenteral, podendo ser utilizados no tratamento e na prevenção de doenças inflamatórias como a dermatite amoniacal e úlceras por pressão, formando uma proteção para a pele danificada, impedindo maiores processos de lesão (MAGALHÃES et al., 2008).

Vários estudos são capazes de demonstrar a importância dos TCM na modulação inflamatória. A associação de ácidos graxos essenciais com os triglicerídeos de cadeia média atua consideravelmente na prevenção de úlceras de

decúbito e promove regeneração tissular em escoriações epidérmicas (DECLAIR, 1994). Estudos mostraram que o ácido caprílico suprime a secreção de IL-8 de células Caco-2 (HOSHIMOTO et al., 2002) e que a associação de ácido linoleico com os ácidos cáprico e caprílico promove aumento na sua capacidade antiedematogênica tópica (NABAS, 2009).

Dessa maneira, a escolha dos TACC como fase oleosa para a ME proposta foi baseada em sua estabilidade termodinâmica e oxidativa, em seu amplo e conceituado uso na área farmacêutica e na sua capacidade de modular aspectos imunológicos/inflamatórios, podendo atuar como um potencial agente sinérgico na atividade anti-inflamatória proposta pela pentoxifilina.

A escolha do tensoativo é parte indispensável para a formulação de sistemas microemulsionados, pois através dele ocorre a redução da tensão interfacial entre a porção aquosa e a oleosa, resultando numa adequada formação de ME (BALI et al., 2010). Dentre todos os tipos de tensoativos, os não-iônicos são os mais amplamente utilizados para comporem formulações tópicas, pois possuem menor toxicidade quando comparados aos iônicos, apresentam boa compatibilidade cutânea e possuem a capacidade de manter seu desempenho numa ampla faixa de pH (TENJARLA, 1999; WARISNOICHAROEN et al., 2000).

O polissorbato 80 (Tween® 80) foi escolhido como o tensoativo não-iônico hidrofílico a ser inserido na ME devido a sua ampla utilização em formulações destinadas ao uso tópico (NANDI et al., 2003; CHEN et al., 2004; CHEN et al., 2007; GAMAL, 2008; BUTANI et al., 2014; SAHOO et al., 2014).

No entanto, a presença de apenas um único tensoativo muitas vezes não é suficiente para que haja a formação de sistemas microemulsionados. Uma mistura de tensoativos pode levar a formação de ME mais estáveis em comparação àquelas formadas por um tensoativo, levando a um processo de otimização das formulações (DJEKIC et al., 2011). Além disso, o uso de uma mistura faz com que a concentração individual de cada tensoativo utilizado seja menor, diminuindo a questão de irritabilidade e toxicidade, típicas desses compostos, aumentando a biocompatibilidade final da formulação (DJEKIC et al., 2011).

O segundo tensoativo, muitas vezes chamado de cotensoativo, possui o papel de modificador da formulação, pois sua principal função é de se adsorver na interface óleo-água, tornar-se parte da mistura anfifílica e modificar as interações na camada interfacial, diminuindo a tensão existente nesta camada e proporcionando

flexibilidade suficiente para o desenvolvimento de curvaturas necessárias para formar ME (GHOSH & MURTHY, 2006; PHILIP & PATHAK, 2008; DALTIM, 2011). Devido esta flexibilidade, ocorre a diminuição do tamanho das gotículas e a ampliação da região dos sistemas microemulsionados (KUNEIDA et al., 1999).

O cetil éter de polioxietileno (Brij[®] 52) foi escolhido como o segundo tensoativo não-iônico e foi utilizado no intuito de diminuir o tamanho das gotículas e estabilizar as formulações. A escolha dos tensoativos Tween[®] 80 e Brij[®] 52 para a formação de uma ME é inédita, desempenhando um passo inicial para a formação de um novo sistema carreador de fármacos hidrofílicos.

5.2 DIAGRAMAS DE FASES PSEUDOTERNÁRIO (DFPT)

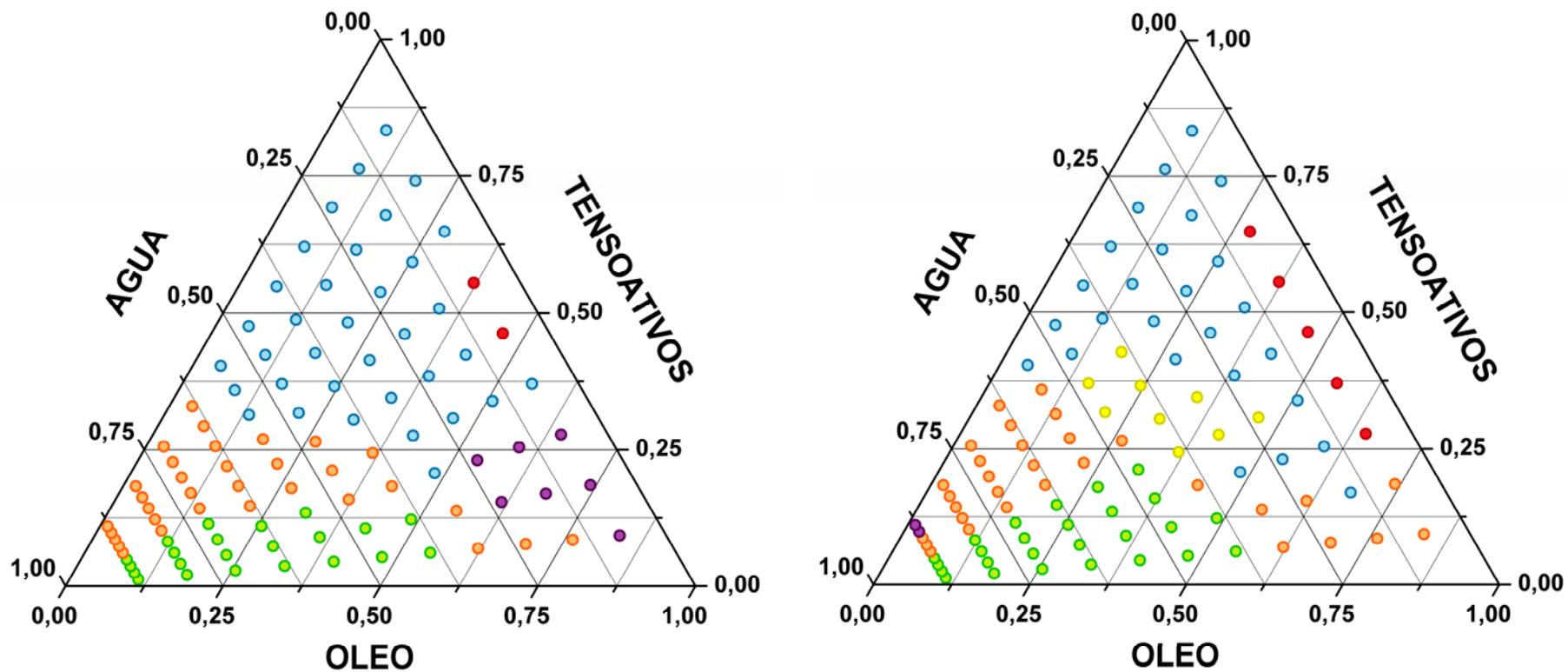
Definidos os componentes necessários para o desenvolvimento do sistema microemulsionado, o critério utilizado para a escolha da proporção adequada para a mistura de tensoativos foi o tamanho da área de formação de sistemas transparentes, característicos de ME, observados após a construção dos DFPT.

A construção desse tipo de diagrama é uma ferramenta imprescindível para caracterizar em que condições experimentais ocorrem o aparecimento de áreas de ME, ou seja, quais proporções dos componentes fazem com que estes sistemas existam e represente a região mais adequada para a incorporação do fármaco (FORMARIZ et al., 2005).

As proporções de mistura de Tween[®] 80 e Brij[®] 52 testadas foram 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. A Figura 3 representa os DFPT obtidos através da mistura de tensoativos nas proporções 6:4 e 7:3, respectivamente. Já a Figura 4, representa os DFPT obtidos através da mistura de tensoativos nas proporções 8:2 e 9:1, respectivamente.

Pôde-se observar em todos os diagramas a formação de diversas regiões classificadas como separação de fases (SF), sistemas transparentes (ST), sistemas semissólidos opacos (SSSO), sistemas semissólidos leitosos (SSSL), sistemas líquidos opacos (SLO) e sistemas líquidos leitosos (SLL).

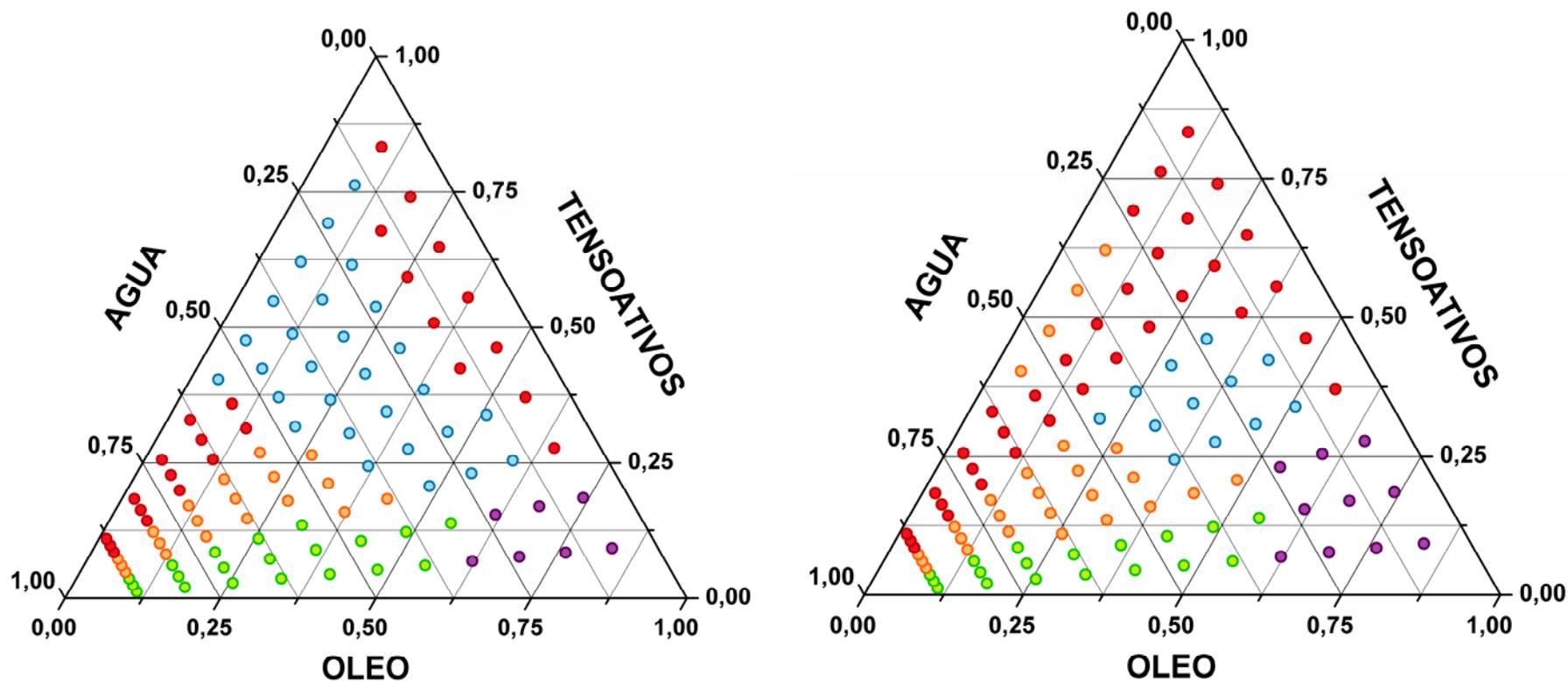
Figura 3 - Diagrama de fases pseudoternário contendo Tween® 80 e Brij® 52 nas proporções 6:4 e 7:3, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O DFPT à esquerda apresenta a mistura de tensoativos na proporção 6:4 e o diagrama à direita a proporção 7:3. As cores representam as regiões obtidas: SF – separação de fases (roxo), ST – sistema transparente (vermelho), SSSO – sistema semissólido opaco (azul), SSSL – sistema semissólido leitoso (amarelo), SLO – sistema líquido opaco (laranja) e SLL – sistema líquido leitoso (verde).

Figura 4 - Diagrama de fases pseudoternário contendo Tween® 80 e Brij® 52 na proporção 8:2 e 9:1, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O DFPT à esquerda apresenta a mistura de tensoativos na proporção 8:2 e o diagrama à direita a proporção 9:1. As cores representam as regiões obtidas: SF – separação de fases (roxo), ST – sistema transparente (vermelho), SSSO – sistema semissólido opaco (azul), SLO – sistema líquido opaco (laranja) e SLL – sistema líquido leitoso (verde).

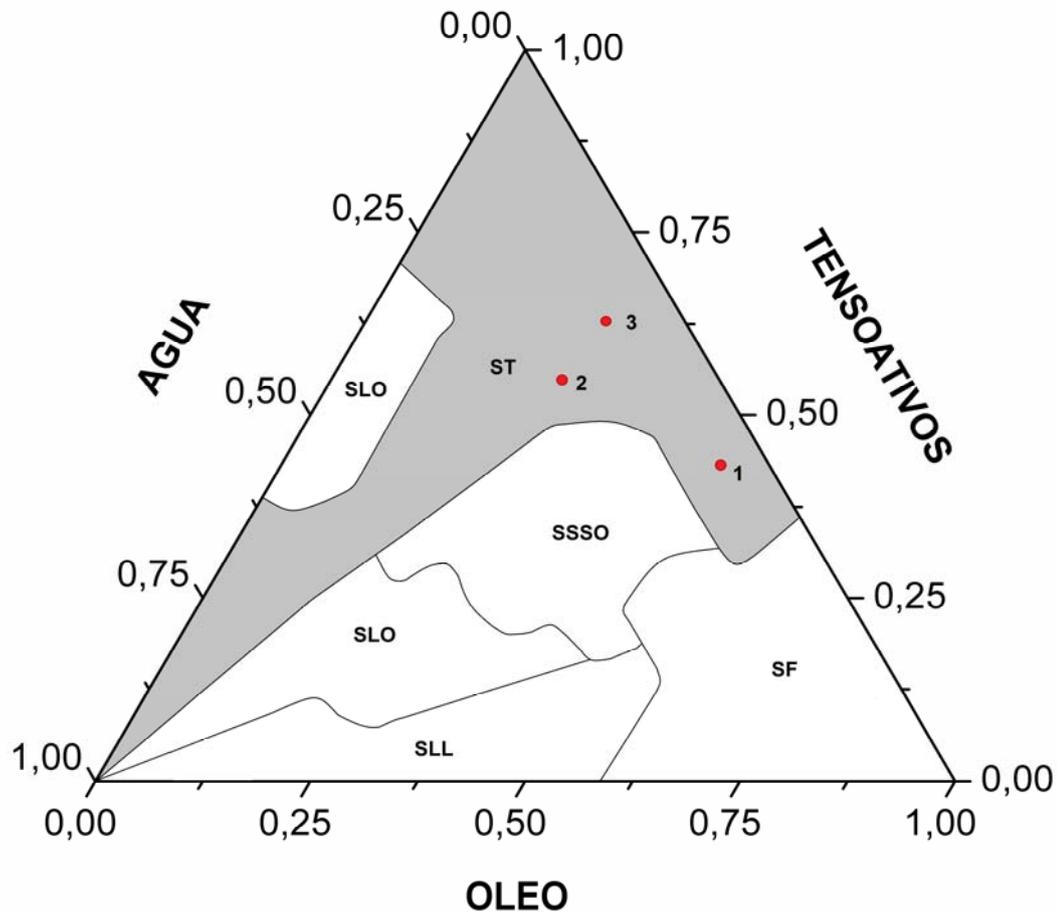
Através das análises visuais, o diagrama composto pelos tensoativos na proporção 9:1 foi o escolhido para a seleção dos pontos a serem formulados e caracterizados, pois ficou evidente a relação proporcional entre a área de sistemas transparentes formados, onde as ME se enquadram, e a proporção do tensoativo Tween® 80 em relação ao Brij® 52, pois à medida que a proporção de Tween® 80 aumentou, em detrimento da proporção do Brij® 52, a região de ST cresceu ao longo de todo o diagrama. Portanto, esta proporção foi a escolhida devido ao fato de ter-se obtido nela a maior região de ST.

5.3 SELEÇÃO DOS PONTOS NO DIAGRAMA E INCORPORAÇÃO DA PENTOXIFILINA

Após a escolha do DFPT que representou a proporção da mistura de tensoativos capaz de formar a maior área de sistemas transparentes, partiu-se para a seleção de pontos nessa região.

Foram selecionadas 3 formulações com diferentes proporções dos componentes no intuito de investigar se a microestrutura do sistema escolhido corresponderia a de uma ME. A Figura 5 mostra o diagrama selecionado (9:1), evidenciando os pontos estudados. A composição centesimal de cada formulação está descrita na Tabela 1.

Figura 5 - Diagrama de fases pseudoternário contendo Tween[®]80 e Brij[®] 52 na proporção 9:1, com destaque para os pontos selecionados numerados de 1 a 3.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Regiões delineadas obtidas: SF – separação de fases, ST – sistema transparente, SSSO – sistema semissólido opaco, SLO – sistema líquido opaco e SLL – sistema líquido leitoso. Os pontos selecionados encontram-se numerados de 1 a 3.

Tabela 1 - Composição percentual (p/p) das formulações selecionadas.

Componentes	Composição percentual (%)		
	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3
Fase aquosa	5,0	23,0	12,5
Fase oleosa	51,0	23,0	25,0
Tween [®] 80 /Brij [®] 52 (9:1)	44,0	54,0	62,5

As formulações 1 e 3 situam-se à direita do diagrama e possuem percentuais de componentes que sugerem uma microestrutura do tipo A/O. No entanto, a diferença mais marcante entre elas é a quantidade aumentada de tensoativos na formulação 3, correspondendo a mais da metade da sua composição. Já o ponto 2, possui quantidades de fase oleosa e fase aquosa iguais, situando-se numa região capaz de gerar ME do tipo bicontínua ou estruturas de cristais líquidos. Portanto, todas as proporções foram selecionadas com a finalidade de serem desenvolvidos sistemas microemulsionados ou do tipo A/O ou bicontínuo.

Tendo-se escolhido os pontos, o fármaco PTX foi incorporado às formulações na concentração de 1%. Estudos importantes realizaram a incorporação de metilxantinas, cafeína e teofilina, em ME na concentração de 1%, sendo considerados sistemas satisfatórios para carrear esta quantidade de fármaco (ZHANG et al., 2011a; KALAITZAKY et al., 2014). Houve também o estudo de um gel contendo PTX à 1%, obtendo correlação *in vitro-in vivo* satisfatória (YAN et al., 2007). Diante disso, escolheu-se essa concentração de fármaco para a ME baseada na literatura envolvendo outras metilxantinas e a própria PTX.

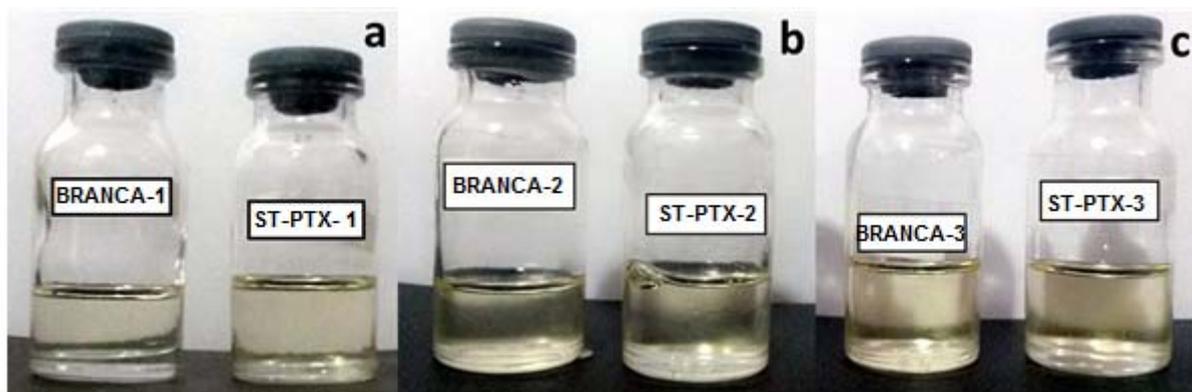
Damasceno e colaboradores (2011) afirmaram que a encapsulação máxima de um fármaco poderia ser alcançada ao incorporar este durante o processo de formação do sistema microemulsionado. Dessa forma, a PTX (1%) foi adicionada a fase aquosa antes de cada formulação estar totalmente pronta.

Para a incorporação de PTX aos sistemas formados foi utilizada a técnica de emulsificação por ultrassom, conhecida como sonicação, onde as ondas sonoras produzidas pelo equipamento através da sonda provocam um processo de cavitação acústica, gerando colapsos entre as gotículas que se tornam cada vez menores, tendo seu diâmetro influenciado por outros fatores também como a proporção entre óleo e tensoativos, a viscosidade da fase contínua, o tempo da emulsificação e a energia aplicada neste processo (GHOSH et al., 2013; NAKABAYASHI et al., 2011). Após a etapa de incorporação, procedeu-se a caracterização desses sistemas.

5.4 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA

A avaliação macroscópica foi realizada 48 horas após o preparo dos sistemas e está apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Aspecto visual das formulações selecionadas para os estudos de caracterização da estrutura.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: A designação branca referiu-se ao sistema puro, formado apenas pela fase oleosa, fase aquosa e a mistura de tensoativos, já a designação ST-PTX, referiu-se ao sistema transparente contendo o fármaco incorporado a este. (a) Formulação 1 (branca e incorporada), (b) formulação 2 (branca e incorporada) e (c) formulação 3 (branca e incorporada).

Esse tipo de caracterização é uma etapa que permite verificar se os sistemas desenvolvidos atendem a alguns dos requisitos correspondentes a uma ME verdadeira e se a presença do fármaco incorporado possui ou não a capacidade de alterar as propriedades intrínsecas apresentadas pelo sistema proposto. Aspectos como limpidez, homogeneidade, ausência de material particulado, separação de fases, além da transparência e da estabilidade termodinâmica correspondem a fatores indispensáveis das ME que devem permanecer inalterados mesmo após a adição de um princípio ativo (SILVEIRA, 2009).

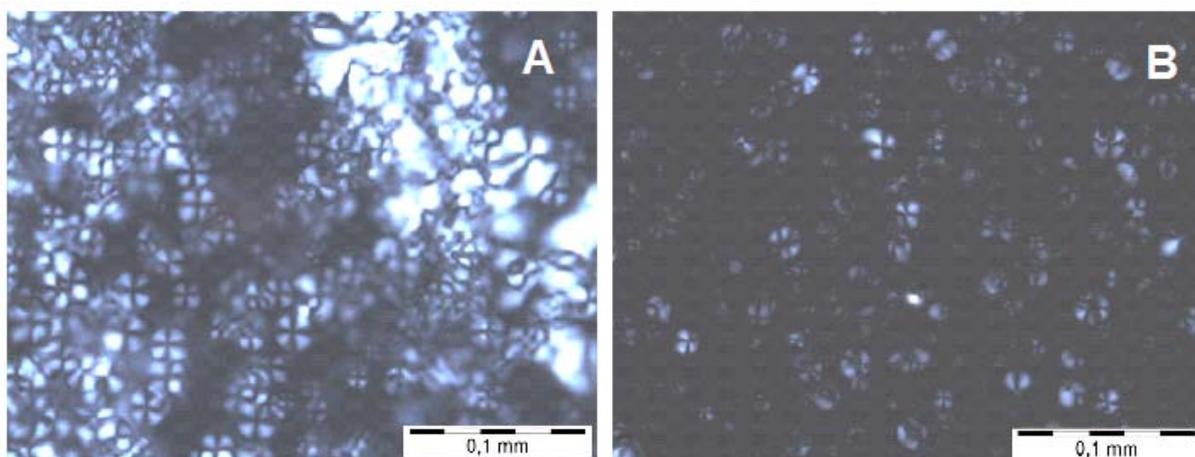
Observou-se que, tanto as formulações brancas, sistema puro sem fármaco, quanto as que possuíam a PTX incorporada, apresentaram-se como sistemas límpidos, homogêneos, transparentes, de coloração levemente amarelada, em função da cor do tensoativo Tween[®] 80, sem fenômenos de separação de fases ou de turbidez. A consistência das formulações, no entanto, foi bem variável apresentando sistemas visualmente mais líquidos (a), bem viscosos (b) e de viscosidade intermediária (c). A adição da PTX não provocou nenhuma alteração no aspecto visual e nem na consistência dos sistemas propostos, dando indícios de uma boa estabilidade.

Após obtenção de aspecto visual satisfatório, resolveu-se investigar os fenômenos ópticos dos sistemas selecionados para elucidação de sua isotropia ou anisotropia devido as diferenças de viscosidade entre as formulações.

5.5 ISOTROPIA

Todas as formulações, brancas ou incorporadas com PTX, foram analisadas por inspeção visual através de microscopia de luz polarizada. As formulações 1 e 3 apresentaram-se como um campo completamente escuro (dados não mostrados), não sendo capazes de desviar o plano da luz. Já a formulação 2, quando submetida a mesma análise, promoveu um desvio sob o plano de luz polarizada, resultando no aparecimento de áreas claras e na presença de estruturas conhecidas como “cruzes de malta” (Figura 7).

Figura 7 - Fotomicrografias sob microscópio óptico com luz polarizada da formulação 2 (branca e incorporada).



Fonte: Próprio autor.

Legenda: (A) Formulação 2 - branca e (B) formulação 2 – incorporada com PTX.

A microscopia de luz polarizada é uma das técnicas mais utilizadas para permitir a elucidação quanto a isotropia ou anisotropia de sistemas, podendo fornecer informações sobre a estrutura e composição de materiais, tais como vesículas lipídicas, microemulsões e sistema líquido-cristalinos.

Sob um plano de luz polarizada, uma amostra considerada isotrópica possui as mesmas propriedades ópticas em todas as direções, não sofre o fenômeno da

dupla refração, conhecido como birrefringência e, dessa forma, o raio de luz que parte do polarizador atravessa o sistema sem modificar sua direção de vibração. Esse tipo de material é caracterizado pela presença de um campo escuro quando visto sob microscópio de luz polarizada. Já uma amostra anisotrópica é aquela que possui propriedades ópticas capazes de desviar o plano de luz incidente, fazendo com que o raio polarizado sofra birrefringência, onde são produzidos raios de luzes distintos que vibram em planos perpendiculares entre si, fazendo com que sejam apresentados diferentes índices de refração dependentes da direção da propagação da luz através do sistema e da orientação do eixo de vibração (CHORILLI et al., 2011).

Microemulsões e cristais líquidos de arranjo cúbico são tidos como sistemas isotrópicos e os cristais líquidos de arranjo hexagonal e lamelar são anisotrópicos. O arranjo hexagonal apresenta uma forma chapada típica, com os agregados de tensoativos organizados em cilindros. O arranjo lamelar possui várias camadas (lamelas) sobrepostas, formando estruturas características denominadas “cruzes-de-malta” (CHORILLI et al., 2009).

Dessa maneira, as formulações 1 e 3, por apresentarem-se como um campo completamente escuro sob luz polarizada, foram consideradas como sistemas opticamente isotrópicos. Já a formulação 2, por ter conseguido desviar o plano de luz polarizada, não apresentou-se como um campo completamente escuro, sendo portanto considerado um sistema opticamente anisotrópico. Associado a esse fato, houve o aparecimento das estruturas denominadas “cruzes-de-malta”, uma evidência sugestiva de que este sistema poderia tratar-se de um cristal líquido de arranjo lamelar.

O comportamento de arranjo lamelar e a presença de “cruzes de malta” ocorreu tanto na formulação branca quanto na incorporada (Figura 7A e 7B). Deve-se destacar o fato de que quando a PTX foi incorporada, houve uma diminuição na formação das “cruzes de malta”, demonstrando que este fármaco é capaz de influenciar a estrutura organizacional do sistema proposto. A provável justificativa para esse evento pode ser advinda de a PTX ter interagido diretamente com a camada dos tensoativos, modificando de alguma maneira sua estrutura, tornando-a mais organizada e menos sobreposta e conseqüentemente com menos “cruzes-de-malta”. A diminuição dessas estruturas características de cristais líquidos lamelares

também ocorreu no sistema lamelar proposto por Chorilli e colaboradores (2011), onde a adição de palmitato de retinol resultou no mesmo comportamento.

Devido a pesquisa estar voltada para sistemas considerados isotrópicos, optou-se por dar continuidade aos testes utilizando apenas as formulações 1 e 3. No entanto, a formulação 2 será utilizada em estudos posteriores tendo em vista que esse tipo de sistema destaca-se em muitos aspectos como uma boa estabilidade físico-química, o termocromismo, o aumento da capacidade de retenção de água no estrato córneo aumentando a hidratação cutânea e a sua característica reológica tixotrópica adequada para uma boa aplicação sobre a pele (CHORILLI et al., 2009; MASSON et al., 2005).

5.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

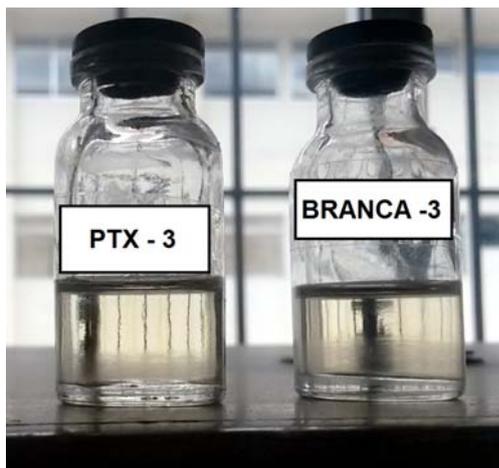
Os testes de estabilidade, em condições específicas e controladas, servem para auxiliar na avaliação da capacidade de um produto em manter o seu aspecto original, suas características físicas e químicas, podendo indicar problemas que possivelmente ocorrerão nas formulações. Informações obtidas em estudos de estabilidade são particularmente importantes para os sistemas que se encontrem emulsionados, pois podem fornecer sinais de desestabilização como: sedimentação, coalescência, separação das fases, inativação de substâncias ativas e ineficácia do sistema (IDSON, 1993).

A estabilidade das formulações escolhidas contendo a pentoxifilina (1%) foi investigada através de submissão destas ao ciclo de aquecimento-resfriamento e de congelamento-descongelamento, pois a temperatura é o fator ambiental mais importante envolvido na estabilidade física, físico-química e química de um produto farmacêutico (BABY et al., 2007). Ensaio que envolve a submissão de formulações a condições extremas de temperaturas possuem como finalidade o aumento da velocidade de degradação química e a indução a modificações físicas (VELASCO *et al*, 2008).

A formulação 1 foi capaz de suportar o ciclo de aquecimento-resfriamento sem nenhuma modificação visível, ou seja, não ocorreu fenômenos de turvação, separação de fases ou precipitação do fármaco, demonstrando que não houve instabilidades físico-químicas e tornando-a apta a ser submetida ao ciclo de congelamento- descongelamento. No entanto, já na segunda fase do aquecimento-

resfriamento, a formulação 3 apresentou um fenômeno de instabilidade (Figura 8) após sua retirada da estufa, demonstrando que a mudança brusca na temperatura foi capaz provocar mudanças na formulação, fazendo com que esta fosse descartada para estudos posteriores.

Figura 8 - Instabilidade da formulação 3 após ciclo de aquecimento-resfriamento.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Formulação 3 - branca e incorporada com pentoxifilina (PTX-3). Presença do fenômeno de instabilidade nas duas amostras.

Continuamente, foi realizado o ciclo de congelamento-descongelamento com a formulação 1 e, após o término desse outro ciclo, pôde-se observar que novamente não houve nenhuma alteração visual significativa, sugerindo que essa formulação apresentou um bom potencial nos estudos de estabilidade, permanecendo estável sob as diversas perturbações térmicas aplicadas ao sistema. Dessa maneira, apenas a formulação 1 foi considerada apta a dar continuidade ao estudo e a realização dos demais ensaios, já que a formulação 2 foi descartada devido sua anisotropia e a formulação 3 devido sua instabilidade.

Diante disso, após a escolha da formulação isotrópica mais estável (formulação 1), devido a probabilidade de esta ser um sistema microemulsionado, foram realizados ensaios de calorimetria exploratória diferencial e de microscopia eletrônica de transmissão para que a microestrutura e a morfologia dessa formulação fosse elucidada.

5.7 ANÁLISE TÉRMICA

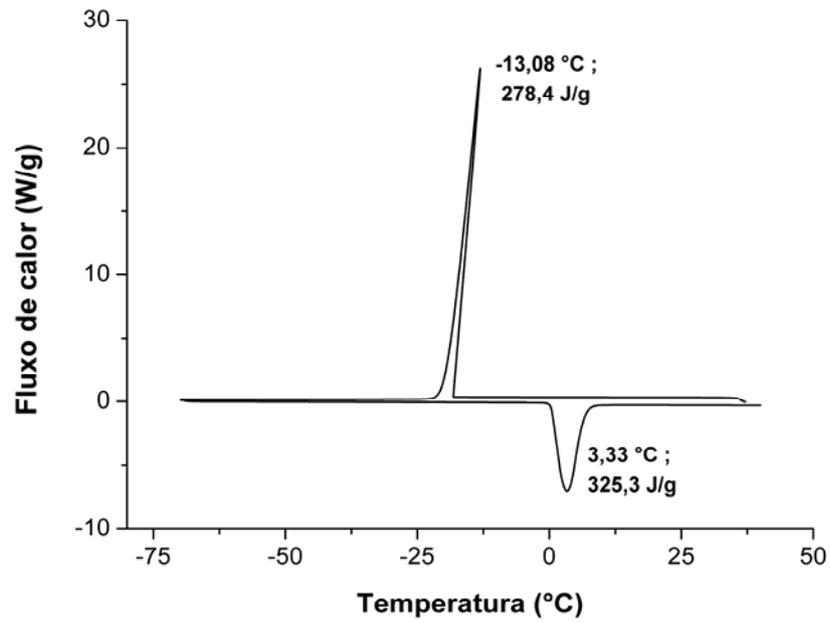
A calorimetria exploratória diferencial (DSC - do inglês *Differential Scanning Calorimetry*), é uma técnica de análise térmica capaz de permitir a observação da variação da energia (entalpia) entre a amostra analisada e uma amostra de referência, em função da temperatura (MATOS et al., 2009).

Essa técnica é muito utilizada na área farmacêutica com diversas aplicações, entre elas a caracterização de matérias-primas, o estudo de interações entre princípios ativos e excipientes e a avaliação de estabilidade de formulações (BOONME et al., 2006; DAS & SURESH, 2011). Na vertente da nanotecnologia, a DSC pode ser utilizada na investigação da microestrutura de sistemas microemulsionados, baseado no monitoramento de eventos térmicos ocorridos na própria formulação e em seus componentes isolados e na identificação da temperatura na qual esses eventos ocorrem.

Diante disso, foram realizadas corridas térmicas para visualização de eventos na água, óleo e na formulação incorporada ou não com PTX. Na análise do termograma da água (Figura 9) observou-se um pico exotérmico na temperatura de -13,08 °C, com valor de entalpia (ΔH) de 278,4 J/g e um pico endotérmico na temperatura de 3,33 °C e entalpia de 325,3 J/g. Estes picos estão relacionados respectivamente aos processos de solidificação (congelamento) e fusão da água. O termograma do óleo (TACC) (Figura 10) apresentou dois picos exotérmicos nas temperaturas de -29,4°C ($\Delta H=32,04$ J/g) e -42,91°C ($\Delta H = 18,78$ J/g). Em relação ao pico endotérmico, foi observado apenas um único pico na temperatura de -2,73°C ($\Delta H = 96,72$ J/g).

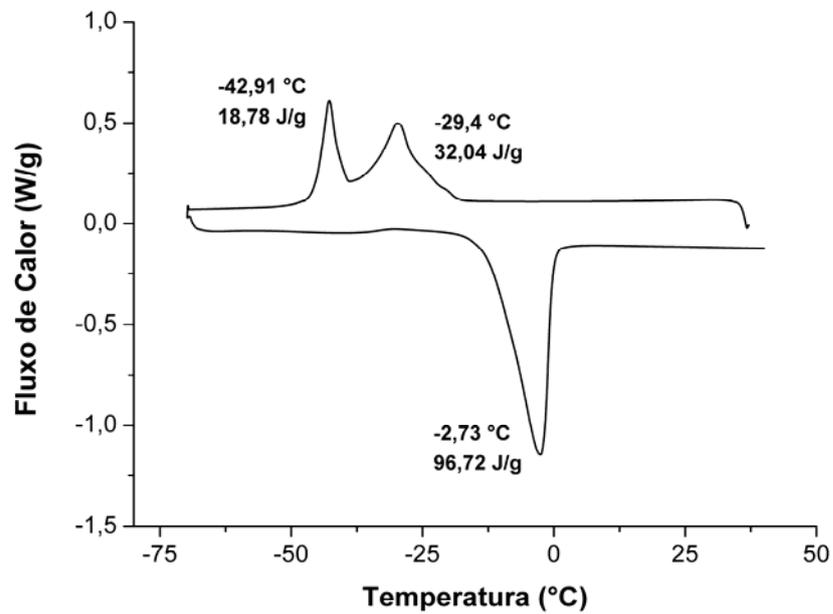
Para o termograma da formulação 1 branca (Figura 11) pôde-se observar um pico exotérmico na temperatura de -37,36°C ($\Delta H= 53,86$ J/g) e um pico endotérmico na temperatura de -2,81°C ($\Delta H= 134,3$ J/g). A formulação 1 incorporada com PTX (Figura 12) apresentou um pico exotérmico na temperatura de -42,75°C ($\Delta H= 57,13$ J/g) e um pico endotérmico na temperatura de -2,25°C ($\Delta H= 84,05$ J/g).

Figura 9 - Curva DSC da água.



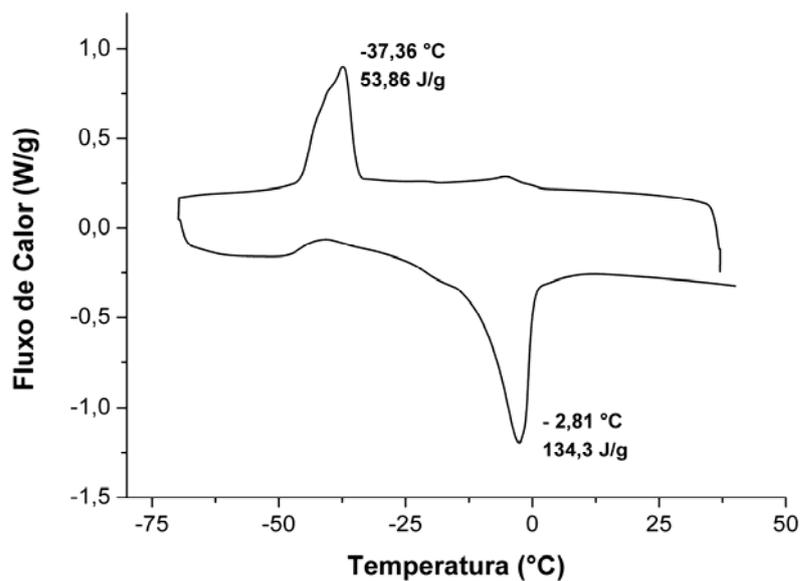
Fonte: Próprio autor.

Figura 10 - Curva DSC do óleo (TACC).



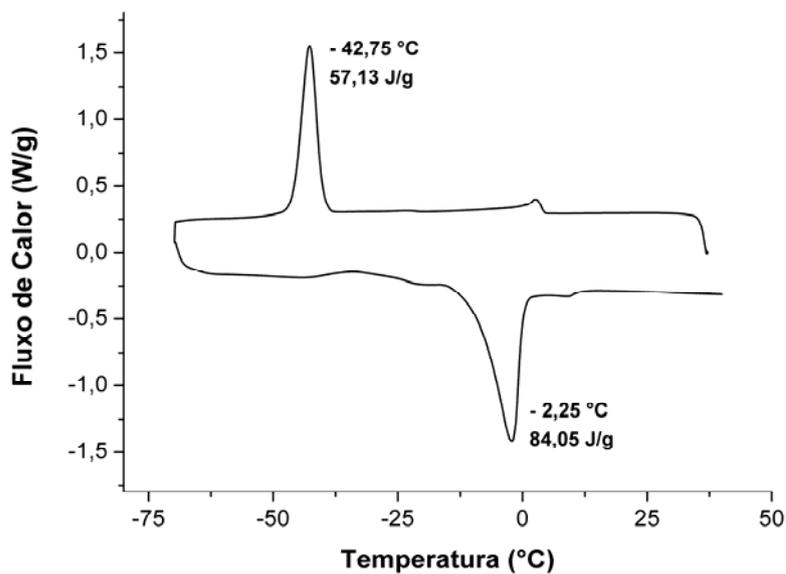
Fonte: Próprio autor.

Figura 11 - Curva DSC da formulação 1 - branca.



Fonte: Próprio autor.

Figura 12 - Curva DSC da formulação 1 incorporada com PTX.



Fonte: Próprio autor.

A estrutura de uma ME pode ser evidenciada através da interpretação dessas curvas de DSC quando se compara o termograma obtido da água, do óleo e os termogramas da formulação. Nessas curvas deve-se dar ênfase a região de resfriamento do termograma, pois é nesta região que verifica-se a presença ou

ausência do pico de congelamento da água, permitindo a interpretação mais direta sobre a microestrutura da formulação escolhida.

Zhang & Michniak-Kohn (2011) propuseram três situações distintas que podem ocorrer ao se analisar os termogramas: em ME do tipo A/O não ocorre a presença do pico característico do congelamento da água, já que a mesma encontra-se confinada no interior da gotícula revestida pelo filme de tensoativos, ME com estrutura bicontínua possuem o pico de congelamento do óleo e o pico de congelamento da água como dois eventos bem distintos e ME do tipo O/A que mostram apenas o pico de congelamento da água como um único e pronunciado evento, por estar livre na fase externa da formulação.

Diante da análise das curvas térmicas, percebeu-se que os picos presentes, tanto no termograma da formulação 1 branca quanto no da incorporada com PTX, estavam diretamente vinculados aos picos presentes no termograma do óleo, pois as formulações apresentaram grande similaridade nas temperaturas e nos tipos de eventos térmicos em relação àqueles eventos apresentados pelo TACC.

Esses dados sugerem que o óleo é a fase externa do sistema, caracterizando-o como sendo uma formulação do tipo A/O, tendo em vista que o pico correspondente ao processo de congelamento da água não foi visualizado em nenhum dos termogramas da formulação, sugerindo que a água estivesse confinada em gotículas revestidas pela camada de tensoativos, correspondendo à fase interna de uma ME. Sendo assim, a formulação 1 passou a ser denominada a partir de agora como ME₁-branca ou ME₁-PTX, para a incorporada.

Estes resultados entraram em consenso com os que foram obtidos por Sintov e Greenberg (2014) que desenvolveram uma microemulsão incorporada com cafeína, uma metilxantina que apresenta propriedades químicas semelhantes as da PTX. Os termogramas da formulação com cafeína também não apresentaram o pico correspondente ao congelamento da água, sendo, portanto, um sistema do tipo A/O.

Esse tipo de ensaio favoreceu a elucidação da distribuição dos componentes na formulação, dando ênfase em se descobrir qual seria a fase interna, na qual a PTX estaria incorporada, e a fase externa. Por conta dessa finalidade, não realizou-se as análises térmicas dos demais componentes, os tensoativos e o fármaco, pois além de não corresponder e nem auxiliar ao objetivo do teste, a faixa de temperatura utilizada na corrida não seria a ideal para visualização dos seus principais eventos térmicos.

É válido salientar a importância da análise do DSC para sistemas microemulsionados que contenham metilxantinas e seus derivados, pois devido as características hidrofílicas dos fármacos, a ausência do pico de congelamento da água pode ser um indício de que a formulação está apresentando a microestrutura correta para a veiculação dessas substâncias.

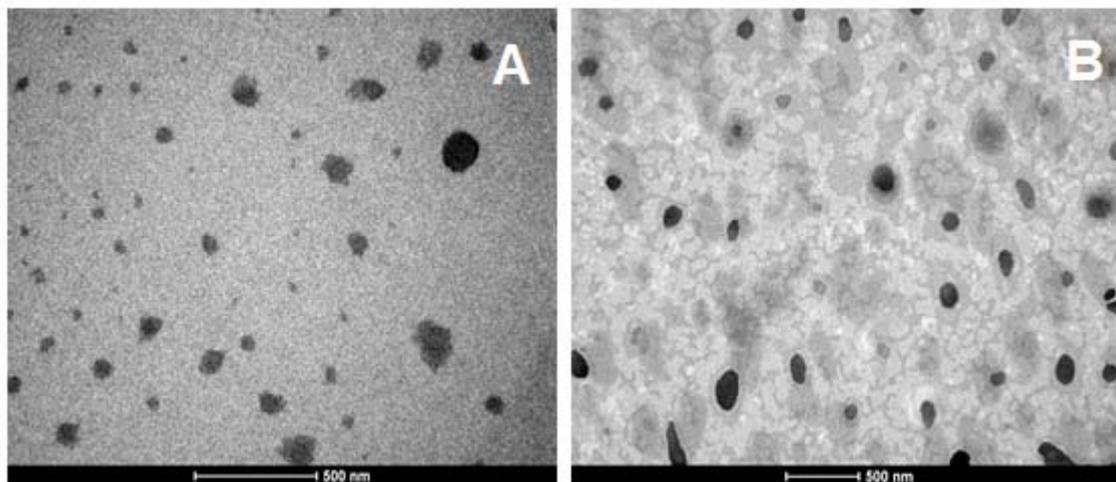
Após a verificação da existência de uma fase contínua e de outra descontínua na formulação, a confirmação da hipótese de que o sistema proposto fosse uma microemulsão se deu através dos resultados observados na MET.

5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Quando comparada à microscopia óptica, a MET permite aumentos muito maiores e uma fixação superior do material, características que favorecem a visualização direta da microestrutura de sistemas coloidais em resolução nanométrica (ACHARYA & HARTLEY, 2012). O MET é uma ferramenta valiosa tanto para a caracterização morfológica quanto para a avaliação da estabilidade de sistemas como micro e nanoemulsões e já é considerada uma análise preliminar importante do sistema coloidal (KLANG et al., 2012). Apesar disso, a técnica de coloração e de secagem utilizadas no procedimento podem afetar a estrutura e a morfologia da amostra, tendo que ser realizada uma interpretação cuidadosa (FRIEDRICH et al., 2010).

As fotomicrografias obtidas por MET das amostras ME₁-branca e ME₁-PTX são mostradas na Figura 13. Tanto as estruturas obtidas na ME₁-branca (A) quanto na ME₁-PTX (B) foram gotículas com formatos esféricos heterogêneos e discoides, com boa distribuição no campo e um tamanho nanométrico, enquadrando-se na faixa proposta para sistemas microemulsionados, podendo ser confirmado através de estudos de espalhamento dinâmico da luz. A distribuição uniforme das gotículas dá indícios da sua boa estabilidade, evitando fenômenos como cremagem, coalescência e quebra do sistema.

Figura 13 - Fotomicrografia da formulação 1, obtida por microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Fotomicrografia da ME₁-branca (A) e da ME₁-PTX (B) obtidas por MET. Barra de aumento de 500 nm.

Após a confirmação de que a formulação 1 tratava-se de uma ME e esta possuía como fase interna gotículas de água, que se encontravam circundadas por uma camada interfacial de tensoativos e dispersas em uma fase externa oleosa, deu-se continuidade aos ensaios para a caracterização da formulação escolhida.

5.9 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO- QUÍMICA

Antes de todas as determinações físico-químicas, a ME₁ foi mantida à temperatura ambiente por um período de 48h para sua estabilização termodinâmica. A determinação destas características permite que haja uma análise da ME em relação aos aspectos da formação, o comportamento estrutural, a determinação das transições de fase e a estabilidade. Dentre as propriedades físico-químicas mais utilizadas estão o pH, a condutividade elétrica e índice de refração (EVANDRO, 2009; MICHNIAK-KOHN & ZHANG, 2011).

5.9.1 pH

O pH foi avaliado para verificar se a ME₁ possuía compatibilidade para o uso tópico. O valor de pH encontrado para a ME₁-branca foi de $7,79 \pm 0,07$ e a ME₁-PTX obteve valor de $7,80 \pm 0,01$.

O pH adequado de uma formulação é padronizado conforme a tolerância biológica para produtos de uso cutâneo (pH 5,5 a 8,0) e estabilidade do componente ativo (SILVA et al., 2009). Além disso, ele é uma ferramenta que pode indicar alterações estruturais, ocorrência de reações químicas como processos de degradação e oxidação de seus componentes, perda de estabilidade das ME ou crescimento bacteriano, sendo um parâmetro sensível no controle de qualidade dessas formulações.

As formulações testadas, tanto a branca quanto a incorporada, obtiveram valor de pH compatível com o da pele (SILVA et al., 2009; BUTANI et al., 2014), fato que permite sua aplicação tópica desse sistema para o tratamento de afecções dermatológicas. Nota-se também que este parâmetro não foi afetado pela incorporação da PTX à microemulsão.

5.9.2 Condutividade Elétrica

O ensaio de condutividade elétrica é uma ferramenta útil para demonstrar as mudanças microestruturais que podem ocorrer nos sistemas coloidais (YAGHMUR, et al., 2003). Quando associado aos testes de DSC comportam-se como mais um mecanismo elucidativo da fase externa da microemulsão, sendo um parâmetro diretamente relacionado ao tipo de microestrutura apresentada pela formulação, revelando as características dos domínios contínuos (LAWRENCE & REES, 2000).

O valor de condutividade elétrica encontrado para a ME₁-branca foi de $2,19 \pm 0,11 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e para a ME₁-PTX obteve-se valor de $1,79 \pm 0,15 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Zhang e colaboradores (2011a) relataram que mudanças no comportamento estrutural estão intimamente relacionadas a drásticas alterações nos mecanismos de transporte elétrico. ME possuindo baixo teor aquoso, teriam sua microestrutura provavelmente característica do tipo A/O e, pelo fato da água estar confinada na gotícula, este sistema possuiria níveis baixos de condutividade, tendo em vista que a fase externa oleosa seria má condutora. Com o aumento do conteúdo aquoso, as gotículas de água aumentariam em número e dariam início ao processo de coalescência, formando canais interconectados, resultando em uma microestrutura do tipo bicontínua, de condutividade intermediária. Possuindo um conteúdo aquoso ainda maior, a sua microestrutura provavelmente seria de ME do tipo O/A, apresentando

elevada condutividade elétrica já que a água não estaria isolada em gotículas e pertenceria a fase externa da formulação.

Os valores de condutividade obtidos tanto pela ME₁-branca quanto pela ME₁-PTX foram considerados baixos e, dessa forma, sugestivos de um sistema que possua microestrutura do tipo A/O, corroborando os resultados obtidos nos ensaios de análise térmica que sugeriram a mesma estrutura.

5.9.3 Índice de Refração

A Farmacopeia Brasileira (2010) relata que o índice de refração (n) de uma substância é uma constante física definida como a relação entre a velocidade da luz no vácuo e sua velocidade no interior da substância. Seu princípio básico diz que quando um raio de luz monocromática passa de um meio transparente para outro de densidade óptica diferente, este é refletido ou refratado, exceto quando incide perpendicularmente à superfície de contato entre as duas substâncias. É um parâmetro que depende da natureza do meio, do raio de luz e da temperatura (KOROLKOVAS, 1988). Na prática, a relação é feita utilizando a refração com referência ao ar e a substância investigada e não com referência ao vácuo.

Diante disso, resolveu-se investigar, durante alguns dias, esta variável utilizando como referência o ar e ME. Os valores do n encontrados para a ME₁-branca e a ME₁-PTX foram considerados como constantes e únicos, mantendo-se aproximados, $1,452 \pm 0,001$ para a branca e $1,453 \pm 0,001$ para a incorporada.

Substâncias consideradas isotrópicas possuem índice de refração constante e único em determinado comprimento de onda, temperatura e pressão, pois o raio de luz se propaga pela substância com a mesma velocidade em todas as direções consideradas. Dessa maneira, este parâmetro é útil não só na identificação de uma substância, mas para detectar a presença de impurezas e de natureza anisotrópica. As microemulsões devem apresentar apenas um único índice de refração e nenhuma restrição no plano de vibração de luz que passa através deles, mantendo as mesmas propriedades ópticas em todos os sentidos.

Diante dessa análise pôde-se reafirmar a natureza isotrópica da formulação proposta, já evidenciada na análise de microscopia de luz polarizada, pois a constante física testada mostrou-se única e constante em todas os ensaios realizados. Deve ressaltar que a adição do fármaco não modificou o n do sistema

uma vez que não foram evidenciadas diferenças abruptas entre os valores das amostras com e sem a PTX.

5.9.4 Tamanho de gotícula

A análise do tamanho de gotícula de um sistema coloidal é um fator essencial tendo em vista que ela pode indicar prováveis aspectos de taxa e extensão da liberação e absorção do fármaco ao verificar a presença ou não do seu tamanho nanométrico (WEI et al., 2012). A técnica para a determinação do diâmetro das ME seria o espalhamento dinâmico de luz, onde utiliza-se a flutuação da intensidade da luz espalhada pelas gotículas em suspensão, agindo em movimento Browniano, para obter-se a distribuição hidrodinâmica do seu tamanho (XU, 2008).

Para a ME₁-branca, o tamanho médio das gotículas foi de $42,23 \pm 4,02$ nm e para a ME₁-PTX obteve-se valor de $69,4 \pm 3,26$ nm. O aumento no diâmetro das gotículas da ME₁-PTX quando comparada com a formulação branca indica que houve a incorporação do fármaco na ME e que, provavelmente, a PTX esteja de alguma maneira interagindo com a camada de tensoativos, não ficando restrita apenas ao confinamento na gotícula aquosa.

Deve-se destacar, portanto, que o diâmetro médio das gotículas das duas amostras diferentes (ME₁-branca e ME₁-PTX) foi menor que 100 nm, resultado desejável, pois está dentro da faixa de tamanho proposta para os sistemas microemulsionados (10-100 nm) segundo a literatura (KIM et al., 2008; DJEKIC et al., 2012). Além disso, sistemas que possuam diâmetro de gotículas inferiores a 200nm são considerados viáveis para a aplicação por via tópica (LUNDBERG; MORTIMER, 1996).

Estando caracterizada físico-quimicamente, foi necessário verificar a capacidade que a ME₁ possuía de incorporar quantitativa e corretamente a PTX. Para tanto, foi necessário desenvolver um método analítico para utilização nos ensaios de doseamento e eficiência de encapsulação do fármaco.

5.10 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DOSEAMENTO DA PENTOXIFILINA NO SISTEMA MICROEMULSIONADO

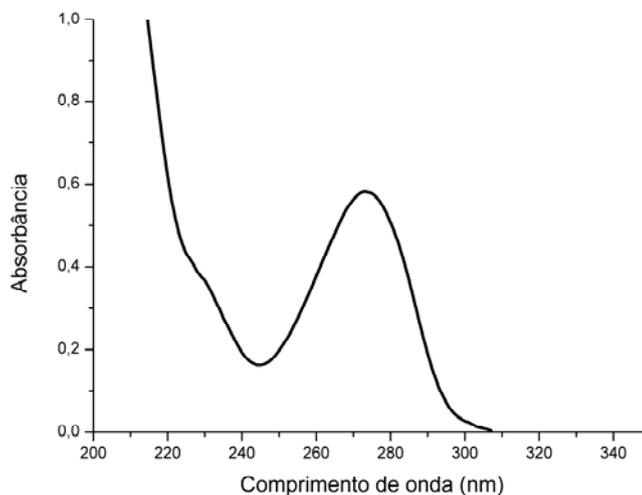
Aspectos como comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade estão sendo cada vez mais reconhecidos e exigidos para demonstrar a qualidade de medições químicas. Dados analíticos que forem considerados não confiáveis podem levar a decisões errôneas e prejuízos para o ensaio a ser desenvolvido. Para garantir que o método analítico a ser utilizado produza informações verídicas sobre a amostra, é preciso que ele passe por uma avaliação denominada de validação (RIBANI et al., 2004).

Segundo a Agência Nacional Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação é a sequência de processos que deve garantir, através de estudos experimentais, que o método desenvolvido atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade dos resultados. Este órgão regulador disponibilizou em 2003 um guia para o procedimento de validação de métodos analíticos, sendo este a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

Os estudos de validação devem ser representativos e os parâmetros avaliados devem ser baseados na intenção do uso do método (RIBANI et al., 2004). Para métodos analíticos que envolvam a quantificação de fármacos em produtos farmacêuticos os parâmetros seletividade, linearidade e faixa de aplicação (intervalo), precisão, exatidão e robustez devem ser cuidadosamente avaliados (BRASIL, 2003).

O início do desenvolvimento do método se deu com a determinação do espectro de absorção da PTX, no intervalo de 200 a 350 nm (Figura 14), a fim de confirmar o pico máximo de absorbância desse fármaco em 273 nm, já verificado por Honda e colaboradores (2001). O gráfico gerado pela solução de PTX em etanol se mostrou bem semelhante ao gráfico obtido pelos autores já citados, confirmando que o pico de absorvidade máxima se dá em 273 nm.

Figura 14 - Varredura espectrofotométrica da solução de PTX (16 µg/mL) na faixa de comprimento de onda de 200 a 350 nm.



Fonte: Próprio autor.

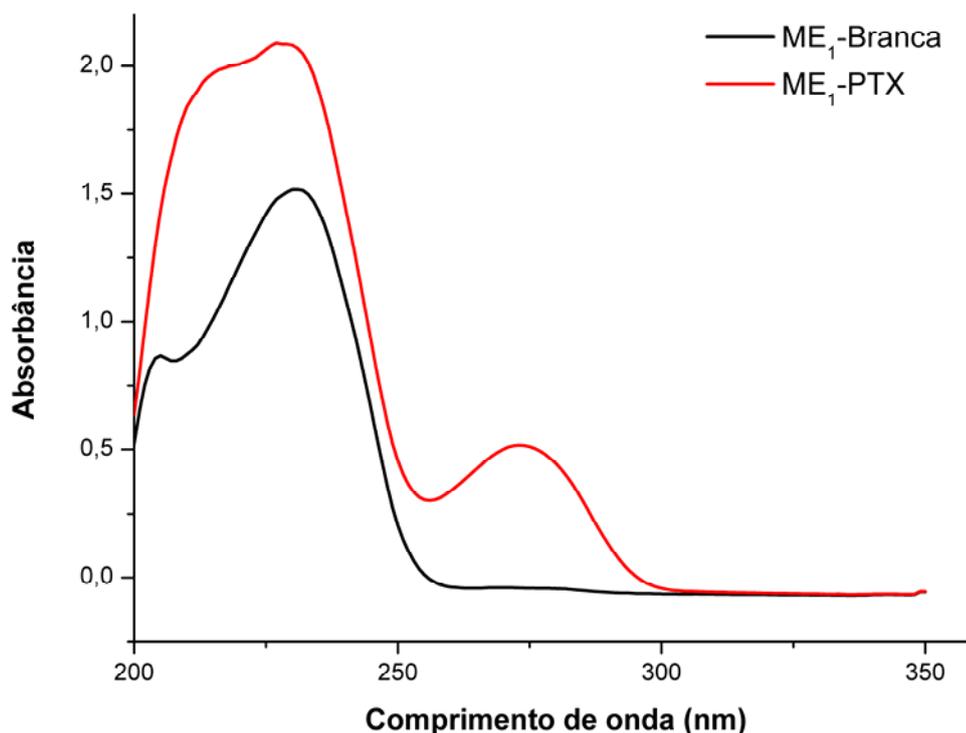
Legenda: Espectro de absorção da pentoxifilina a 16 µg/mL em etanol PA.

Descoberto o comprimento de onda que possui o maior pico de absorção da PTX, prosseguiu-se determinando os parâmetros presentes na resolução da ANVISA. A seletividade teve como objetivo verificar o grau de interferência de espécies como excipientes, impurezas, produtos de degradação ou compostos de propriedades químicas semelhantes ao analito, de forma que estes outros produtos não pudessem ser confundidos com o composto de interesse e este pudesse ser visualizado de forma clara, garantindo que o pico de resposta fosse exclusivamente seu (VESSMAN et al., 2001).

Para o método espectrofotométrico, este parâmetro foi determinado comparando-se as curvas espectrais obtidas através das leituras de diluições individuais de cada sistema, comparando o comportamento da matriz isenta do fármaco de interesse (ME₁ - branca), e a matriz contendo o fármaco (ME₁- PTX).

Pôde-se observar que na ME₁-PTX houve a presença do pico de absorção em 273 nm, característico da presença do fármaco na formulação o que não ocorreu na curva da ME₁-branca (Figura 15). Dessa forma, a metodologia analítica proposta foi considerada seletiva, pois foi constatado que os componentes da formulação não apresentaram perspectivas de influir na detecção do fármaco no ponto específico de 273 nm.

Figura 15 - Varredura espectrofotométrica da ME1 na faixa de comprimento de onda de 200 a 350nm.



Fonte: Próprio autor.

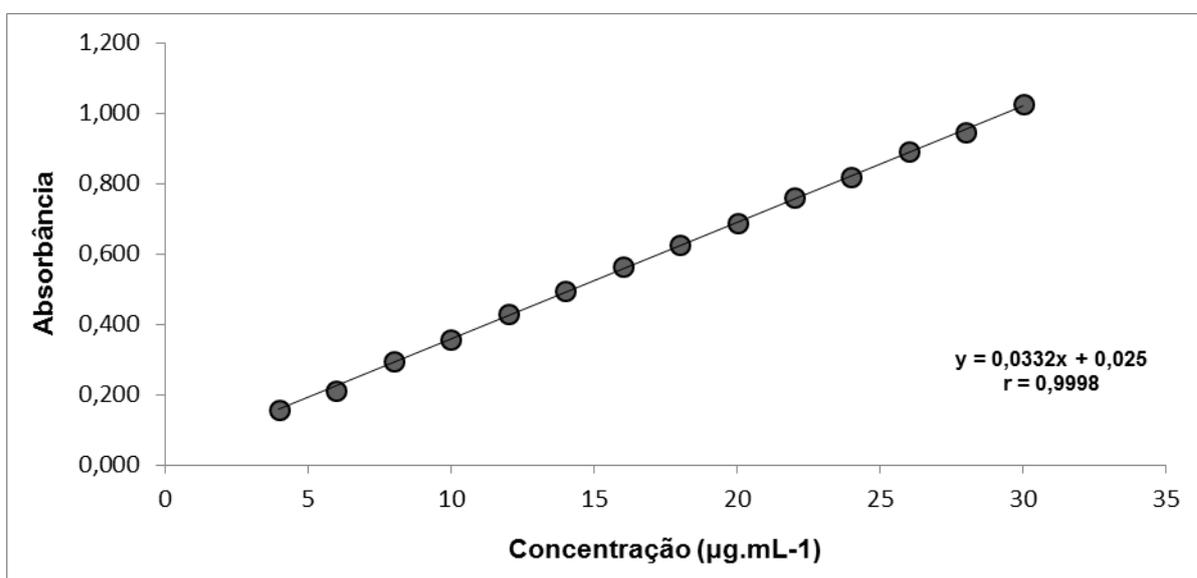
Espectro de absorção da ME₁-branca em etanol PA (linha preta) e espectro de absorção da ME₁-PTX em etanol PA (linha vermelha).

A linearidade é um parâmetro bastante relevante que se refere à capacidade que um método analítico tem em fornecer resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma faixa de aplicação específica (BRASIL, 2003). A relação matemática existente entre os sinais de absorbância e a concentração deve ser expressa como uma equação de reta conhecida como curva analítica (BARROS NETO et al., 2002), que pode ser calculada utilizando o modelo matemático da regressão linear, permitindo que haja o cálculo dos coeficientes de regressão (a e b) e também do coeficiente de correlação (r).

Este último parâmetro fornece a avaliação da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão entre os pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004). Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003). A ANVISA recomenda um r igual ou superior a 0,99 (BRASIL, 2003).

O método espectrofotométrico desenvolvido apresentou linearidade em uma faixa de 4 a 30 µg/mL. A curva analítica desenvolvida (Figura 16) possuiu a equação da reta $y = 0,0332x + 0,025$, obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9998. Percebe-se que a reta mostra a proporcionalidade direta entre a absorbância e as diferentes concentrações, estando o r (0,9998) dentro do critério exigido pela ANVISA.

Figura 16 – Curva analítica obtida a partir de soluções de PTX nas concentrações de 4 a 30 µg/mL para determinação do parâmetro linearidade.



Fonte: Próprio autor.

A precisão é outra etapa necessária para a validação do método analítico e avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra sob condições definidas. Este parâmetro pode ser avaliado através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) também conhecido como coeficiente de variação (CV) (RIBANI et al., 2004).

A precisão foi avaliada em relação a repetibilidade, sendo esta a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (BRASIL, 2003), usando sextuplicata de soluções de PTX na concentração de 16 µg/mL (ponto médio da curva analítica). Também foi avaliada quanto a precisão intermediária (precisão intercorrida), que consiste na concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003) e para este parâmetro foi

utilizada a sextuplicata da amostra na mesma concentração da repetibilidade, porém sendo feitas por analistas diferentes. Este tipo de precisão é mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, pois verifica que no mesmo ambiente o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI, 2004).

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos durante a determinação do parâmetro precisão onde pôde-se observar as medidas das concentrações obtidas de amostragens múltiplas realizadas e as respectivas precisões. Percebeu-se então que, apesar de os dias de análise e os analistas serem distintos, a precisão encontrou-se dentro do limite estabelecido pela ANVISA (< 5%), comprovando que o método analítico em questão foi preciso.

Tabela 2 - Determinação do parâmetro precisão repetibilidade e precisão intercorrida (n=6) para validação do método espectrofotométrico.

Analistas	Dia	Concentração teórica ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentração real ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) Média \pm DP	Precisão (%)
Analista 1	1	16,0	16,3 \pm 0,007	1,183
	2	16,0	16,1 \pm 0,004	0,697
Analista 2	1	16,0	15,5 \pm 0,003	0,563
	2	16,0	15,8 \pm 0,002	0,395

A exatidão corresponde a proximidade dos resultados individuais obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência aceito como verdadeiro (teórico) (BRASIL, 2003). A Tabela 3 mostra o valor da exatidão determinada a partir da leitura de 9 amostras em 3 níveis de concentração diferentes, sendo a triplicata de concentrações no nível baixo (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), no nível médio (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e no nível alto (24 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabela 3 - Determinação do parâmetro exatidão (n=3) para validação do método espectrofotométrico.

Nível	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Média \pm DP	CV(%)	Exatidão (%)
Baixo	8,0	8,1 \pm 0,009	2,958	102,8
Médio	16,0	16,3 \pm 0,008	1,485	101,6
Alto	24,0	23,9 \pm 0,002	0,282	99,6

Onde: DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação.

A partir do cálculo da exatidão, percebeu-se a proximidade entre as concentrações teóricas e as concentrações que foram obtidas por meio do método utilizado, indicando que este foi considerado exato.

O último parâmetro avaliado foi a robustez, sendo esta a medida da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal do método (BRASIL, 2003). As modificações devem ser realizadas para simular as alterações que ocorrem no método quando este é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI et al., 2004). A Tabela 4 mostra a determinação da robustez utilizando uma solução do fármaco na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ analisada a partir das alterações realizadas como as mudanças no solvente (etanol e água) e no modelo do equipamento espectrofotométrico (UV Mini 1240, Shimadzu e Lambda 750, PerkinElmer, Brasil).

Tabela 4 - Determinação do parâmetro robustez (n=3) para validação do método espectrofotométrico.

Modificação	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Média \pm DP	Precisão (%)	Exatidão (%)	
Solvente	Água	16,0	16,2 \pm 0,01	1,747	100,9
	Etanol	16,0	16,3 \pm 0,008	1,485	101,6
Equipamento	Espectro 1	16,0	16,3 \pm 0,008	1,485	101,6
	Espectro 2	16,0	16,4 \pm 0,008	1,517	102,3

Como observado nos dados da tabela, o método espectrofotométrico desenvolvido possuiu uma robustez intrínseca, pois analisando as amostras na concentração de 16 µg/mL em diferentes condições (solvente e modelo do equipamento), os resultados mantiveram-se dentro das especificações exigidas pela RE n° 899/03. Dessa forma, este método pode ser utilizado em outros laboratórios e ser feito por outros analistas e resultará em reprodutibilidade dos resultados obtidos na validação.

5.11 DOSEAMENTO DA PENTOXIFILINA

A quantificação da PTX incorporada na ME foi feita através da leitura em espectrofotômetro (273 nm) de diluições da ME-PTX em etanol. A média da absorbância obtida pela triplicata foi utilizada para gerar o valor médio da concentração real de fármaco contida na formulação através do uso da equação da reta obtida no parâmetro linearidade. A Tabela 5 mostra o valor da absorbância média utilizado para o cálculo do doseamento.

Tabela 5 - Determinação do doseamento da PTX no sistema microemulsionado.

Amostra	Absorbância Média	Desvio Padrão	Coefic. Variação (%)	Doseamento PTX (mg/mL)
ME-PTX	0,559	0,009	1,622	10,06

Como observado, a concentração do fármaco na ME determinada através das leituras das absorbâncias no espectrofotômetro (10,06 mg/mL) foi muito próxima à concentração de PTX real incorporada ao sistema (10,00 mg/mL – 1%), demonstrando que o método analítico utilizando espectrofotometria UV/Vis desenvolvido foi sensível e eficaz para o doseamento da concentração real do fármaco incorporado previamente na formulação.

5.12 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE)

Tendo visto a capacidade do método analítico desenvolvido em realizar o doseamento da PTX, resolveu-se investigar quanto do fármaco doseado conseguiu realmente ser incorporado na fase interna do sistema proposto. A eficiência de encapsulação é outro ensaio de caracterização que pode ser realizado a partir de vários métodos, que dependerá extensivamente do modo de preparo da formulação e das propriedades físico-químicas do fármaco avaliado (DAMASCENO, 2011).

A metodologia proposta para a determinação deste parâmetro foi baseada na comparação entre os valores de absorvância da triplicata das soluções de ME₁-PTX antes e após o processo de centrifugação. Neste ensaio de maneira geral, a centrifugação auxiliou, caso houvesse, na separação do fármaco que se encontrava incorporado na fase interna daquele que se encontrava disperso na fase externa, sendo este último o responsável pela formação de um possível precipitado.

No entanto, após o processo de centrifugação percebeu-se que não houve a formação de um precipitado e a formulação encontrava-se límpida, com as mesmas características organolépticas e sem separação de fases. Realizou-se o doseamento da PTX no sobrenadante e as absorvâncias pós-centrifugação foram determinadas. Os dados para o cálculo da eficiência de encapsulação estão na Tabela 6, sendo esta calculada através da Equação 3.

Tabela 6 - Determinação da eficiência de encapsulação da PTX no sistema microemulsionado.

Amostra	Absorvância Média Pós-centrifugação	Desvio Padrão	Coefic. Variação (%)	EE PTX (%)
ME-PTX	0,521	0,004	0,775	93,26

Legenda: EE= eficiência de encapsulação.

Corroborando a ideia de Damasceno e colaboradores (2011), a eficiência de encapsulação foi adequadamente alcançada quando incorporou-se a PTX durante a formação da microemulsão proposta, tendo em vista que valores acima de 80% são

considerados significativos. Portanto, considera-se que a incorporação da PTX a fase interna do sistema foi satisfatória.

Um outro ensaio realizado para a confirmação da capacidade de encapsulação da PTX, bem como para a análise de novos aspectos da formulação foi o teste de difração de raios X.

5.13 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Dentre as várias técnicas de caracterização de materiais, a técnica de difração de raios X (DRX) é a mais indicada para determinar o grau de cristalinidade ou amorficidade de uma amostra. Esta função só é possível porque na maior parte dos sólidos, os átomos se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X (ALBERS et al., 2002).

Ao incidir um feixe de raios X em uma amostra, o mesmo interage com os átomos presentes, originando o fenômeno de difração, ocorrendo segundo a Lei de Bragg (Equação 9), que estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram (característicos para cada fase cristalina):

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (9)$$

Sendo n = número inteiro, λ = comprimento de onda dos raios X incidentes, d = distância interplanar e θ : ângulo de difração.

A relação acima estabelece que para um determinado comprimento de onda, o raio refletido emergirá apenas nos ângulos para os quais a relação é satisfeita. Esta técnica possui várias vantagens para a caracterização de amostras, pois trata-se de um método simples, rápido e confiável (já que o perfil de difração obtido é característico para cada fase cristalina), possibilitando análises de materiais compostos por uma mistura de fases e a análise quantitativa destas fases cristalinas (ALBERS et al., 2002).

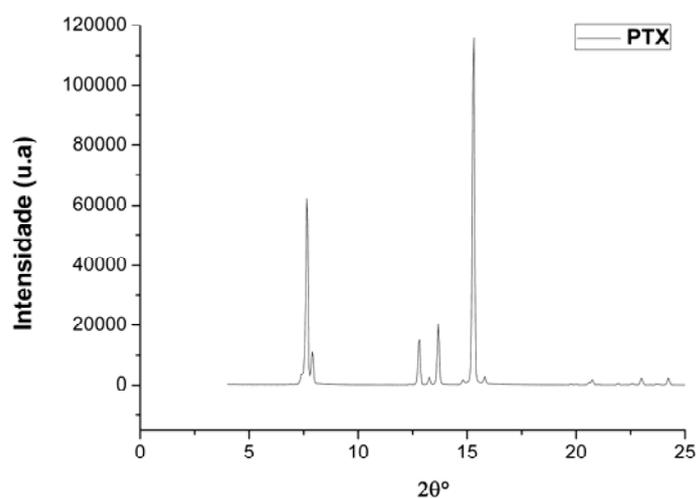
Para a identificação da cristalinidade/amorficidade, testou-se os padrões de difração para o fármaco PTX e para as ME₁ (branca e incorporada), fazendo comparações entre todos esses padrões. Além disso, o DRX pode fornecer

informações sobre a eficiência de encapsulação da PTX na formulação, sugerindo sobre as contribuições relativas do fármaco na amorficidade do sistema.

Os dados cristalográficos da PTX são mostrados na Figura 17. A PTX apresentou picos mais intensos em $7,63^\circ$ e $15,31^\circ$. A presença no difratograma de picos bem definidos confirma a cristalinidade de sua estrutura. A análise da ME₁-branca gerou o difratograma apresentado na figura 18, onde houve a confirmação do caráter amorfo deste tipo de sistema, visto que não existem picos característicos de uma estrutura cristalina e sim a presença de halos alargados e pouco intensos, representativos de estruturas amorfas.

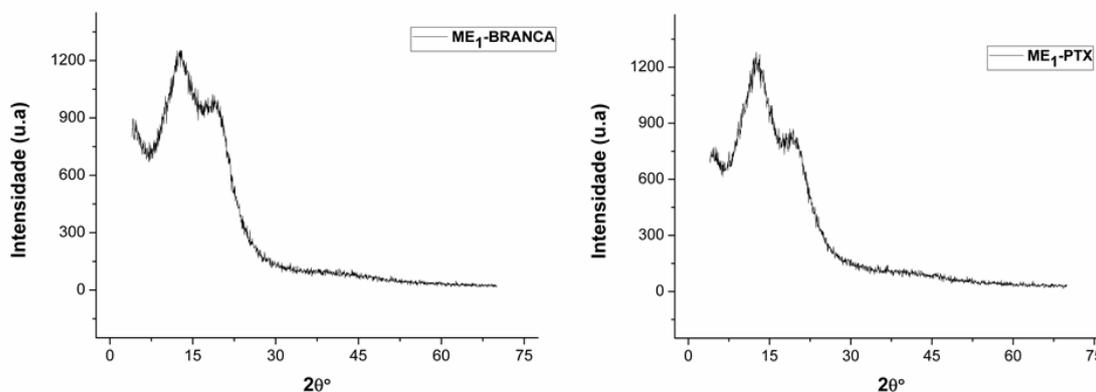
O intuito de analisar a ME₁-PTX por DRX (Figura 18) foi verificar a influência do fármaco no padrão de difração e seu estado físico nesta formulação e foi visto que, mesmo após a incorporação do fármaco, a amostra continuou com seu perfil amorfo, apresentando halos largos e de baixa intensidade. No entanto, embora a amostra continue amorfa, a presença da PTX foi capaz de diminuir a amorficidade desta formulação quando comparada a ME₁-branca.

Figura 17- Difratograma da PTX pura.



Fonte: Próprio autor.

Figura 18 - Difratogramas da ME1-branca e da ME1-PTX.



Fonte: Próprio autor.

Yi e colaboradores (2008) realizaram um trabalho utilizando a nimodipina. Quando este fármaco foi incorporado a sistemas de liberação de fármacos auto-microemulsionáveis (SMEDDS), ocorreu uma transição polimórfica de seu estado cristalino para o amorfo ou para uma fase cristalina desorganizada, devido a sua dispersão molecular no sistema, fazendo com que houvesse a perda de seus picos cristalinos característicos no difratograma dos SMEDDS e colaborando para que esta formulação permanecesse amorfa.

Diante disso, ocorreram os mesmos fenômenos quando a PTX esteve presente na formulação. A perda significativa dos seus picos intensos característicos foi devida, provavelmente, ao fato de ter ocorrido uma dispersão molecular do fármaco nos componentes da ME e com isso houve uma transição polimórfica da PTX do estado cristalino para o amorfo ou para uma fase cristalina desorganizada. Associado a este fato, pode-se inferir então que houve uma incorporação adequada da PTX ao sistema microemulsionado, pois não existiu a presença de seus picos intensos e alongados na análise da ME₁-PTX, que poderiam aparecer caso o fármaco não interagisse com o sistema e possuísse ainda suas características cristalinas, corroborando com os resultados satisfatórios da eficiência de encapsulação.

Mesmo tendo interagido suficientemente com o sistema microemulsionado, a PTX deve ser capaz de deixá-lo para que possa permear na pele e realizar sua função anti-inflamatória. Para avaliar se o fármaco é capaz de sair da ME e através

de qual mecanismo esse fenômeno ocorre optou-se por realizar ensaios de liberação *in vitro* com membranas artificiais.

5.14 LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA PENTOXIFILINA DO SISTEMA MICROEMULSIONADO

A liberação de um fármaco pode ser definida como o processo pelo qual esta substância é liberada de sua forma farmacêutica e, desta maneira, torna-se disponível para ser absorvida pelo organismo (CHOWDARY et al., 1987). Tratando-se de fármacos para uso tópico, a liberação a partir de seu veículo é prerrogativa para a sua penetração na pele e, só desta forma, estará disponível na superfície epidérmica para que haja difusão através do estrato córneo. A solubilidade do fármaco no veículo e a sua atividade termodinâmica são as principais influências neste processo, no entanto, estando disponível para a permeação na pele, a liberação irá depender da capacidade do fármaco em atravessar o estrato córneo, que pode ser modulada por promotores de permeação, pelo tamanho da molécula e sua lipofilicidade (BEMVINDO, 2006).

Dessa maneira, o ensaio de liberação *in vitro* de formas farmacêuticas de uso tópico tem como objetivo avaliar a capacidade do veículo em liberar o fármaco inserido neste, além disso, possuindo esta capacidade, também é investigado a que velocidade ocorre a liberação do fármaco, refletindo o efeito combinado de vários parâmetros físico-químicos do sistema (SILVA et al., 2010). O modelo de difusão através de células de Franz tem sido o mais empregado para a obtenção de perfis de liberação de formas farmacêuticas semissólidas (PRAÇA, 2010) e foi utilizado nesse trabalho para a obtenção do perfil de liberação da ME₁-PTX.

Uma solução de PTX 1% em tampão fosfato pH 7,4 (substância ativa livre) também foi utilizada para obter um perfil de liberação, sendo usada no intuito de verificar o comportamento da PTX sob as condições do ensaio, observando seu desempenho diante da presença de uma membrana de acetato de celulose, de uma temperatura e agitação controlada e do aparato utilizado em si. Não existe até o momento uma forma farmacêutica semissólida de uso tópico contendo a PTX, que seria ideal a título de comparação com a ME₁-PTX.

Na Tabela 7 encontram-se as quantidades de PTX liberada no meio receptor a partir de uma solução em tampão fosfato pH 7,4 e da formulação ME₁-PTX, bem

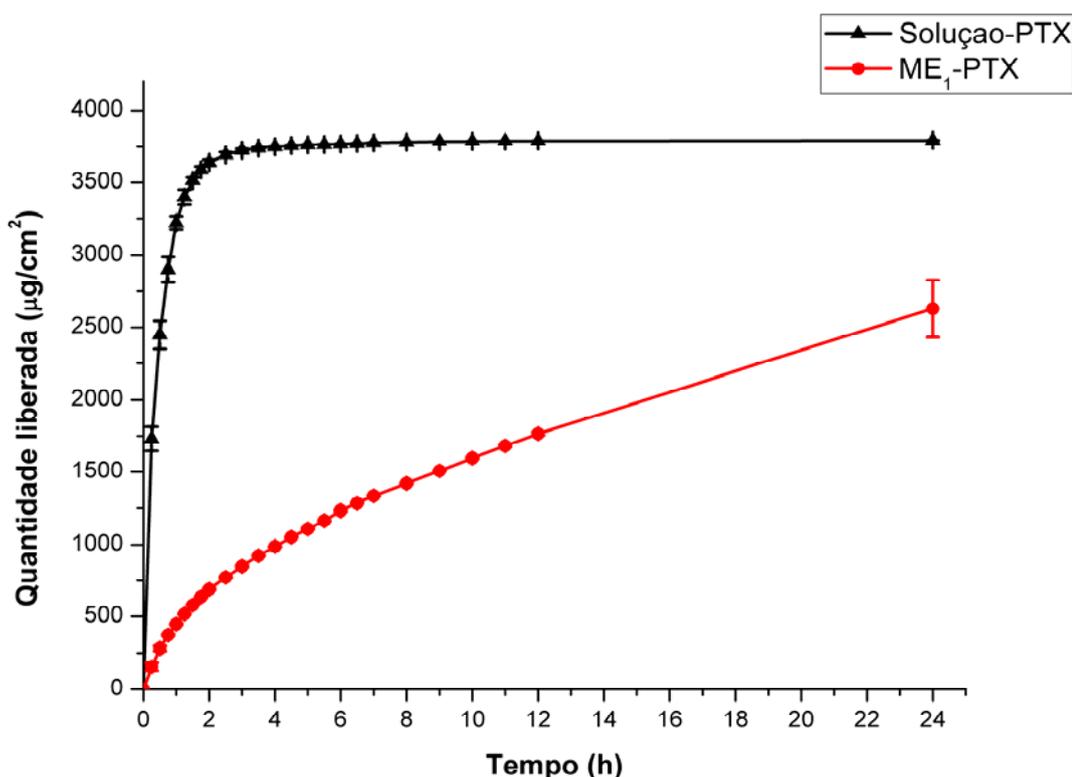
como os percentuais da liberação, sendo o ensaio realizado em sextuplicata. Observou-se que, quando livre em solução, a PTX atravessa a barreira de acetato de celulose mais rapidamente e, em cerca de 105 min (1,75h), 90,23% do fármaco já foi liberado para o compartimento receptor. Como esperado, a ME proposta liberou mais lentamente a PTX ao longo do tempo, tendo em vista que o fármaco não encontrava-se livre e sim confinado nas gotículas revestidas pelos tensoativos.

Tabela 7 - Quantidades cumulativas liberadas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e percentual de liberação (%) da PTX em cada tempo no compartimento doador.

Tempo (h)	Quantidade de PTX liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP (% liberado)	
	Solução – PTX	ME ₁ -PTX
0,25	1729,74 \pm 84,50 (43,47%)	154,64 \pm 28,28 (3,89%)
0,5	2447,05 \pm 97,28 (61,49%)	280,91 \pm 17,53 (7,06%)
0,75	2900,41 \pm 87,80 (72,89%)	372,11 \pm 7,67 (9,36%)
1	3219,21 \pm 47,32 (80,90%)	447,66 \pm 5,15 (11,25%)
1,25	3398,74 \pm 52,60 (85,41%)	517,13 \pm 4,66 (13,00%)
1,5	3514,37 \pm 20,91 (88,32%)	578,87 \pm 4,20 (14,55%)
1,75	3590,37 \pm 23,25 (90,23%)	636,12 \pm 6,45 (15,99%)
2	3640,39 \pm 18,79 (91,48%)	689,00 \pm 6,77 (17,32%)
2,5	3693,85 \pm 18,36 (92,83%)	772,87 \pm 6,75 (19,43%)
3	3725,56 \pm 11,14 (93,62%)	849,77 \pm 6,13 (21,36%)
3,5	3741,04 \pm 6,89 (94,01%)	922,35 \pm 4,44 (23,18%)
4	3750,67 \pm 3,19 (94,25%)	987,51 \pm 3,15 (24,82%)
4,5	3758,77 \pm 2,21 (94,46%)	1052,28 \pm 4,00 (26,45%)
5	3762,83 \pm 1,21 (94,56%)	1109,46 \pm 4,14 (27,88%)
5,5	3766,04 \pm 0,72 (94,64%)	1165,82 \pm 5,05 (29,30%)
6	3769,06 \pm 0,86 (94,72%)	1233,19 \pm 5,72 (30,99%)
6,5	3773,10 \pm 0,98 (94,82%)	1282,81 \pm 3,05 (32,24%)
7	3777,67 \pm 1,40 (94,93%)	1333,20 \pm 4,77 (33,51%)
8	3782,26 \pm 1,05 (95,05%)	1420,21 \pm 4,88 (35,69%)
9	3785,33 \pm 0,68 (95,13%)	1507,28 \pm 4,90 (37,88%)
10	3787,37 \pm 0,84 (95,18%)	1595,37 \pm 5,78 (40,10%)
11	3788,74 \pm 0,44 (95,21%)	1680,79 \pm 8,58 (42,24%)
12	3790,72 \pm 0,69 (95,26%)	1765,65 \pm 11,10 (44,37%)
24	3794,28 \pm 1,34 (95,35%)	2628,97 \pm 198,60 (66,07%)

Os perfis de liberação da PTX podem ser observados na figura 19, que representa a quantidade liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo para cada uma das amostras utilizadas ao longo de 24 horas de ensaio. Graficamente observou-se a rápida liberação da PTX da solução em tampão até o momento em que se chega ao platô e este é mantido até a última hora. Em relação a liberação do fármaco do veículo microemulsionado, verificou-se que sua liberação foi contínua-crescente até 24h, não havendo a formação de platô.

Figura 19 - Perfil de liberação da PTX ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) a partir das formulações envolvidas no estudo.



Fonte: Próprio autor.

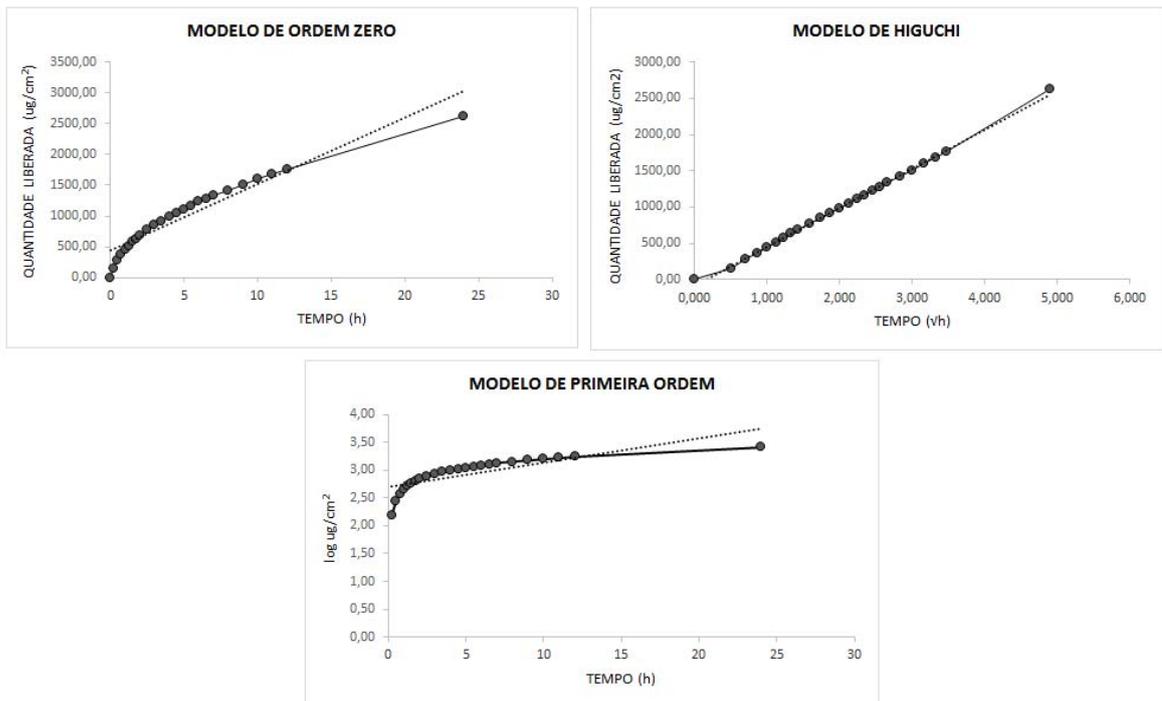
Legenda: Solução de PTX em tampão fosfato pH 7,4 (linha preta), PTX incorporada ao sistema microemulsionado ME₁ (linha vermelha).

Após obter os valores da PTX liberada em relação à área difusional, a interpretação quantitativa desses dados foi realizada para a obtenção do modelo cinético que melhor relacionasse o mecanismo de liberação do fármaco em função da característica da formulação proposta (ME). Análises de regressão linear para os dados de liberação da PTX apenas na ME, foram utilizadas para determinar a ordem

de reação que refletisse o melhor modelo cinético. Geralmente, a modelagem matemática para perfis de liberação de fármacos a partir de microemulsões é pouco conhecida (GRASSI et al., 2000), mas os principais modelos existentes foram aplicados para os resultados da liberação *in vitro*, sendo estes de ordem zero, pseudo primeira ordem ou Higuchi, e primeira ordem.

A Figura 20 mostra o gráfico resultante da aplicação desses modelos cinéticos aos dados obtidos pela liberação *in vitro* da PTX incorporada ao sistema microemulsionado. As equações da reta e os coeficientes de correlação linear (r) obtidos após o mecanismo de regressão linear de todos os modelos foram apresentados na Tabela 8. O modelo que possuísse o maior valor de r foi o selecionado como a ordem de liberação para dar continuidade ao estudo.

Figura 20 – Perfil dos modelos cinéticos testados para a ME₁-PTX em tampão fosfato pH 7,4.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Os modelos cinéticos testados foram de Ordem Zero ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{tempo}$), Higuchi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{raiz do tempo}$) e Primeira Ordem ($\log \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{tempo}$).

Tabela 8 - Determinação da ordem de liberação da PTX do sistema microemulsionado utilizando-se como parâmetro o coeficiente de correlação (r).

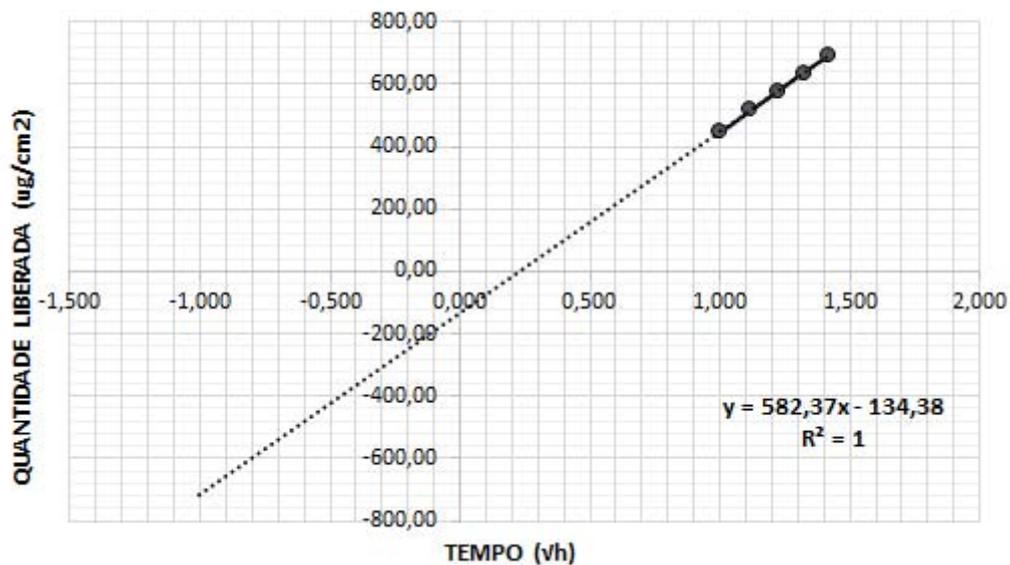
Amostra	Modelos cinéticos	Equações da reta	Coeficiente de correlação linear (r)	Ordem de liberação escolhida
	Ordem Zero	$y = 107,82x + 436,52$	0,9567	
ME-PTX	Higuchi	$y = 537,92x + 84,118$	0,9989	Higuchi
	Primeira Ordem	$y = 0,0432x + 2,7086$	0,8023	

A liberação da PTX da ME₁ seguiu modelo cinético de Higuchi, como visto na Tabela 8 pelo maior valor de r. De acordo com Higuchi, a observação de uma relação linear entre a quantidade de fármaco liberada e a \sqrt{t} ocorre quando a difusão deste através da matriz do semissólido constitui o passo limitante do processo e, nestas circunstâncias, qualquer outro parâmetro (ex. meio receptor, membrana) não tem uma ação influente ou significativa no processo (TOSCANO et al., 2001). Portanto, os constituintes da ME, bem como a microestrutura formulada desempenharam um papel significativo no processo de liberação da PTX para o compartimento receptor a partir da membrana selecionada, fazendo com que houvesse ao longo do tempo o desenvolvimento de um perfil de liberação modificada.

Esse modelo, baseado nas leis de Fick, descreve que a quantidade de fármaco a ser liberada pelo veículo é diretamente proporcional à raiz quadrada do tempo, sugerindo que a liberação seja comandada por um mecanismo de difusão, onde a taxa de transferência da substância por unidade de área seria proporcional ao gradiente de concentração entre os dois lados da camada difusional (AUTON, 2005; DJEKIC et al., 2012), ou seja, é a diferença inicial da concentração do fármaco entre os lados da membrana difusional que irá induzir a passagem do fármaco através desta. Esse processo tenderá a diminuir a concentração do fármaco na fase interna da ME, alterando dessa maneira, o equilíbrio particional do mesmo, fazendo com que haja a conseqüente transferência do fármaco para a fase externa, seguida do rompimento da micela formada pelos tensoativos, deixando-os livre para agir como promotores de permeação (SIROTTI et al., 2002).

Observado a ordem de reação da liberação da PTX do sistema microemulsionado, houve a determinação matemática da velocidade de liberação do fármaco (fluxo – J), do *lag time* e do coeficiente de liberação (K_r) baseado no modelo de cinética obedecido para a amostra, conforme demonstrado na Figura 22 e na Tabela 9.

Figura 21 –Extrapolação linear para cálculo do *lag time* da liberação da PTX incorporada no sistema microemulsionado



Próprio autor.

Legenda: Linha de extrapolação da PTX incorporada ao sistema microemulsionado ME₁. A linha cheia representa a regressão linear dos 5 pontos selecionados a partir de 60 minutos e a linha tracejada representa a extrapolação até o eixo x.

A boa linearidade observada para os pontos selecionados da curva da ME₁-PTX foi confirmada pelo coeficiente de correlação linear igual a 1, sendo a garantia de que a taxa de liberação tendeu a ser constante a partir dos 60 minutos.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos obtidos a partir da liberação *in vitro* da PTX incorporada a ME.

Parâmetros cinéticos	ME ₁ -PTX
Quantidade liberada após 24h ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	2628,97 \pm 198,60
% Liberação final	66,07%
Modelo cinético	Higuchi
Fluxo - J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \sqrt{\text{h}}$)	582,37
Lag time (min)	3,18
Coefficiente de liberação (K_r)($\text{mg}/\text{cm}^2 \sqrt{\text{h}}$).	58,23

Os resultados obtidos pela ME₁-PTX merecem destaque. O valor de fluxo obtido pelo fármaco contido no veículo microemulsionado foi considerado satisfatório para estudos *in vitro*. O *lag time* para a ME₁ foi considerado baixo, levando pouco tempo para alcançar uma velocidade constante de liberação e, o K_r demonstrou que em cada raiz de tempo, 58,23 mg de PTX foi capaz de ser liberada em 1 cm^2 da célula, sendo considerado também um resultado satisfatório.

Apesar de o ensaio de liberação *in vitro* ser apenas um indicativo de desempenho da ME₁, ele foi considerado satisfatório, indispensável e esclarecedor para traçar o perfil de influência que os componentes da ME, bem como a maneira que esta foi estruturada, são capazes de influenciar na liberação da PTX em membranas artificiais, agindo como um passo limitante. Este ensaio não garante maior disponibilidade de fármaco para a superfície epidérmica, no entanto, os valores de fluxo, *lag time* e de K_r obtidos pela ME₁-PTX foram considerados promissores para dar continuidade aos estudos de permeação *in vitro*.

5.15 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ME₁-PTX UTILIZANDO O MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

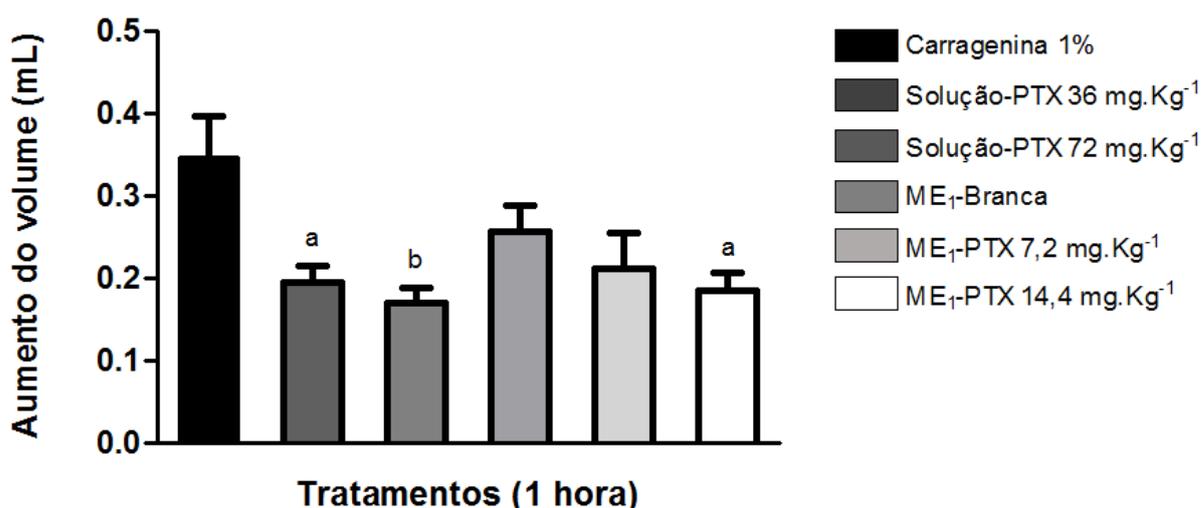
A atividade anti-inflamatória de soluções de PTX em modelo de inflamação aguda induzida por carragenina foi avaliada por Abdel-Salam e colaboradores (2003). O efeito sistêmico desse fármaco foi verificado após a administração intraperitoneal de soluções de PTX nas doses de 36 e 72 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ em ratos, que

correspondem as doses normalmente utilizadas para o tratamento de desordens circulatórias em humanos. No intuito de demonstrar reprodutibilidade dos efeitos alcançados por estes autores e proporcionar uma comparação entre os ensaios com formulações diferentes, optou-se por realizar o modelo de edema de pata induzido por carragenina para testar a atividade anti-inflamatória da PTX que foi incorporada a um sistema microemulsionado. Como substância de referência escolheu-se as soluções de PTX e como substância teste a formulação ME₁-PTX nas doses tópicas calculadas a partir da Equação 8, resultando em aplicações de 7,2 e 14,4 mg.kg⁻¹ posteriormente à conversão.

A injeção subplantar de carragenina provocou um processo inflamatório, perceptível através dos fenômenos de inchaço e do eritema, apresentando um aumento considerado tempo-dependente em relação ao volume da pata, onde o máximo de edema alcançado foi em 4 horas após a injeção.

A Figura 22 mostra o efeito de todos os tratamentos utilizados uma hora após a indução do edema de pata pela carragenina.

Figura 22 - Efeito anti-inflamatório da PTX em solução ou incorporada a sistemas microemulsionados após uma hora de indução do edema de pata pela carragenina.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Todos os tratamentos foram feitos 30 minutos antes da injeção da carragenina e o volume da pata foi medido uma hora após a indução. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. (a) - $p < 0,05$ e (b) - $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (Carragenina).

Na primeira hora após a injeção subplantar (Figura 23), o grupo carragenina obteve um aumento de volume na pata de $0,35 \pm 0,13$ mL. O grupo correspondente ao tratamento com a solução de PTX na dose de 36 mg.kg^{-1} já demonstrou um efeito inibitório sob o edema de pata nesta primeira hora, com percentual de inibição de 42,85% ($0,20 \pm 0,05$ mL), diferentemente do que ocorre com o observado por Abdel-Salam e colaboradores (2003), em que seu tratamento com PTX na mesma concentração só mostrou alguma atividade inibitória na segunda hora após a indução com carragenina.

O tratamento com solução de PTX na dose de 72 mg.kg^{-1} também demonstrou efeito anti-inflamatório, com 51,42% ($0,17 \pm 0,05$ mL) de inibição do edema. Esta concentração segue o mesmo perfil de outros trabalhos, apresentando efeito inibitório já na primeira hora, no entanto o percentual de inibição foi maior do que o já descrito na literatura (ABDEL-SALAM, 2003).

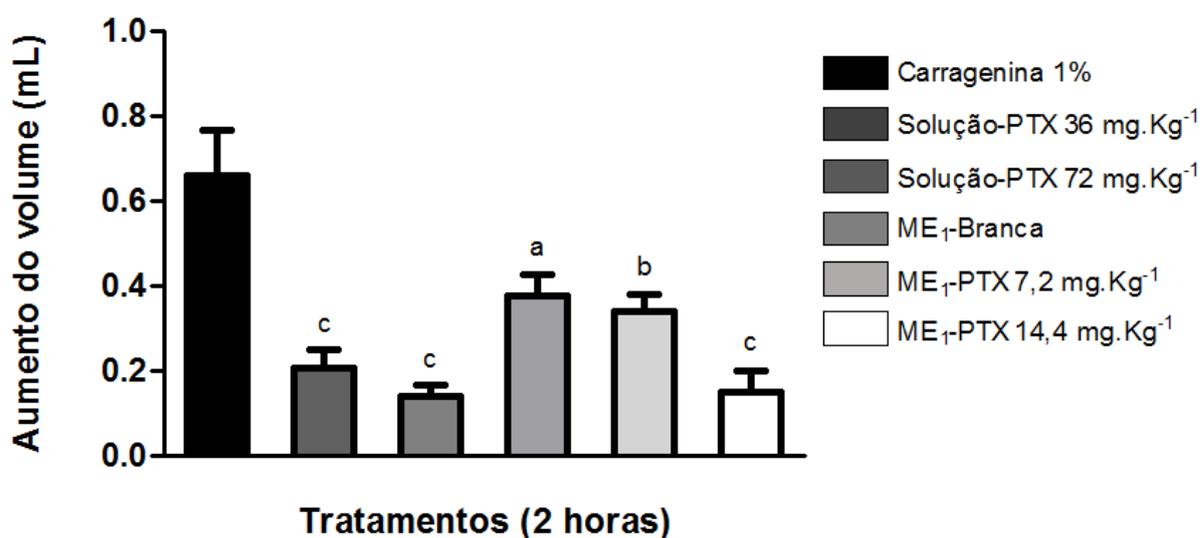
Os grupos tratados com ME₁-branca e com ME₁-PTX na dose de $7,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ não apresentaram efeito inibitório significativo sob o edema de pata na primeira hora após a indução por carragenina. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de o fármaco estar encapsulado em um nanocarreador, tendo a tendência de, portanto, ser liberado gradativamente e de modo mais lento, se comparado com o fármaco livre. Em ensaios de tratamentos ou períodos de incubação curtos, o acúmulo e o efeito farmacológico do princípio ativo nas camadas mais profundas da pele são ligeiramente adiados quando este encontra-se nanoencapsulado. Após tratamentos ou períodos de incubação mais longos, o transporte do fármaco é aprimorado para o ativo nanoencapsulado em comparação com o fármaco livre (GUTERRES et al., 2007).

O aumento na quantidade de fármaco no sistema microemulsionado, ou seja, o tratamento com ME₁-PTX na dose de $14,4 \text{ mg.kg}^{-1}$, fez com que o inchaço fosse reduzido em 45,71% ($0,19 \pm 0,05$ mL), sendo este valor de inibição próximo ao encontrado nos animais que foram tratados apenas com a solução de PTX na dose de 36 mg.kg^{-1} , não possuindo diferenças estatísticas significativas entre si, já demonstrando algumas vantagens do sistema microemulsionado contendo PTX em relação ao tratamento sistêmico.

A Figura 23 demonstra os resultados obtidos pelos tratamentos na segunda hora após a indução do edema pela carragenina. O grupo tratado apenas pelo agente flogístico obteve um aumento de volume na pata de $0,66 \pm 0,28$ mL. Os

tratamentos com as soluções de PTX nas doses de 36 e 72 mg.kg⁻¹ promoveram inibições significativas de 68,18% (0,21 ± 0,12 mL) e de 78,78% (0,14 ± 0,07 mL) respectivamente, ratificando a atividade anti-inflamatória na segunda hora vista na literatura (ABDEL-SALAM, 2003), possuindo no entanto, percentuais inibitórios maiores.

Figura 213 - Efeito anti-inflamatório da PTX em solução ou incorporada a sistemas microemulsionados após duas horas de indução do edema de pata pela carragenina.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Todos os tratamentos foram feitos 30 minutos antes da injeção da carragenina e o volume da pata foi medido duas horas após a indução. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. (a) - $p < 0,05$, (b) - $p < 0,01$ e (c) - $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (Carragenina).

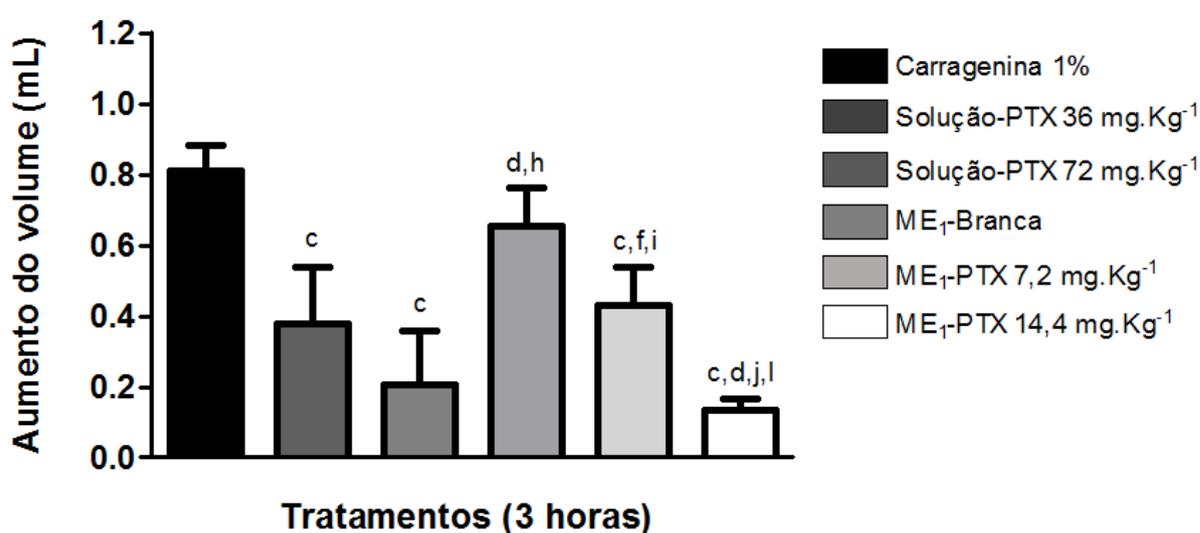
Nesta etapa do ensaio, o grupo tratado com ME₁-branca apresentou atividade inibitória significativa sobre o edema de pata, possuindo percentual de inibição de 42,42% (0,38 ± 0,14 mL). Tal atividade pode ser atribuída a presença da fase oleosa formada pelos TACC que possuem a capacidade de modular aspectos imunológicos/inflamatórios, sendo capazes de interferir em diversas etapas do processo inflamatório, podendo promover um aumento na capacidade antiedematogênica (HATANAKA & CURI, 2007, NABAS, 2009).

As ME₁-PTX utilizadas nas doses de 7,2 e 14,4 mg.kg⁻¹ desenvolveram atividade anti-inflamatória significativa na segunda hora após a injeção subplantar (Figura 23), possuindo percentuais de inibição de 48,48% (0,34 ± 0,11 mL) e 77,27%

($0,15 \pm 0,13$ mL), respectivamente. Percebe-se que a capacidade anti-edematogênica da ME₁-PTX $14,4$ mg.kg⁻¹ foi semelhante a do grupo de referência na dose de 72 mg.kg⁻¹, não possuindo diferenças estatísticas significativas entre si, destacando-se a eficiência da ME proposta já na segunda hora.

A Figura 24 mostra o resultado de todos os tratamentos três horas após a indução do edema de pata pela carragenina.

Figura 24 - Efeito anti-inflamatório da PTX em solução ou incorporada a sistemas microemulsionados após três horas de indução do edema de pata pela carragenina.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Todos os tratamentos foram feitos 30 minutos antes da injeção da carragenina e o volume da pata foi medido três horas após a indução. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. (c) – $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (Carragenina), (d) - $p < 0,01$ comparado ao grupo Solução-PTX 36 mg.kg⁻¹, (f) - $p < 0,05$ comparado ao grupo Solução-PTX 72 mg.kg⁻¹, (h) - $p < 0,001$ comparado ao grupo Solução-PTX 72 mg.kg⁻¹, (i) - $p < 0,05$ comparado ao grupo ME₁-branca, (j) - $p < 0,001$ comparado ao grupo ME₁-branca, (l) - $p < 0,01$ comparado ao grupo ME₁-PTX $7,2$ mg.kg⁻¹.

Três horas após a indução do edema de pata (Figura 24), o grupo correspondente a Carr obteve um aumento de volume de $0,81 \pm 0,07$ mL. As soluções de PTX nas doses de 36 e 72 mg.kg⁻¹ continuaram a exercer seu efeito anti-inflamatório, resultando em percentuais de inibição de $53,08\%$ ($0,38 \pm 0,16$ mL) e de $74,07\%$ ($0,21 \pm 0,15$ mL), respectivamente. O grupo correspondente ao tratamento com a ME₁-branca inibiu o edema em $19,75\%$ ($0,65 \pm 0,11$ mL). A ME₁-PTX na dose de $7,2$ mg.kg⁻¹ apresentou efeito inibitório $46,91\%$ ($0,43 \pm 0,11$ mL)

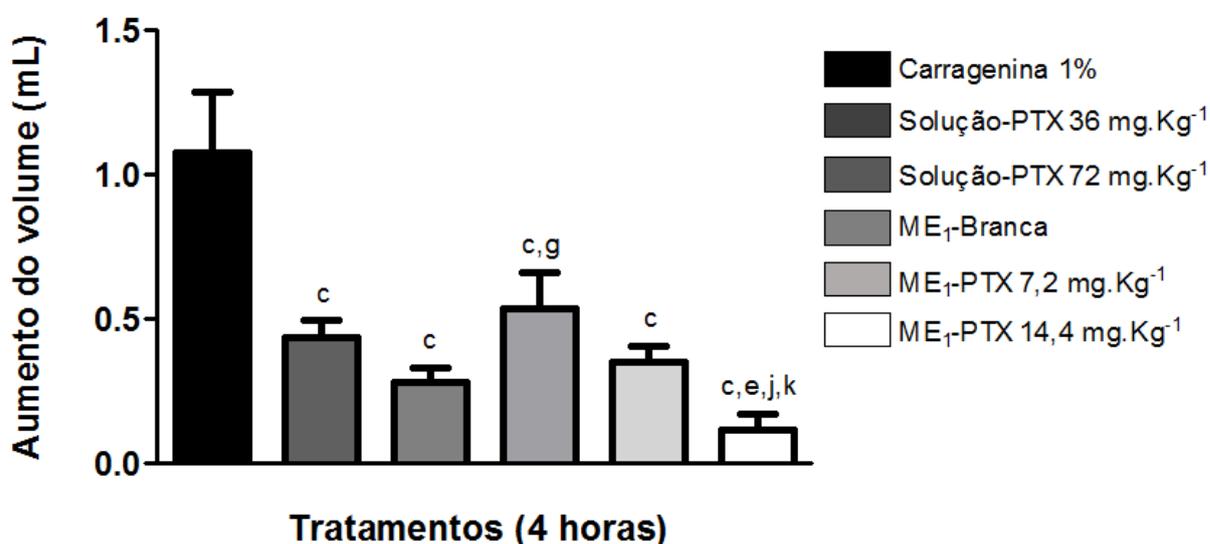
nesta etapa do ensaio e o grupo da ME₁-PTX na dose de 14,4 mg.kg⁻¹ continuou apresentando atividade antiedematogênica com inibição de 82,71% (0,14 ± 0,03 mL) da inflamação.

Um fato a se destacar é que, a partir dessa terceira hora de tratamento, passou a existir diferenças estatísticas significativas entre o grupo tratado intraperitonealmente com solução de PTX na dose de 36 mg.kg⁻¹ e o grupo tratado topicamente com ME₁-PTX a 14,4 mg.kg⁻¹, demonstrando que, em um intervalo de tratamento mais amplo, esta formulação mostrou-se com atividade anti-inflamatória superior. Entre os tratamentos com o sistema microemulsionado proposto também houve diferenças significativas ao longo dessa terceira hora, sugerindo que a atividade anti-inflamatória da PTX incorporada a ME possa ter uma linearidade de efeitos com relação a dose.

Um fenômeno que provavelmente ocorreu nesta fase do ensaio foi o edema do grupo Carr (A) não ter tido uma variação de aumento de volume tão expressiva quando comparado aos provocados nas primeiras duas horas após a indução do edema, ou seja, houve o aumento do edema neste grupo, porém não aconteceu de maneira tão significativa quanto o esperado para uma inflamação que se comporte de maneira crescente e contínua. Os demais grupos continuaram mantendo similaridades quanto à variação nos aumentos dos volumes e quanto as suas atividades anti-inflamatórias. No entanto, esse fato fez com que o percentual de inibição dos grupos fosse considerado relativamente menor do que na segunda hora.

A Figura 25 demonstra os resultados obtidos pelos tratamentos na quarta hora após a indução do edema pela carragenina. O grupo Carr obteve um aumento de volume na pata de 1,075 ± 0,21 mL. Os tratamentos com as soluções de PTX nas doses de 36 e 72 mg.kg⁻¹ promoveram inibições significativas de 59,06% (0,44 ± 0,06 mL) e de 73,95% (0,28 ± 0,05 mL), respectivamente, confirmando a atividade anti-inflamatória deste fármaco em todas as horas de observação do evento inflamatório escolhido, ratificando os resultados de Abdel-Salam e colaboradores (2003).

Figura 25 - Efeito anti-inflamatório da PTX em solução ou incorporada a sistemas microemulsionados após quatro horas de indução do edema de pata pela carragenina.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Todos os tratamentos foram feitos 30 minutos antes da injeção da carragenina e o volume da pata foi medido quatro horas após a indução. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. (c) - $p < 0,001$ comparado ao grupo controle (Carragenina), (e) - $p < 0,001$ comparado ao grupo Solução-PTX 36 mg.kg⁻¹, (g) - $p < 0,01$ comparado ao grupo Solução-PTX 72 mg.kg⁻¹, (j) - $p < 0,001$ comparado ao grupo ME₁-branca, (k) - $p < 0,05$ comparado ao grupo ME₁-PTX 7,2 mg.kg⁻¹.

Em mais uma etapa, o grupo tratado com a ME₁-branca apresentou atividade inibitória significativa de 49,76% ($0,54 \pm 0,13$ mL), provavelmente devido aos efeitos do TACC em contato prolongado com a pele. Os grupos correspondentes as ME₁-PTX nas doses de 7,2 mg.kg⁻¹ e de 14,4 mg.kg⁻¹ obtiveram resultados considerados relevantes para a pesquisa, uma vez que após quatro horas da sua aplicação à pata, estas formulações desempenharam atividade antiedematogênica significativa, gerando percentuais de inibição de 67,44% ($0,35 \pm 0,06$ mL) e de 88,83% ($0,12 \pm 0,06$ mL).

O grupo ME₁-PTX na dose de 7,2 mg.kg⁻¹ apresentou efeito praticamente semelhante ao desenvolvido pelo grupo de referência na dose de 72 mg.kg⁻¹ após 4 horas de ensaio, já que não houve diferenças estatísticas significativas entre os referidos grupos, demonstrando que, mesmo com uma dose 10 vezes menor, o sistema microemulsionado proposto promoveu um desempenho anti-inflamatório tão expressivo quanto a solução referência. Vale salientar que a fase oleosa escolhida

para o sistema microemulsionado possivelmente atuou como agente sinérgico na atividade antiedematogênica da formulação.

Nesta quarta hora de ensaio evidenciou-se também que o grupo ME₁-PTX na dose de 14,4 mg.kg⁻¹ obteve não só um percentual inibitório da inflamação superior a do grupo referência na dose de 36 mg.kg⁻¹, como também apresentou uma significativa diferença estatística entre esses grupos demonstrando que, com uma dose 2,5 vezes menor, o sistema microemulsionado proporcionou uma atividade anti-inflamatória superior ao tratamento intraperitoneal, evidenciando, dessa maneira, a vantagem em dar prosseguimento ao estudo do sistema proposto.

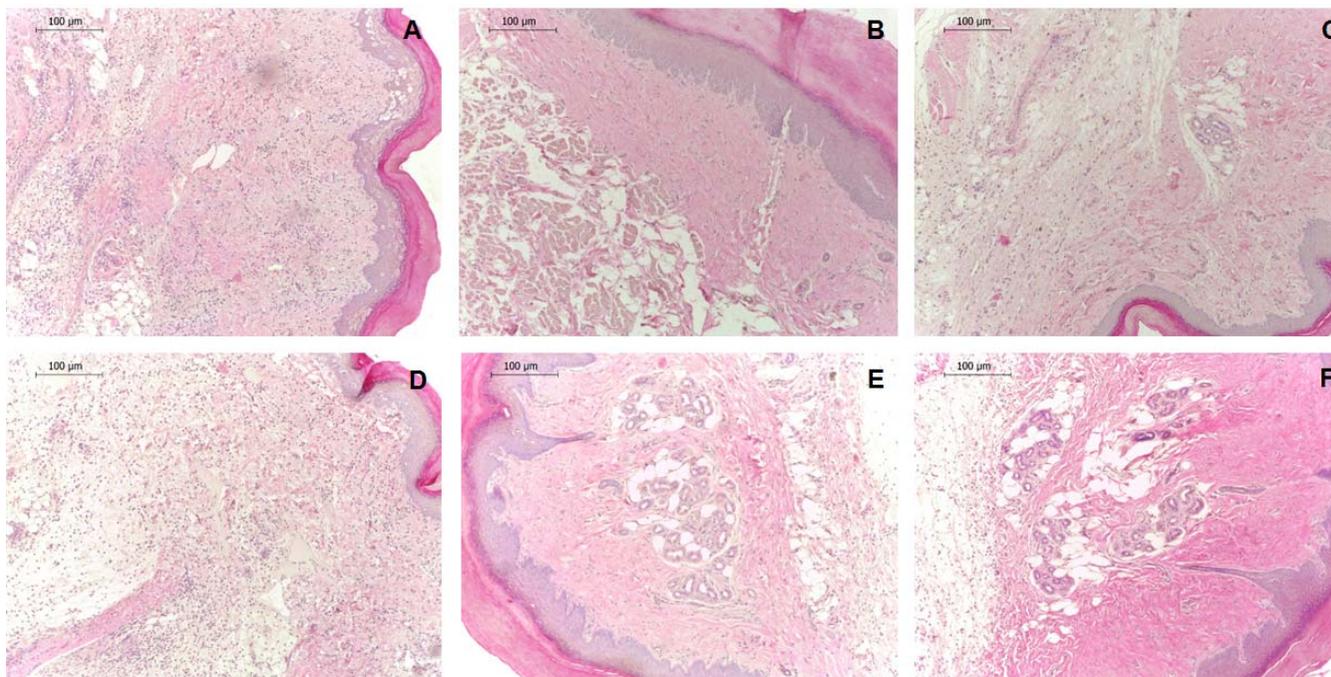
Este melhor desempenho das formulações microemulsionadas sobre os demais tratamentos pôde ser confirmado também através da análise histológica das patas dos animais após quatro horas de submissão aos vários tratamentos. Nas Figuras 26 e 27, pôde ser observado no grupo tratado apenas com o agente flogístico (A), a presença de um quadro inflamatório agudo tanto na derme, devido à presença de extenso infiltrado inflamatório composto principalmente de leucócitos polimorfonucleares que se distribuem de maneira aleatória ou pericapilar, quanto na epiderme, verificado através de seu espessamento celular. Dessa maneira, o modelo de indução de edema de pata pela carragenina pode ser mais uma vez confirmado como maneira adequada para simulação de um processo inflamatório agudo.

Nas Figuras 26 e 27, confirmou-se que o grupo tratado com solução de PTX na dose de 36 mg.kg⁻¹ (B) foi capaz de reduzir a injúria tissular causada pela carragenina, no entanto, o grupo tratado com a dose de 72 mg.kg⁻¹ (C) foi capaz de promover uma melhor atividade anti-inflamatória, reduzindo ainda mais o infiltrado celular e o aspecto edemaciado do tecido. O grupo tratado com ME₁-Branca (D - Figuras 26 e 27), demonstrou promover certa redução nos aspectos inflamatórios, acarretando em menor número de leucócitos polimorfonucleares para o local da indução do edema. Este fenômeno, conforme explicação anterior, deveu-se provavelmente à presença da fase oleosa da microemulsão, que possui capacidade modulatória diante de processos imunológicos (NABAS, 2009).

No grupo que recebeu a ME₁-PTX na dose de 7,2 mg.kg⁻¹ (E), foi ratificado que seu efeito foi semelhante ao desempenhado pelo grupo C, pois o aspecto tissular foi praticamente o mesmo, com a presença de pouco infiltrado celular e reduzido edema epidermal. O resultado satisfatório do grupo tratado com ME₁-PTX

na dose de $14,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ (F) pôde ser confirmado através da notória inibição do aspecto inflamatório, ou seja, esta formulação desempenhou melhor atividade que a solução de $\text{PTX } 36 \text{ mg.kg}^{-1}$ e uma inibição relativamente igual ao grupo tratado com solução de $\text{PTX } 72 \text{ mg.kg}^{-1}$, pois no grupo F a presença de infiltrados inflamatórios é praticamente mínima, confirmando seu eficiência.

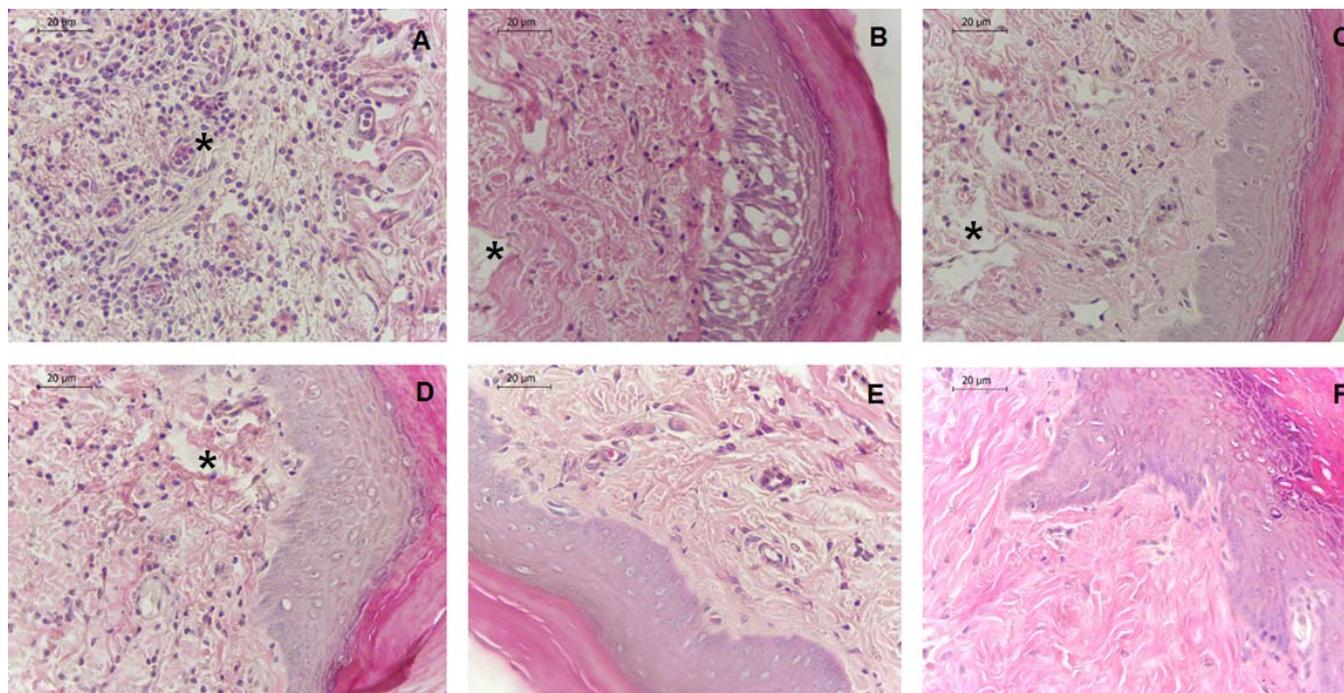
Figura 26 - Análise histológica da pele retirada das patas dos animais submetidos aos tratamentos com PTX em solução ou incorporada ao sistema microemulsionado quatro horas após a indução do edema por carragenina. Magnitude: 10x.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Em A, pele do grupo submetido apenas a injeção de carragenina com a presença de edema e intensa migração de leucócitos polimorfonucleares. Em B, pele tratada com solução de PTX (36 mg.kg^{-1}) e em C, com solução de PTX (72 mg.kg^{-1}) apresentando redução da injúria tissular causada pela carragenina. Em D, pele tratada com ME₁-branca com discreta redução nos aspectos inflamatórios. Em E, pele tratada com ME₁-PTX ($7,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) e em F, ME₁-PTX ($14,4 \text{ mg.kg}^{-1}$) apresentando significativa redução no aspecto edemaciado do tecido e na presença do infiltrado celular.

Figura 27 - Análise histológica da pele retirada das patas dos animais submetidos aos tratamentos com PTX em solução ou incorporada ao sistema microemulsionado quatro horas após a indução do edema por carragenina. Magnitude: 40x.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Em A, pele do grupo submetido apenas a injeção de carragenina com a presença de edema e intensa migração de leucócitos polimorfonucleares. Em B, pele tratada com solução de PTX (36 mg.kg^{-1}) e em C, com solução de PTX (72 mg.kg^{-1}) apresentando redução da injúria tissular causada pela carragenina. Em D, pele tratada com ME₁-branca com discreta redução nos aspectos inflamatórios. Em E, pele tratada com ME₁-PTX ($7,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) e em F, ME₁-PTX ($14,4 \text{ mg.kg}^{-1}$) apresentando significativa redução no aspecto edemaciado do tecido e na presença do infiltrado celular. * Fenômenos de infiltrado celular ou edema local.

Geralmente os sistemas microemulsionados para uso tópico demonstram permitir uma melhor permeação do fármaco no local de ação quando comparados aos tratamentos convencionais devido a vários mecanismos que os tornam promissores para esta via de aplicação. Um destes mecanismos é o fato desses sistemas possuírem tensoativos em sua composição, que permitem a interação direta com o estrato córneo da pele, fazendo com que a permeabilidade aos fármacos seja facilitada. Os tensoativos iriam difundir-se pela superfície da pele e atuariam como promotores de permeação, rompendo a estrutura lipídica organizada do estrato córneo e melhorando a difusão do fármaco para a pele (SILVA et al., 2010). Um segundo mecanismo envolve modificações na atividade termodinâmica do fármaco culminando no aumento do coeficiente de partição entre a pele e o veículo, fazendo com que se tenha uma melhor permeação; o último mecanismo envolve a hidratação do estrato córneo da pele, pois este possui efeito significativo sobre a penetração do fármaco (PATEL et al., 2013; SAHOO et al., 2014).

Dessa maneira, observou-se ao final do ensaio de edema de pata que a ME₁-PTX representou a melhor opção para o tratamento de afeções dermatológicas, tendo em vista que, em doses de 2,5 a 10 vezes menores, foi capaz de desempenhar atividades anti-inflamatórias iguais ou superiores aos tratamentos sistêmicos utilizando o fármaco livre em solução, sugerindo que houve, ao longo do tempo, uma maior quantidade de PTX disponível para o local inflamado graças aos mecanismos facilitadores de permeação já citados.

Este fato também é corroborado através da sugestão do perfil de liberação obtido (Seção 5.14), em que a liberação da PTX contida na ME é contínua-crescente e, portanto, a quantidade de fármaco presente na pata foi aumentada com o passar das horas, gerando o pico de inibição na quarta hora do ensaio inflamatório. Além destes motivos, a ME₁-PTX aplicada topicamente tornou-se superior por não ser susceptível ao metabolismo de primeira passagem, por possivelmente promover a minimização de alguns efeitos colaterais, por ser um método não invasivo e indolor, fatos que promovem uma melhor adesão do paciente ao tratamento e por ser de fácil aplicação, não necessitando de auxílio de profissionais especializados (BORTOLON et al., 2008; BADRAN et al., 2009). Logo, a incorporação de PTX em um sistema microemulsionado mostrou-se como uma possível alternativa para o combate de doenças dermatológicas em pacientes que as tenham de maneira esporádica ou crônica.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados, permitiu-se concluir que:

- O diagrama de fases pseudoternário se mostrou um método simples, reproduzível e útil para a escolha do ponto que continha as melhores proporções entre os componentes utilizados para a formação do sistema microemulsionado;
- A incorporação da PTX no sistema microemulsionado através da técnica de emulsificação por ultrassom (sonicação), mostrou-se eficaz, pois permitiu a formação de um sistema homogêneo, límpido e transparente;
- A análise de microscopia de luz polarizada e a determinação do índice de refração confirmaram o caráter isotrópico da ME proposta;
- A ME selecionada mostrou estabilidade adequada diante de estresses térmicos;
- Os resultados da análise térmica, via calorimetria exploratória diferencial, associado aos resultados de condutividade elétrica foram testes simples, rápidos e úteis para a elucidação do tipo de microestrutura presente no sistema proposto, sendo este do tipo A/O;
- A microscopia eletrônica de transmissão foi uma ferramenta essencial para a visualização da ultraestrutura da formulação proposta, confirmando a morfologia de gotículas características de uma ME;
- O pH da formulação proposta enquadrou-se dentro da faixa de pH ótimo para permitir o uso por via tópica;
- O método analítico espectrofotométrico desenvolvido e validado demonstrou ser seletivo, linear, preciso, exato e robusto para a análise do teor de PTX presente no sistema microemulsionado;
- O ensaio de eficiência de encapsulação juntamente com a análise de difração de raios X demonstrou que a taxa de PTX incorporada a ME foi satisfatória;

- O mecanismo cinético que envolveu a liberação *in vitro* da PTX do sistema microemulsionado proposto seguiu o modelo cinético de Higuchi;
- A ME₁-PTX apresentou valores de fluxo (J), *lag time* e de coeficiente de liberação (K_r) satisfatórios e adequados para dar prosseguimento aos ensaios de permeação *in vitro*;
- A ME₁-PTX demonstrou possuir atividade anti-inflamatória em todas as etapas do modelo de inflamação desenvolvido. Sendo esta atividade mais proeminente a partir da terceira hora de ensaio, chegando a ser igual ou superior à atividade de soluções de PTX.

Deve-se ressaltar a relevância desse trabalho para a área da nanotecnologia farmacêutica pelo ineditismo da formulação proposta contendo a PTX, demonstrando apresentar características físico-químicas, estruturais e farmacológicas satisfatórias para dar continuidade a estudos que visem otimizar e valorizar a formulação para que esta possa ser veiculada de maneira tópica, oferecendo mais uma alternativa para o tratamento de doenças dermatológicas.

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SALAM, O.M.E.; BAIUOMY, A.R.; EL-SHENAWY, I.M.; ARBID, M.S. The anti-inflammatory effects of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 331–340, 2003.

ABOOD, R. M. A.; TALEGAONKAR, S.; TARIQ, M.; AHMAD, F. J. Microemulsion as a tool for the transdermal delivery of ondansetron for the treatment of chemotherapy induced nausea and vomiting. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 143– 151, 2013.

ACHARYA, D. P.; HARTLEY, P.G. Progress in microemulsion characterization. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 274–280, 2012.

ALBERS, A. P. F.; MELCHIADES, F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X (A simple method for the characterization of clay minerals by X-ray diffraction). **Cerâmica**, v. 48, n. 305, 2002.

ALVAREZ-FIGUEROA, M.J.; BLANCO-MENDEZ, J. Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 57–65, 2001.

ANFARMAG. **Manual de Incompatibilidades Farmacotécnicas em preparações de Uso Tópico**. 1ª ed. São Paulo, 2004.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Farmacopeia Brasileira**, volume 1, 5ª Ed. Brasília, 2010.

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

ARIAS-DIAZ, J.; VARA, E.; TORRES-MELERO, J.; GARCIA, C.; HERNÁNDEZ, J.; BALIBREA, J, L. Local production of oxygen free radicals and nitric oxide in rat diaphragm during sepsis: effects of pentoxifylline and somatostatin. **The European Journal of Surgery**, v.163, p. 619-625,1997.

ASTIER, A. Formes galéniques nouvelles en cancérologie. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v.64, n.1, p.23-35, 2006.

AVIADO, D.M.; DENELBACH, H.R. Pharmacology of pentoxifylline, a hemorheologic agent used for the treatment of intermittent claudication. **Angiology**, v. 35, p. 407-417, 1984.

BABY, A.R.; MIGLIATO, K.F.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; SALGADO, H.R.N.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catiguá* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.3, p.405-412, 2007.

BADRAN, M.M.; KUNTSCHE, J.; FAHR, A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p. 511-23, 2009.

BÁFICA, A.; OLIVEIRA, F.; FREITAS, L.A.; NASCIMENTO, E.G.; BARRAL, A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. **International Journal of Dermatology**, v.42, p.203-207, 2003.

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. Study of surfactant combination and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of efzetimibe. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.76, p.410-420, 2010.

BAROT, B.S.; PAREJIYA, P.B; PATEL, H. K.; GOHEL, M. C.; SHELAT, P. K. Microemulsion-Based Gel of Terbinafine for the Treatment of Onychomycosis: Optimization of Formulation Using D-Optimal Design. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 1, 2012.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica – parte 1. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.

BARRY, B. W. Liberação transdérmica de fármacos. In: AULTON M. E., **Delineamento de formas farmacêuticas**. Segunda edição. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 504-536.

BARTON, M.H.; COLLATOS, C.; MOORE, J.N. Endotoxin induced expression of tumor necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages. **Equine Veterinary Journal**, v.28, p.382-389, 1996.

BAUMGARTNER, T. Therapeutic Review, Pentoxifylline. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 16, n. 2, p. 118-121, 2007.

BEMVINDO, C.S. **Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas Comerciais**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006.

BERMAN, B. DUNCAN, M. R. Pentoxifylline inhibits normal human dermal fibroblast in vitro proliferation, collagen, glycosaminoglycan and fibronectin production and increase collagenase activity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 92, p. 605-610, 1989.

BERTHAUD, F.; BONCHEVA, M. Correlation between the properties of the lipid matrix and the degrees of integrity and cohesion in healthy human Stratum corneum. **Experimental Dermatology**, v. 20, p.255–62, 2011.

BEYAERT, R.; FIERS, W. **Tumor necrosis factor and lymphotoxin**. In: MIRE-SLUIJ, A., THORPE, R. (Eds). *Citokines*. California: Academic, 1998. p.335-360.

BICKERS, D.R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 2565–2575, 2006.

BORTOLON, F.F.; SATO, M.E.; ANDREAZZA, R.C.S.; BRESOLIN, T.M.B. Effect of enhancers on the in vitro percutaneous absorption of piroxicam from compounding formulations. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 44, n. 3, p.433-49, 2008.

BOWSTRA, J.A.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; GOORIS, G.S.; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v.42, p.1-36, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, nº 104, 2 de junho de 2003. Seção 1. p. 56-9.

BRITO, G.; DOURADO, M.; POLARI, L.; CELESTINO, D.; CARVALHO, L.P.; QUEIROZ, A.; CARVALHO, E.M.; MACHADO, P.R.L.; PASSOS, S. Clinical and Immunological Outcome in Cutaneous Leishmaniasis Patients Treated with Pentoxifylline. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 617–620, 2014.

BRITTAIN, H.G. **Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients**. Academic Press, p. 582. 1998.

BRITISH Pharmacopoeia. 7. ed. London: Her Majesty's Stationery Office, 1999. [CD-ROOM], 2009, p.

BRUYNZEEL I, STOOFF TJ, WILLEMZE R. Pentoxifylline and skin inflammation. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 23, p. 168–172, 1998.

BUFFONE, M. G.; WERTHEIMER, E. V.; VISCONTI, P. E.; KRAPP, D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. **Biochimica Biophysica Acta**. P. 2610-1620, 2014.

BUTANI, D.; YEWALE, C.; MISRA, A. Amphotericin B topical microemulsion: Formulation, characterization and evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 351–358, 2014.

CALDERON, M. J.; LANDA, N. AGUIRRE, A.; DIAZ-PEREZ, J.L. Successful treatment of cutaneous PAN with pentoxifylline. **British Journal of Dermatology**, v. 128, p. 706-707, 1993.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.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.

CASTRO, A.; JEREZ, M.J.; GIL, C.; MARTINEZ, A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Their Role in Immunomodulatory Responses: Advances in the Development of Specific Phosphodiesterase Inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 25, p. 229-244, 2005.

CHARLES, S.A.; BOZENA, B.M. Percutaneous penetration enhancers local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, p. 36-41, 2000.

CHEN, H.; CHANG, X.; WENG, T.; ZHAO, X.; GAO, Z.; YANG, Y.; XUB, H.; YANG, X. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. **Journal of Controlled Release**, v. 98, p. 427– 436, 2004.

CHEN, H.; MOU, D.; DU, D.; CHANG, X.; ZHU, D.; LIU, J.; XUB, H.; YANG, X. A Hydrogel-thickened microemulsion for topical administration of drug molecule at an extremely low concentration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 78–84, 2007.

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

CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 1036-1040, 2009.

CHORILLI, M.; PRESTES, P. S.; RIGON, R. B., LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.; OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v.85, n.2, p.182-8, 2011.

CHOWDARY, K.P.R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. *East Pharm New Delhi*, v. 30, p. 51-54, 1987.

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

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v.141, n. 3, p. 277-99, 2010.

CHRISTOVA-BAGDASSARIAN, V.; ANGELOV, T.; ATANASSOVA, M. UV spectrometric and high performance liquid chromatographic determination of pentoxifylline in workplace air. **Journal of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 42, p. 223–7, 2007.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p.19-26, 2002.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.

DAMASCENO, B. P. G. L. **Estudo do comportamento físico-químico e farmacotológico da anfotericina B em microemulsões do tipo O/A**. 2005. 70f. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte.

DAMASCENO, B.P.G.L., SILVA, J.A., OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L., ARAÚJO, I.B., OLIVEIRA, A.G., EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n. 1, p.9-18, 2011.

DAMASCENO, B.P.G.L.; DOMINICI, V.A.; URBANO, I.A.; SILVA, J.A.; ARAÚJO, I.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; SILVA, A.K.A.; MEDEIROS, A.C.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Amphotericin B microemulsion reduces toxicity and maintains the efficacy as an antifungal product. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 290-300, 2012.

DECLAIR, V. Aplicação do Triglicerídeos de cadeia média (TCM) na prevenção de úlceras de decúbito. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 47, n. 1, p. 27-30, 1994.

DEVAULT, G.A.; KOHAN, D.E.; NELSON, E.W.; HOLMAN, J.M. The effects of oral pentoxifylline on the cytokine release syndrome during inductive OKT3. **Transplantation**, v.57, p. 532-540, 1994.

DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. DEF 2000/ 2001. 27.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2000. p.781, 1015-1016.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M.; JOCKOVIC, J. Phase behaviour, microstructure and ibuprofen solubilization capacity of pseudo-ternary nonionic microemulsions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 160, p.81–87, 2011.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M.; FILIPIC, S.; AGBABA, D. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 433, p. 25– 33, 2012.

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

DORWARD, D.A.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; HASLETT, C.; DHALIWAL, K. Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 135, p. 182 – 199, 2012.

EL MAGHRABY, G. M. Self-microemulsifying and microemulsion systems for transdermal delivery of indomethacin: Effect of phase transition. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 595–600, 2010.

ELIAS, P.M.; WOOD, L.C.; FEINGOLD, K.R. Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses. **American Journal of Contact Dermatitis**, v. 10, p.119–26, 1999.

ELY, H. Pentoxifylline therapy in dermatology. A review of localized hyperviscosity and its effects on the skin. **Dermatologic Clinics**, v.6, p. 585-608,1988.

EREN, E.; ELLIDAG, H. Y.; AYDIN, O.; YILMAZ, N. HDL functionality and crystal-based sterile inflammation in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 18–23, 2015.

EVANDRO, S. A. **Caracterização elétrica e óptica das transições de fase em colóides e microemulsões.** Bahia, 2009. [Dissertação de Mestrado em Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Vale do São Francisco].

FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 306–313, 2012.

FERNANDES, J.L.; DE OLIVEIRA, R.T.; MAMONI, R.L.; COELHO, O.R.; NICOLAU, J.C.; BLOTTA, M.H.; SERRANO, J.R.C.V. Pentoxifylline reduces pro-inflammatory

and increases antiinflammatory activity in patients with coronary artery disease—a randomized placebo-controlled study. **Atherosclerosis**, v. 196, p. 434–442, 2008.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M.C.C.; SILVA JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 03, 2005.

FRIEDMANN, P.S.; STRICKLAND, I.; MEMON, A.A.; JOHNSON, P.M. Early time course of recruitment of immune surveillance in human skin after chemical provocation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 91, p.351–6, 1993.

FRIEDRICH, H.; FREDERIK, P.M.; DE WITH, G.; SOMMERDIJK, N.A. Imaging of selfassembled structures: interpretation of TEM and cryo-TEM images. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, p. 7850–7858, 2010.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets -Inflammation & Allergy**, v. 4, p. 281–286, 2005.

GAMAL, M.; MAGHRABY, E. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: Effects of cosurfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, p. 285–292, 2008.

GANNU, R.; PALEM, C.R.; YAMSANI, V.V.; YAMSANI, S.K. YAMSANI, M.R. Enhanced bioavailability of lacidipine via microemulsion based transdermal gels: formulation optimization, ex vivo and in vivo characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, 231–241, 2010.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GEINOZ, S.; GUY, R.H.; TESTA, B.; CARRUPT, P.A. Quantitative structure-permeation relationships (QSPeRs) to predict skin permeation: a critical evaluation, **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 83–92, 2004.

GHOSH, M.N. **Fundamentals of Experimental pharmacology**. Hilton and company, Kolkata, India, 2005 (Chapter 30).

GHOSH, P.K.; MURTHY, R.S. Microemulsions: A potential drug delivery system. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 2, p.167-80, 2006.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics sonochemistry**, v.20, n.1, p.338-44, 2013.

GILHAR, A.; GROSSMAN, N.; KAHANOVICZ, S.; REUVENI, H.; COHEN, S.; EITAN, A. Antiproliferative effect of Pentoxifylline on Psoriatic and normal epidermis. In vitro and In vivo studies. **Acta Dermato- Venereologica**, v.76, p. 437-441, 1996.

GONZALÉZ, G.J. Pentoxifilina: Revision de SUS características farmacológicas y utilizacion em la pratica clinica. **Flebologia y Linfología/Lecturas Vasculares**, n. 4, p. 157-220, 2007.

GONZALEZ-ESPINOZA, L.; ROJAS-CAMPOS, E.; MEDINA-PEREZ, M.; PENA-QUINTERO, P.; GOMEZ- NAVARRO, B.; CUETO-MANZANO, A.M. Pentoxifylline decreases serum levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and C-reactive protein in hemodialysis patients: results of a randomized double-blind, controlled clinical trial. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, p. 2023–2028, 2012.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M.C.; ILLUM, L.; DAVIS, S.S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n.2, p. 171-185, 1999.

GRAMPUROHIT, N.; RAVIKUMAR, P.; MALLYA, R. Microemulsions For Topical Use – A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v.45, n.1, p.100-107, 2011.

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

GRIGOLEIT, H.G.; LEONHARDT, H. Rheology of blood and pentoxifylline. **Pharmatherapeutica**, v. 1, n. 10, p. 642 – 651, 1997.

GUNAWAN, I.; ACHMAD, S.; SOEHARYONO, M.; TJIANG, L.; IIS, W.; LISA, A. **Pentoxifylline**. In: Harry GB. Analytical Profiles Drug Substances Excipients, v. 25, p. 295-339, 1998.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147–157, 2007.

HANSSON, V.; SKALHEGG, B. S.; TASKÉN, K. Cyclic-AMP dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, diferential regulation and targeting of subunits of PKA. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 73, p. 81-92, 2000.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. The pharmacological basis of therapeutics, 8th ed., Vol. II., New York: Maxwell Macmillan Publishing Corporation: 1699, 1992.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. Ed. Senac, 3 ed., SP, 2009.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 2, p.53-8, 2007.

HEUSCHKEL, S.; GOEBEL, A.; NEUBERT, R. H. H. Microemulsions - modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 603–631, 2008.

HIGUCHI, T. J. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 11, p. 85-97, 1960.

HIGUCHI, W. I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 8, p. 802-804, 1962.

HINZE, H.J. Struktur der Ausscheidungsprodukte des 3,7-Dimethyl-1-(5-oxo-hexyl)-xanthins (BL 191) beim Menschen. *Arzneimittelforschung*, v. 22, n. 7, p. 1144-1151, 1972.

HIPPALGAONKAR, K.; MAJUMDAR, S.; KANSARA, V. Injectable lipid emulsions-advancements, opportunities and challenges, **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 1526–1540, 2010.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. **Nature**, v. 152, n. 3847, p. 102- 103, 1943.

HONDA, A, M.; MAGALHÃES, J, F. Validação do método espectrofotométrico da pentoxifilina em comprimidos revestidos de 400 mg. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 2, 2001.

HOSHIMOTO, A.; SUZUKI, Y.; KATSUNO, T.; NAKAJIMA, H.; SAITO, Y. Caprylic acid and medium-chain triglycerides inhibit IL-8 gene transcription in Caco-2 cells: Comparison with the potent histone deacetylase inhibitor trichostatin A. **British Journal of Pharmacology**, v.136, p. 280–286, 2002.

HOSNY, K.M.; ALI, S.M. Novel controlled release oxyptentifylline microspheres; Preparation, characterization and in-vivo evaluation. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 27, p. 2039-2048, 2012.

HUA, L.; WEISAN, P.; JIAYU, L.; YING, Z. Preparation evaluation, and NMR characterization of vinpocetine microemulsion for transdermal delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, p. 657–666, 2004.

IDSON, B. Stability testing of emulsions: part 2. **Drug and Cosmetic Industry**, v.152, n.2, p.38-43, 72, 1993.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L .C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p.81-96, 2008.

IYER, A.; FAIRLIE, D.P, PRINS, J. B.; HAMMOCK, B.D.; BROWN, L. Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 6, p. 71-82, 2010.

JÄNIG, W.; GREEN, P.G. Acute inflammation in the joint: Its control by the sympathetic nervous system and by neuroendocrine systems. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 182, p. 42–54, 2014.

JOHNSON-HUANG, L.M.; MCNUTT, N.S.; KRUEGER, J.G.; LOWES, M.A. Cytokine producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. **Journal of Clinical Immunology**, v. 29, p. 247–256, 2009.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2008.

KALAITZAKI, A.; POULOPOULOU, M.; XENAKIS, A.; PAPADIMITRIOU, V. Surfactant-rich biocompatible microemulsions as effective carriers of methylxanthine drugs. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 422, p. 80-87, 2014.

KENDALL, A. C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 1, p. 141-164, 2013.

KIM, N.; PAE, H.; KIM, Y.; CHOI, C.; RIM, J.; LEE, H.; KIM, Y.; CHUNG, H. Pentoxifylline potentiates nitric oxide production in interleukin-1b-stimulated vascular smooth muscle cells through cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. **General Pharmacology**, Coréia do Sul, v. 35, p. 205– 211, 2002.

KIM, B.S.; WON, M.; YANG LEE, K.M.; KIM, C. S. In vitro permeation studies of nanoemulsions containing ketoprofen as a model drug. **Drug Delivery**, v. 15, p. 465– 469, 2008.

KINDLER, V.; SAPPINO, A.P.; GRAU, G.E.; PIGUET, P.F.; VASSALLI, P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, v. 56, n. 5, p. 731-740, 1989.

KLANG, V., HATSKO, N.B., VALENTA, C., HOFER, F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v.43, p.85–103, 2012.

KOROLKOVAS, A. **Análise farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara. 1988. p. 35–38.

KREILGAARD, M.; PEDERSEN, E.J.; JAROSZEWSKI, J.W. NMR characterization and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. **Journal of Controlled Release**, v. 69, n.3, p. 421–433, 2000.

KREILGAARD, M. Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by in vitro microdialysis. **Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 367–373, 2001.

KUMAR, G.K.; DHAMOTHARAN, R.; KULKARNI, N.M.; MAHAT, M.Y.A.; GUNASEKARAN, J.; ASHFAQUE, M. Embelin reduces cutaneous TNF- α level and ameliorates skin edema in acute and chronic model of skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 662, p. 63–69, 2011.

KUNEIDA, H.; UMIZU, G.; YAMAGUCHI, Y. Mixing effect of polyoxyethylene-type nonionic surfactants on the lipid crystalline structures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.218, p.88-96, 1999.

LAI-CHEONG, J.E.; McGRATH, J.A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine (Baltimore)**, v. 37, p. 223–6, 2009.

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

LEE, P.J.; LANGER, R.; SHASTRI, V.P. Novel microemulsion enhancer formulation for simultaneous transdermal delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 264–269, 2003.

LIU, H.; WANG, Y.; HAN, F.; YAO, H.; LI, S. Gelatin-stabilized microemulsion-based organogels facilitates percutaneous penetration of cyclosporine A in vitro and dermal pharmacokinetics in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 96, p. 3000–3009. 2007.

LOPES, L.B. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. **Pharmaceutics**, v. 6, p. 52-77, 2014.

LUNDBERG, B. B.; MORTIMER, B. C. Submicron lipid emulsions containing amphipathic polyethylene glycol for use as drug-carriers with prolonged circulation time. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 134, p.119-127, 1996.

MACHADO, P.R.; LESSA, H.; LESSA, M.; GUIMARÃES, L.H.; BANG, H.; HO, J.L. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. **Clinical Infectious Disease**, v.44, p.788-793, 2007.

MAGALHÃES, M.S.F.; FECHINE, F.V.; MACEDO, R.N.; MONTEIRO, D.L.S.; OLIVEIRA, C.C.; BRITO, G.A.C. Effect of a combination of medium chain triglycerides, linoleic acid, soy lecithin and vitamins A and E on wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n. 3, p.262-9, 2008.

MAGNUSSON, M.; GUNNARSSON, M.; BERNTORP, E.; BJÖRKMAN, S.; HÖGLUND, P. Effects of pentoxifylline and its metabolites on platelet aggregation in whole blood from healthy humans. **European Journal of Pharmacology**, v. 581, p. 290–295, 2008.

MASSON, D.S.; MORAIS, G.G.; MORAIS, J.M.; ANDRADE, F.F.; SANTOS, O.H.; OLIVEIRA, W.P.; ROCHA FILHO, P.A. Polyhydroxi alcohols and Peach Oil Addition influence on Liquid Crystal Formation and Rheological Behavior of O/W Emulsion. **Journal of Dispersion and Technology**, v. 26, p. 463-468, 2005.

MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nature Review Immunology**, v.9, p. 692 – 703, 2009.

MICHNIAK-KOHN, B.; ZHANG, J. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, p. 34– 44, 2011.

MITRAGOTRI, S. Breaking the skin barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 555–556, 2004.

MOSER, K.; KRIWET, K.; FROEHLICH, C.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Permeation enhancement of a highly lipophilic drug using supersaturated systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.90, n. 5, p. 607-616, 2001.

MOSS, G. P.; DEARDEN, J.C.; PATEL, H.; CRONIN, M.T.D. Quantitative structure–permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. **Toxicology In Vitro**, v. 16, p. 299–317, 2002.

MUELLER, M.M. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 735–744, 2006.

NABAS, F. Antiedematous effect of oils containing the fatty acids omega-3 and 6 in mice. **Revista Brasileira de Medicina**, v.66, n.4, p.92-96, 2009.

NAKABAYASHI, K.; AMEMIYA, F.; FUCHIGAMI, T.; MACHIDA, K.; TAKEDA, S.; TAMAMITSUB, K.; ATOBE, M. Highly clear and transparent nanoemulsion

preparation under surfactant-free conditions using tandem acoustic emulsification. **Chemical Communications**, v. 47, n. 20, p. 5765-5767, 2011.

NANDI, I.; BARI, M.; JOSHI, H. Study of isopropyl myristate microemulsion system containing cyclodextrins to improve the solubility of 2 model hydrophobic drugs. **AAPS PharmSciTech**, v.4, n. 1, p.1-9, 2003.

NOZ, K. C.; KORSTANJE, M. J.; VERMEER, B.J. Ulcerating necrobiosis lipidica effectively treated with pentoxifylline. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 18, p. 78-79, 1993.

OLAJIDE, O.A., MAKINDE, J.M., AWE, E.O. Effect of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 113–117, 1999.

OMULECKI, A.; BRONIARCZYK-DYLA, G.; ZAK PRELICH, M. Is pentoxifylline effective in the treatment of psoriasis?. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.34, n.4, p.714-715, 1996.

PATEL, H. K.; BAROT, B. S.; PAREJIYA, P.B.; SHELAT, P.K.; SHUKLA, A. 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.

PATEL, R.; FILER, A.; BARONE, F.; BUCKLEY, C. D. Stroma: Fertile soil for inflammation. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, p. 1-12, 2014.

PESTANA, K.C.; FORMARIZ, T.P.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.V.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, p. 253–259, 2008.

PHILIP, A.K.; PATHAK, K. Wet process-induced phase-transited drug delivery system: A means for achieving osmotic, controlled and level a IVIVC for poorly water-soluble drug. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 34, n. 7, p. 735-743, 2008.

POBER, J.S.; SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803 – 815, 2007.

POPA, N.; NOVAC, O.; PROFIRE, L.; LUPUSORU, C. E.; POPA, M.I. Hydrogels based on chitosan–xanthan for controlled release of theophylline. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, p.1241–1248, 2010.

PÓVOA, H. C. C. **Efeito da talidomida e da pentoxifilina na produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e gama interferon (INF- γ) na carcinogênese mamária em ratos wistar.** 2008. 93p. Tese de Doutorado em Patologia Investigativa. Universidade Federal Fluminense, Niterói.

PRAÇA, F. S. G. **Liberção e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais.** 2010. 44p. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. USP, São Paulo.

RHEE, Y.S.; CHOI, J.G.; PARK, E.S.; CHI, S.C. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, p. 161–170, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROTTKE, M.; LUNTER, D.J.; DANIELS, R. In vitro studies on release and skin permeation of nonivamide from novel oil-in-oil-emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, p. 260–266, 2014.

SADEGHI, H.; HAJHASHEMI, V.; MINAIYAN, M.; MOVAHEDIAN, A.; TALEBI, A. A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, p. 396–401, 2011.

SADEGHI, H.; HAJHASHEMI, V.; MINAIYAN, M.; MOVAHEDIAN, A.; TALEBI, A. Further studies on anti-inflammatory activity of maprotiline in carrageenan-induced paw edema in rat. **International Immunopharmacology**, v.15, p. 505–510, 2013.

SADEGHIAN, G.; NILFOROUSHZADEH, M.A. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v.45, p.819-821,2006.

SAMLASKA, C.P.; WINFIELD, A. Pentoxifylline. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 30, p. 603–621, 1994.

SAHOO, S.; PANI, N. R.; SAHOO, S.K. Microemulsion based topical hydrogel of sertaconazole: Formulation, characterization and evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 120, p.193–199, 2014.

SCHWARZ, A.; KRONE, C.; TRAUTINGER, F.; ARAGANE, Y.; NEUNER, P.; LUGER, T.A.; SCHWARZ, T. Pentoxifylline suppresses irritant and contact hypersensitivity reactions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, p. 549-552, 1993.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 14, p. 57-66, 2003.

SHEVACHMAN, M.; GARTI, N.; SHANI, A.; SINTOV, A. C. Enhanced percutaneous permeability of diclofenac using a new U-type dilutable microemulsion. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, p. 403–412, 2008.

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

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

SINTOV, A.C.; BRANDYS-SITTON, R. Facilitated skin penetration of lidocaine by using a combination of iontophoresis and microemulsion-based formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 316, p.58–67, 2006b.

SINTOV, A.C.; GREENBERG, I. Comparative percutaneous permeation study using caffeine-loaded microemulsion showing low reliability of the frozen/thawed skin models. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, p. 516–524, 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, J.A.; BEDOR, D.C.G.; DAMASCENO, B.P.G.L.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T.; SANTANA, D.P. Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.31, n. 1, p.1-8, 2010a.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p.125-134, 2010b.

SILVA, G.B.R.F.; SCARPA, M.V.; ROSSANEZI, G.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A. G. Development and characterization of biocompatible isotropic and anisotropic oil-in-water colloidal dispersions as a new delivery system for methyl dihydrojasmonate antitumor drug. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 867–876, 2014.

SILVEIRA, W.L.L. **Desenvolvimento e caracterização de um sistema microemulsionado contendo anfotericina B para uso oftálmico.** [Dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2009.

SIROTTI, C.; COCEANI, N.; COLOMBO, I.; LAPASIN, R.; GRASSI, M. Modeling of drug release from microemulsions: a peculiar case. **Journal of Membrane Science**, v. 204, p. 401–412, 2002.

SOARES, M. V. **Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona contendo zinco (II) ftalocianina para uso na terapia fotodinâmica do câncer.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

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

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

TEKSIN, Z. S.; AGABEYOGLU, I.; YAMAC, K. Bioavailability of Pentoxifylline-Chitosan Oral Matrix Tablet in Healthy Subjects. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v.1, n. 4, p. 115-120, 2009.

TITA, B.; JURCA, T.; TITA, D. Thermal stability of pentoxifylline: active substance and tablets Part 1. Kinetic study of the active substance under non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, p. 291–299, 2013.

TOSCANO, C.; CAMPOS, R.; BICA, A.; FARINHA, A. R. Desenvolvimento e validação de um sistema de avaliação da liberação *in vitro* do peróxido de benzoíla veiculado em géis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, 2001.

TURHAN, A.H.; ATICI, A.; MUSLU, N.; POLAT, A.; HELVACI, I. The effects of pentoxifylline on lung inflammation in a rat model of meconium aspiration syndrome. **Experimental Lung Research**, v. 38, p. 250–255, 2012.

VELASCO, M. R. V.; MACIEL, C. P. M.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; CONSIGLIERI, V. O.; KENKO, T. M.; BABY, A. R. Desenvolvimento e Teste Preliminar da Estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 181-196, 2008.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J.F.V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D.T.; FAJGELJ, A.; MULLER, H. Selectivity in analytical chemistry. *Pure and Applied Chemistry*. v.73, n.8, p.1381-86, 2001.

WAHBA-YAHAV, A. Intractable chronic furunculosis: prevention of recurrences with pentoxifylline. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 72, p. 461-462, 1992.

WANG, X.; XUE, M.; GU, J.; FANG, X.; SHA, X. Transdermal microemulsion drug delivery system for impairing male reproductive toxicity and enhancing efficacy of *Tripterygium Wilfordii* Hook f. *Fitoterapia*, v. 83, p. 690–698, 2012.

WARISNOICHAROEN, W.; LANSLEY, A.B.; LAWRENCE, M.J. Nonionic oil-in water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 198, p. 7-27, 2000.

WEI, T.; SABSOVICH, I.; GUO, T.; SHI, X.; ZHAO, R.; LI, W.; GEIS, C.; SOMMER, C.; KINGERY, W. S.; CLARK, D. J. Pentoxifylline attenuates nociceptive sensitization and cytokine expression in a tibia fracture rat model of complex regional pain syndrome. *European Journal of Pain*, v. 13, p. 253–262, 2009.

WEI, Y.; YE, X.; PENG, X. S. X.; BAO, Q.; LIU, M.; MANMAN, G.; LI, FANZHU. Enhanced oral bioavailability of silybin by a supersaturatable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 396, p. 22-28, 2012.

WINDMEIER, C.; GRESSNER, A.M. Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis. *General Pharmacology*, v.29, n.2, p. 181-196, 1997.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 111, p. 544-547, 1962.

WONG, S.S.; HOLT, P.J.A. Generalized morphea and primary biliary cirrhosis: a rare association and improvement with oxyntentifylline. *Clinical and Experimental Dermatology*, v.17, p. 371 -373, 1992.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology*, v. 6, p. 112-115, 2008.

YAGHMUR, A.; ASERIN, A.; ANTALEK, B.; GARTI, N. Microstructure considerations of new five-component Winsor IV food-grade microemulsions studied by pulsed gradient spin-echo NMR, conductivity, and viscosity. *Langmuir*, v.19, p.1063–1068, 2003.

YAN, K.; YAN, T.; GUO, H.; LI, J.; WEI, L.; WANG, C.; NIE, S.; PAN, W. Evaluation of transdermal permeability of pentoxifylline gel: in vitro skin permeation and in vivo microdialysis using Wistar rats. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 1, n.1, p.78-83, 2007.

YI, T.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. A new solid self-microemulsifying formulation prepared by spray-drying to improve the oral bioavailability of poorly water soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.70, p.439-444, 2008.

ZHANG, M.; XU, Y.J.; MENGI, A.S.; DHALA, S.N. Therapeutic potentials of pentoxifylline for treatment of cardiovascular diseases. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 58, p. 775-85, 2004.

ZHANG, W.L.; GU, X.; BAI, H.; YANG, R.H.; DONG, C.D.; LIU, J.P. Nanostructured lipid carriers constituted from high-density lipoprotein components for delivery of a lipophilic cardiovascular drug. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 391, p. 313-321, 2010.

ZHANG, J.; MICHNIAK-KOHN, B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: ketoprofen, lidocaine, and caffeine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.421, n.1, p.34-44, 2011a.

ZHANG, Y.T.; ZHAO, J.H.; ZHANG, S.J.; ZHONG, Y.Z.; WANG, Z.; LIU, Y.; SHI, F.; FENG, N.P. Enhanced transdermal delivery of evodiamine and rutaecarpine using microemulsion. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2469-2482, 2011b.

ZHAO, J.H.; JI, L.; WANG, H.; CHEN, Z.Q.; ZHANG, Y.T.; LIU, Y.; FENG, N.P. Microemulsion-based novel transdermal delivery system of tetramethylpyrazine: preparation and evaluation in vitro and in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1611-1619, 2011.

ZHAO, L.; WANG, Y.; ZHAI, Y.; WANG, Z.; LIU, J.; ZHAI, G. Ropivacaine loaded microemulsion and microemulsion-based gel for transdermal delivery: Preparation, optimization, and evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, p. 47-56, 2014.

ZHOU, Q.; MROWIETZ, U.; ROSTAMI-YAZDI, M. Oxidative stress in the pathogenesis of psoriasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 891-905, 2009.

Apêndice

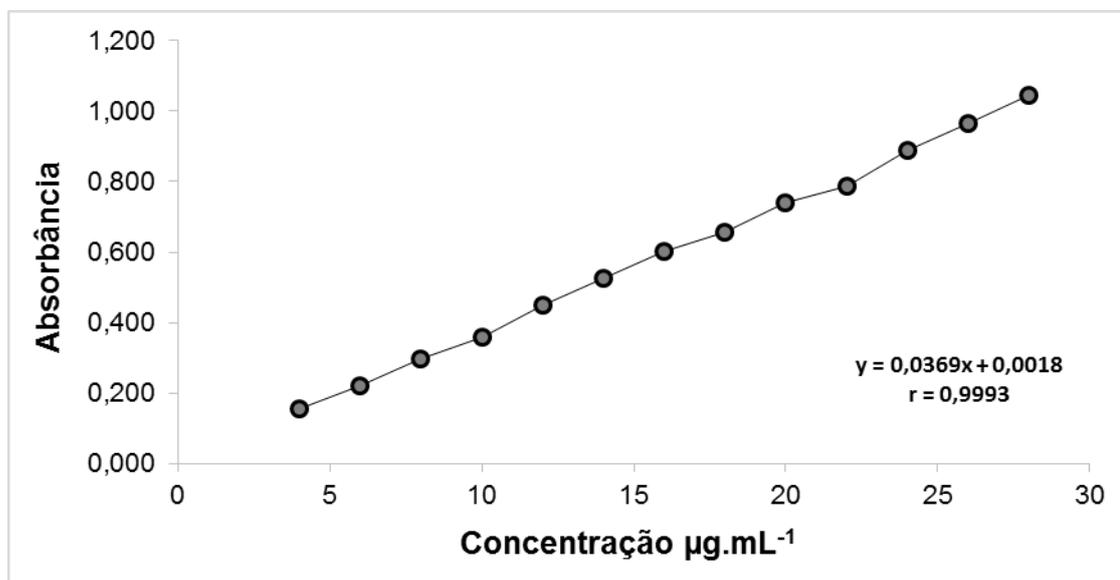
8 APÊNDICE A - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS) PARA QUANTIFICAÇÃO DA PENTOXIFILINA EM COMPARTIMENTO RECEPTOR DE CÉLULA DE FRANZ

O meio escolhido para fazer parte dos ensaios de liberação *in vitro* da PTX preenchendo o compartimento receptor do aparato de Franz foi o tampão (0,1 mol/L) pH 7,4, devido a alta solubilidade da PTX nessa solução (89,80 mg/mL) e sua ampla utilização nesse tipo de ensaio *in vitro*. Diante disso, necessitou-se validar uma metodologia analítica espectrofotométrica que utilizasse este meio para poder quantificar a possível PTX liberada pela ME no compartimento receptor. Todo o método foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos (LABDEM), utilizando o espectrofotômetro modelo Lambda 750, UV-Vis, NIR, PerkinElmer – Brasil e o espectrofotômetro UV-Vis 1240, Shimadzu – Japão.

O método foi validado conforme as indicações contidas na RE nº 899, de 29 de maio de 2003, já citada previamente, englobando os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e robustez.

O método analítico desenvolvido apresentou linearidade em uma faixa de 4 a 28 µg/mL. A curva analítica desenvolvida (Figura 29) possuiu a seguinte equação da reta $y = 0,0369x + 0,0018$, obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9993. Este resultado demonstrou a proporcionalidade direta que existiu entre a absorbância e as diferentes concentrações propostas, estando o r (0,9993) dentro do critério exigido pela ANVISA.

Figura 228 – Curva analítica obtida a partir de soluções de PTX em tampão fosfato pH 7,4 nas concentrações de 4 a 28 µg/mL para determinação do parâmetro linearidade.



Fonte: Próprio autor.

Avaliou-se a precisão em relação a repetibilidade e a precisão intermediária (precisão intercorrida). A Tabela 10 apresenta os dados obtidos para a precisão e demonstra que a reprodutibilidade do método foi alcançada pelo grau de concordância entre os resultados das medições das amostras efetuadas em dias alternados e por analistas distintos, dessa forma, o parâmetro precisão encontrou-se dentro do limite estabelecido pela ANVISA (< 5%)., corroborando a ideia de que o método analítico desenvolvido foi preciso.

Tabela 10 - Determinação do parâmetro precisão repetibilidade e precisão intercorrida (n=6) para validação do método espectrofotométrico utilizando tampão fosfato pH 7,4.

Analistas	Dia	Concentração teórica (µg.mL ⁻¹)	Concentração real (µg.mL ⁻¹) Média ± DP	Precisão (%)
Analista 1	1	16,0	16,07 ± 0,016	2,626
	2	16,0	15,58 ± 0,016	2,825
Analista 2	1	16,0	15,48 ± 0,007	1,272
	2	16,0	15,38 ± 0,006	0,969

A Tabela 11 mostra o valor da exatidão determinada a partir da leitura de 9 amostras em 3 níveis de concentração diferentes, sendo a triplicata de concentrações no nível baixo (8 µg/mL), no nível médio (16 µg/mL) e no nível alto (24 µg/mL). A partir dos valores obtidos e do cálculo do parâmetro exatidão através da Equação 2, pôde-se perceber a íntima correlação entre as concentrações teóricas e as concentrações que foram obtidas por meio do método utilizado, indicando que este foi considerado exato.

Tabela 11 - Determinação do parâmetro exatidão (n=3) para validação do método espectrofotométrico utilizando tampão fosfato pH 7,4.

Nível	Concentração teórica (µg.mL ⁻¹)	Concentração real (µg.mL ⁻¹) Média ± DP	CV(%)	Exatidão (%)
Baixo	8,0	8,01 ± 0,009	2,958	100,07
Médio	16,0	16,14 ± 0,008	1,485	100,85
Alto	24,0	24,0 ± 0,002	0,282	100,02

O parâmetro robustez pôde ser visto através dos dados contidos na Tabela 12, onde as alterações realizadas foram as mudanças no solvente (etanol e tampão) e no modelo do equipamento espectrofotométrico (UV Mini 1240, Shimadzu e Lambda 750, PerkinElmer, Brasil).

Tabela 12 - Determinação do parâmetro robustez (n=3) para validação do método espectrofotométrico utilizando tampão fosfato pH 7,4.

Modificação	Concentração teórica (µg.mL ⁻¹)	Concentração real (µg.mL ⁻¹) Média ± DP	Precisão (%)	Exatidão (%)	
Solvente	Etanol	16,0	15,26 ± 0,008	1,485	95,37
	Tampão	16,0	16,14 ± 0,007	1,161	100,85
Equipamento	Espectro 1	16,0	16,14 ± 0,007	1,161	100,85
	Espectro 2	16,0	15,86 ± 0,013	2,228	99,15

O método analítico desenvolvido possui uma robustez intrínseca, pois ao analisar as amostras em diferentes condições, os resultados mantiveram-se dentro das especificações exigidas pela RE n° 899/03.

Dessa maneira, o método espectrofotométrico desenvolvido foi validado e considerado seletivo, específico, linear, preciso, exato e robusto, sendo adequada sua utilização nos ensaios de liberação *in vitro* da PTX para o intuito de quantificação desse fármaco no compartimento receptor das células do aparato de Franz.

* Anexo *

9 ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CENTRO DE ENSINO SUPERIOR E DESENVOLVIMENTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE CAMPINA GRANDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/CESED**

PARECER

CEUA: n.º 11
NÚMERO DO PROJETO: 0038/18122013
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
APROVADO EM: 18.12.2013

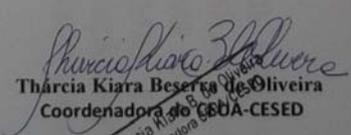
1. **Pesquisador Responsável:**
Bolivar Ponciano Gulart de Lima Damasceno

2. **Título do Projeto:**
Desenvolvimento de Sistema Microemulsionado contendo Pentoxifilina para aplicação tópica.

3. **Objetivo:**
Desenvolver um sistema microemulsionado para incorporação de pentoxifilina visando aplicação tópica.

4. **Considerações:**
O projeto apresentado está bem discriminado e coerente com as normas de utilização de animais. Cumprindo os requisitos da Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. O protocolo de pesquisa está devidamente preenchido, com todos os itens solicitados entregue a CEUA/CESED, porém o colegiado sugere que seja feito um grupo controle com animais que recebessem apenas a medicação estudada.

5. **Parecer Final:**
APROVADO


Thárcia Kizra Beserra de Oliveira
Coordenadora do CEUA-CESED



Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901 - Itararé
CEP 58411-020 | Campina Grande - PB | (83) 2101.8800
www.cesed.br | facisa@cesed.br | fcm@cesed.br | esac@cesed.br
CNPJ: 02.108.023/0001-40