

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG**

**PAULA SILVA MUDRIK MARCHETTI**

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA APLICAÇÃO TÓPICA  
CONTENDO BENZOFENONAS: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

**Alfenas/MG  
2015**

**PAULA SILVA MUDRIK MARCHETTI**

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA APLICAÇÃO TÓPICA  
CONTENDO BENZOFENONAS: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para o curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gislaine Ribeiro Pereira.

**Alfenas/MG  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Marchetti, Paula Silva Mudrik.

Desenvolvimento de formulações para aplicações tópica  
contendo benzofenonas: estudo in vitro e in vivo. / Paula Silva  
Mudrik Marchetti – Alfenas - MG, 2015.  
89 f.

Orientador: Gislaine Ribeiro Pereira.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal de Alfenas, 2015.  
Bibliografia.

1. Administração Tópica. 2. Cristais Líquidos. 3. Anti-Inflamatório.  
4. Benzofenona. I. Pereira, Gislaine Ribeiro. II. Título.

CDD-615.19

PAULA SILVA MUDRIK MARCHETTI

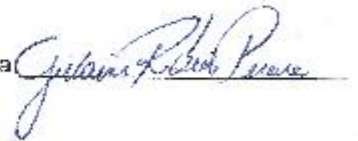
"Desenvolvimento de formulações para aplicação tópica contendo  
Benzofenonas: Estudos *in vitro* e *in vivo*"

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 25/09/2015

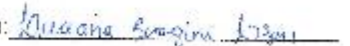
Profa. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Profa. Dra. Luciana Biagini Lopes  
Instituição: USP

Assinatura:



Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Dedico este trabalho, em primeiro lugar, a Deus que me deu energia, saúde e forças para enfrentar os momentos difíceis. Dedico também a mim mesma, pois fui persistente e perseverante e segui em frente, mesmo com todas as dificuldades. E, por fim, dedico aos meus pais que tanto me apoiaram em todos os momentos dessa caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira, pela orientação, atenção e confiança dispensadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

A aluna de iniciação científica Luana Cunha, pela dedicação, apoio e imensa responsabilidade durante todo o período em que estivemos juntas no projeto.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos, pela colaboração no projeto e fornecimento da LFQM117.

A Profa. Dra. Danielle Dias, pela colaboração no projeto e fornecimento da LFQM117.

A Profa. Dra. Fernanda Borges e ao discente Bruno Sales, pela colaboração no projeto.

As técnicas do Laboratório de Pesquisa em Sistemas de Liberação de Fármacos, Neila e Andrea pelas inúmeras ajudas.

Aos meus pais, Regina e Márcio pelo apoio constante, incentivo e todo amor.

Ao meu marido, Matheus por ser meu grande companheiro e por todo seu Amor e paciência durante o período do Mestrado.

Aos amigos do programa de Pós Graduação, pelo convívio diário e pelos momentos de descontração e de aprendizado: Aline Pereira, André Ruela e Mônica Esselin.

Aos amigos que, mesmo de longe, me apoiaram e acompanharam o desenrolar desse trabalho.

A todos os meus amigos que de alguma forma torceram pela realização deste trabalho.

A UNIFAL pelo suporte e estrutura física.

Muito obrigada!

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma formulação para administração tópica de um novo composto com atividade anti-inflamatória, uma benzofenona denominada LFQM117. A administração tópica apresenta inúmeras vantagens sobre a terapia sistêmica, especialmente no tratamento de doenças específicas da pele e para fármacos que apresentam efeitos colaterais sistêmicos e baixa biodisponibilidade. No entanto, um grande desafio no desenvolvimento de produtos tópicos é vencer a barreira cutânea e ainda controlar a liberação e a quantidade de fármaco que atinge as diferentes camadas da pele. E tanto as características físico-químicas do fármaco quanto o sistema de liberação são responsáveis por esta distribuição diferencial do fármaco nas diversas camadas da pele. Dessa forma, o presente trabalho, além de realizar um estudo físico-químico para a caracterização da nova molécula, LFQM117, avaliou formulações que fossem capazes de fornecer uma penetração cutânea adequada do composto. Sistemas líquido-cristalinos apresentam características interessantes para administração tópica, tais como estrutura de camada lipídica e forma de gel, capacidade de incorporar moléculas hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas e modular a liberação dessas substâncias e possibilidade de incorporar promotores de absorção cutânea na formulação e por isso foram estudados como veículos para a formulação tópica de LFQM117. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a LFQM117 é uma molécula estável, porém insolúvel em água, altamente apolar ( $\log P = 4,8$ ) e com baixa permeabilidade cutânea. Fases líquido-cristalinas lamelares constituídas de monoleína : ácido oleico : propilenoglicol : água foram capazes de aumentar a quantidade de LFQM117 retida na epiderme sem favorecer uma permeação cutânea, o que é adequado para produtos de uso tópico em que se espera uma máxima retenção cutânea com mínima permeação cutânea. Por fim, a ação anti-inflamatória *in vivo* das formulações de LFQM117 também foi avaliada através dos ensaios de avaliação de edema de orelhas e de determinação da atividade da enzima mieloperoxidase, demonstrando que mesofases lamelares compostas por monoleína são sistemas promissores para a administração da benzofenona LFQM117, como um anti-inflamatório tópico.

Palavras-chaves: Administração tópica. Cristais líquidos. Monoleína. Anti-inflamatório. Benzofenona.

## ABSTRACT

This study aimed to develop a formulation for topical administration of a new compound with anti-inflammatory activity, a benzophenone called LFQM117. Topical administration has many advantages over systemic therapy, especially in treatments of specific diseases of the skin and for drugs which have systemic side effects and low bioavailability. However, a major challenge in developing topical products is to overcome the skin barrier and further control the release and the amount of drug that reaches the different skin layers. Physicochemical characteristics of the drug and the delivery system are responsible for this differential drug distribution in various skin layers. Thus, the present work, besides perform a physicochemical study to characterize the new molecule, LFQM117, evaluated if developed formulations were able to provide adequate skin penetration of the drug. Liquid crystalline systems have interesting features for topical administration such as lipid layer structure and gel form, ability to incorporate hydrophilic, lipophilic and amphiphilic molecules, modulate the release of these substances and the possibility to incorporate cutaneous absorption promoters in the formulation. Therefore these systems were investigated as vehicles for LFQM117's topical formulation. The results of this study demonstrated that LFQM117 is a stable molecule, but water-insoluble, highly nonpolar ( $\log P = 4.8$ ) and low skin permeability. Lamellar liquid crystalline phases consisting of monoolein: oleic acid: propylene glycol: water was able to increase the amount of LFQM117 retained in the epidermis without favoring a permeation skin, which is suitable for topical products. For these type of products it is expected a maximum retention skin with minimal skin permeation. Finally, topical anti-inflammatory action in vivo of LFQM117 formulations was evaluated as the inhibition of the croton oil-induced ear edema, as well as myeloperoxidase activity assay, demonstrating that lamellar mesophases composed of monoolein are promising systems for the administration of benzophenone LFQM117, as a topical anti-inflammatory.

Keywords: Topical administration. Liquid-crystals. Monoolein. Anti-inflammatory drug. Benzophenone.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AINEs /	Anti-inflamatórios não esteróides
ATR-FTIR /	Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier com o modo de Refletância Total Atenuada
CLs /	Cristais Líquidos
CV /	Coeficiente de variação
CLAE /	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX-1 /	Ciclo oxigenase-1
COX-2 /	Ciclo-oxigenase-2
DSC /	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> ou em português, Calorimetria Diferencial de Varredura
DTG /	Primeira derivada da curva de TG
EC /	Etrato Córneo
<i>g</i> /	Força gravitacional
IL-6 /	Interleucina 6
IV /	Infravermelho
K /	Coeficiente de partilha
<i>k'</i> /	Fator de retenção
LFQM117 /	2-hidroxi-4-O-(3,3-dimetil)-alilbenzofenona
Log /	Logarítmo
MPO /	Mieloperoxidase
N /	Número de réplicas
N /	Número de pratos teóricos
AO /	Ácido oléico
pH /	Potencial hidrogeniônico

TG /	Termogravimetria
TNF- $\alpha$ /	Fator de necrose tumoral ( $\alpha$ )
UV /	Ultravioleta
$\alpha$ /	Nível de significância

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da LFQM117.....	21
Figura 2 - Representação das rotas de permeação cutânea .....	24
Figura 3 - Representação esquemática das diversas fases líquido-cristalinas formadas pela monoleína em presença de água.....	28
Figura 4 - Esquema da célula de difusão do tipo Franz .....	44
Figura 5 - Aplicação da formulação teste em área depilada de 1,77 cm <sup>2</sup> do pavilhão auricular direito do animal .....	46
Figura 6 - Inflamação induzida por aplicação tópica do óleo de cróton na parte interna do pavilhão auricular direito do animal .....	48
Figura 7 - Cromatogramas da solução padrão de LFQM117 na concentração De 10 µg/mL (curva em rosa), branco de meio receptor (curva em preto), branco do homogeneizado de pele de orelha de porco (curva em azul) e branco do homogeneizado de fita adesiva (curva em vermelho).....	51
Figura 8 - Representação da curva de calibração da LFQM117 por CLAE.....	52
Figura 9 - Espectro de ATR-FTIR da LFQM117 .....	55
Figura 10 - Espectro de ATR-FTIR acoplada ao módulo “hot stage” da LFQM117.....	55
Figura 11 - Curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) obtidas para a LFQM117 .....	56

Figura 12 - Valores de retenção cutânea <i>in vitro</i> da LFQM117 em pele de orelha de porco a partir da formulação H nos tempos 3, 6, 9 e 12h .....	60
Figura 13 - Fotomicrografias da formulação H no dia da manipulação (a) e após 30 dias (b), destacando raias oleosas .....	61
Figura 14 - Fotomicrografia da formulação H após adição de 5 mL de água, indicando mudança de fase lamelar para fase hexagonal .....	61
Figura 15 - Valores de retenção cutânea <i>in vivo</i> da LFQM117 em ratos a partir da formulação H nos tempos 3, 6 e 12h .....	62
Figura 16 - Formação de edema após aplicação do óleo de cróton e diminuição do mesmo após aplicação de formulações distintas .....	63
Figura 17 - Determinação de ácido hipocloroso em fragmentos de orelhas de camundongos após inflamação induzida por óleo de cróton, com ou sem tratamento posterior à inflamação .....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Veículos empregados como formulação tópica da LFQM117.....	42
Tabela 2 - Resultados de adequação do sistema cromatográfico .....	50
Tabela 3 - Avaliação da precisão e exatidão do método para determinação da LFQM117 .....	52
Tabela 4 - Determinação do limite de detecção do método de quantificação de LFQM117 por CLAE .....	53
Tabela 5 - Estabilidade da LFQM117 em solução metanólica .....	53
Tabela 6 - Recuperação de LFQM117 a partir do estrato córneo e da epiderme viável + derme .....	54
Tabela 7 - Solubilidade da LFQM117 em diversos veículos .....	57
Tabela 8 - Quantidades de LFQM117 recuperadas após 24 h quando submetidas a diferentes condições de estresse forçado .....	57
Tabela 9 - Valores de permeação cutânea <i>in vitro</i> da LFQM117 a partir de diferentes veículos .....	58
Tabela 10 - Valores de retenção cutânea <i>in vitro</i> da LFQM117 a partir de diferentes veículos .....	59

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
2.1	INFLAMAÇÃO E OS ANTI-INFLAMATÓRIOS .....	18
2.2	BENZOFENONAS.....	20
2.3	TERAPIA TÓPICA E PENETRAÇÃO CUTÂNEA.....	22
2.4	CRISTAIS LÍQUIDOS.....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	33
4.1	MATERIAL. ....	33
4.2	METODOLOGIA.....	34
<b>4.2.1</b>	<b>Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLAE para determinação de LFQM117 em estudos de permeação e retenção cutânea</b> .....	34
4.2.1.1	Seletividade.....	35
4.2.1.2	Linearidade e intervalo .....	35
4.2.1.3	Precisão e exatidão .....	36
4.2.1.4.	Limite de detecção (LD) .....	36
4.2.1.5	Limite de quantificação (LQ) .....	36
4.2.1.6	Estabilidade.....	37
4.2.1.7	Estudo de recuperação .....	37
<b>4.2.2</b>	<b>Caracterização físico-química da LFQM117</b> .....	38

4.2.2.1	Análise da LFQM117 por ATR-FTIR .....	38
4.2.2.2	Análise Térmica.....	39
4.2.2.3	Determinação dos coeficientes de solubilidade de LFQM117 em diversos veículos .....	39
4.2.2.4	Determinação do coeficiente de partição octanol/água .....	40
4.2.2.5	Estudos de estabilidade da LFQM117.....	40
<b>4.2.3</b>	<b>Desenvolvimento de formulação tópica de LFQM117.....</b>	<b>41</b>
4.2.3.1	Estudos de permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> da LFQM117.....	42
4.2.3.1.1	<u>Preparação da pele</u> .....	43
4.2.3.1.2	<u>Permeação cutânea</u> .....	43
4.2.3.1.3	<u>Retenção cutânea</u> .....	44
4.2.3.2	Caracterização da formulação por microscopia de luz polarizada .....	45
4.2.3.3	Estudos de retenção cutânea <i>in vivo</i> da LFQM117 .....	45
4.2.3.4	Estudos <i>in vivo</i> da atividade anti-inflamatória da LFQM117.....	46
4.2.3.4.1	<u>Animais experimentais</u> .....	47
4.2.3.4.2	<u>Avaliação do edema de orelha</u> .....	47
4.2.3.4.3	<u>Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)</u> .....	48
<b>4.2.4.</b>	<b>Análise estatística dos resultados.....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DE LFQM117 EM ESTUDOS DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA .....	50
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LFQM117 .....	54
5.3	ESTUDOS DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA IN VITRO	

	DA LFQM117.....	58
5.4	ESTUDOS DE RETENÇÃO CUTÂNEA IN VIVO DA LFQM117 .....	62
5.5	ESTUDOS IN VIVO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA LFQM117 .....	62
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	65
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	77
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de formulações que tenham como via de administração a pele se tornou uma estratégia interessante para fármacos cujo sítio de ação é a própria pele ou algum outro alvo no organismo, sendo uma alternativa para superar aspectos indesejados relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica. A administração de fármacos na pele apresenta muitos benefícios, tanto para terapia tópica, no tratamento de doenças específicas da pele, quanto para terapia transdérmica. Para administração tópica, as principais vantagens sobre a via oral incluem ausência de efeitos colaterais sistêmicos e aumento da biodisponibilidade local para fármacos que apresentam baixa biodisponibilidade devido à absorção irregular no trato gastrointestinal e metabolismo hepático de primeira-passage.

O desenvolvimento de produtos tecnológicos bem sucedidos para aplicação cutânea é uma tarefa intimidante. O principal desafio é vencer a elevada e complexa barreira cutânea, assim como restaurar esta barreira após a aplicação dos produtos na pele. Além disso, tem-se que controlar a liberação e a quantidade de fármaco que alcança as diferentes camadas da pele, sendo as características físico-químicas do fármaco e do sistema de liberação os principais responsáveis por esta distribuição diferencial do fármaco nas camadas da pele. Como a pele é uma barreira natural para a penetração de substâncias, dificilmente um fármaco administrado topicamente, sem uma formulação adequada, atingirá as camadas mais profundas da pele, em concentrações suficientes para um tratamento adequado.

As benzofenonas são substâncias tanto de origem natural quanto sintética que têm sido avaliadas e descritas quanto a um grande potencial terapêutico, que passa desde efeito foto-protetor até ação antiparasitária, antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória.

A LFQM117 é uma molécula inédita, sintetizada no laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da UNIFAL e trata-se de uma benzofenona com potenciais atividades farmacológicas, incluindo a atividade anti-inflamatória. As características físico-químicas, bem como a metodologia analítica para essa substância e o mecanismo de ação da mesma ainda não foram estudados.

A terapia tópica utilizando anti-inflamatórios corticosteróides é bastante utilizada em patologias de pele, porém ela normalmente apresenta efeitos adversos

indesejáveis com o uso prolongado, como estrias, telangiectasias, manchas roxas, maior risco de infecções fúngicas e até mesmo a Síndrome de Cushing. Algumas características dessa síndrome são face arredondada (chamada de fácies em lua), acúmulo de gordura na região posterior do pescoço e das costas (chamado de corcova ou giba de búfalo) e distribuição irregular da gordura corporal, com predomínio na região abdominal e tronco. Este conjunto de efeitos colaterais é um dos mais incômodos, pois muda muito a aparência do paciente, principalmente nas pessoas que eram previamente magras.

Como existe um grande interesse no desenvolvimento de novos produtos de uso tópico para aplicação em afecções cutâneas como alternativas à terapia com corticosteróides, o presente trabalho pretendeu-se realizar o estudo de pré-formulação e desenvolvimento de formulações de aplicação tópica desse novo derivado sintético de benzofenona, com potencial atividade anti-inflamatória.

A utilização de sistemas adequados para a incorporação ou carreamento das substâncias de interesse é de fundamental importância para o sucesso nas terapias tópicas. Com base nisso, a escolha do sistema ideal que possibilitasse permeação e retenção adequadas foi um dos pontos-chaves de atenção nesse trabalho. Alguns sistemas foram testados, como um sistema simples contendo apenas óleo mineral, sistemas contendo óleo mineral e promotor de absorção cutânea (ácido oléico), microemulsão, e sistemas com monoleína contendo diversos componentes.

Pretendeu-se também avaliar a formulação desenvolvida através de estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* usando células de difusão vertical do tipo Franz, retenção cutânea *in vivo* em ratos Wistar e estudos da atividade anti-inflamatória *in vivo* empregando camundongos Swiss como modelo animal.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura deste trabalho aborda a inflamação e os anti-inflamatórios, benzofenonas, terapia tópica e penetração cutânea, e cristais líquidos.

### 2.1 INFLAMAÇÃO E OS ANTI-INFLAMATÓRIOS

A inflamação é um processo fisiológico que consiste na resposta orgânica diante de lesão tissular ou infecção, envolvendo uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (COTRAN et al., 2006). Este processo pode ser encarado como um mecanismo de defesa do organismo, permitindo abrir caminhos para os processos de reparação, com a cicatrização e a regeneração do tecido afetado. Entretanto, apesar de extremamente necessário, esse processo poderá em determinadas situações se exacerbar, levando a efeitos deletérios (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2011). Assim, inflamação é um termo geral usado para as mudanças que podem ocorrer nos tecidos vascularizados, como resposta a danos teciduais, infecções ou reações imunológicas. De modo geral, o processo inflamatório compreende três fases.

A fase aguda caracteriza-se pelos eventos vasculares, observando-se a vasodilatação local e o aumento da permeabilidade vascular; a fase tardia onde se observa a migração celular, com a infiltração de leucócitos e células fagocitárias e a fase proliferativa crônica, na qual ocorre degeneração tecidual e fibrose, podendo causar a dor através da ativação e sensibilização de nociceptores (LEES et al., 2004).

A exposição das células aos patógenos e a lesão tecidual resultam na produção e na liberação de diversos mediadores químicos, responsáveis pelas características da área inflamada. Dentre os mediadores da inflamação, encontram-se histamina, metabólitos do ácido aracdônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, bradicinina, ácido nítrico, neuropeptídeos e citocinas (ABBAS et al., 2008; COTRAN et al., 2006; RANG et al., 2012).

A migração unidirecional de células inflamatórias, como neutrófilos e monócitos, através dos espaços endoteliais ocorre através de um gradiente de

concentração de fatores quimiotáticos. A quimiotaxia é controlada por agentes quimiotáticos, tanto de origem endógena, que são aqueles liberados pelas próprias células do hospedeiro (produtos da lipoxigenase, citocinas, etc.), quanto de origem exógena, que são aqueles advindos do próprio agente agressor. Além destas, existem inúmeras substâncias que, em contato com o soro, geram fatores quimiotáticos via ativação do sistema complemento (ALLAN et al., 1985).

Os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa do corpo por serem recrutados rapidamente ao local da inflamação através da quimiotaxia. O aumento significativo da atividade da mieloperoxidase (MPO) tem uma proporção direta ao número de neutrófilos infiltrados no tecido, portanto pode-se utilizar sua atividade como índice de migração leucocitária e de estresse oxidativo (ALLAN et al., 1985; SCHIERWAGEN, BYLUND-FELLENIUS, LUNDBERG, 1990).

Os fármacos anti-inflamatórios são capazes de interferir no processo reacional de defesa do organismo, minimizando os danos e proporcionando maior conforto ao paciente. Atualmente, os principais agentes anti-inflamatórios são representados pelos glicocorticóides e pelos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) (RANG et al., 2012)

Na classe dos AINEs estão incluídos diversos ácidos orgânicos, que compartilham propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. Estes fármacos inibem a ciclo oxigenase-1 (COX-1) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2), isoenzimas da ciclo-oxigenase, que assim agem como inibidores diretos da síntese de prostaglandina e tromboxano a partir do ácido araquidônico (GELLER et al., 2012).

A administração tópica e transdérmica de AINEs como forma terapêutica no alívio de afecções inflamatórias e dolorosas tem despertado o interesse de muitos profissionais da saúde e pesquisadores, pois apresenta inúmeras vantagens em relação ao uso sistêmico, principalmente por reduzir os efeitos indesejáveis gastrintestinais (BADRAN et al., 2009; BARNES, 2008; ZHAO et al., 2009).

Além dos AINES, os anti-inflamatórios corticosteróides ou esteroidais também são muito empregados topicamente para tratamento da patologia inflamatória, proliferativa ou de causa imunológica da pele, podendo também ser eficazes no tratamento de sintomas cutâneos, tais como prurido e sensação de queimadura. Alguns exemplos de patologias que respondem favoravelmente à corticoterapia tópica são queimadura solar, eczema atópico, dermatite seborréica,

eczema de contato, prurido anal, vulvar ou do escroto, psoríase, cicatrizes hipertróficas e quelóides, alopecia areata e vitiligo (COSTA et al., 2005).

## 2.2 BENZOFENONAS

As benzofenonas (BFs) são cetonas aromáticas, naturais ou sintéticas, de grande interesse científico e com inúmeras aplicações devido à variedade de suas propriedades biológicas e físico-químicas. São formadas por dois anéis aromáticos ligados por um grupo carbonila, podendo apresentar diferentes substituintes que alteram suas características estereoeletrônicas (MANTAS; BLANCO; FERRETI, 2004).

As benzofenonas são alvos de contínuas investigações de interesse biológico devido às suas propriedades fotoprotetoras (YESUDIAN, 2002), antimicrobianas (BAKANA et al., 1987; FULLER et al., 1999; RUBIO et al., 1999; VOOTURI et al., 2009), leishmanicidas (PEREIRA et al., 2010), antiproliferativas (MURATA et al., 2010) e anti-inflamatórias (BANDGAR et al., 2010; MURATA et al., 2008; SANTA-CECÍLIA et al., 2011).

A atividade anti-inflamatória consiste em uma das mais citadas pela literatura (BANDGAR et al., 2010). A 7-*epi*-clusianona, uma benzofenona natural poliisoprenilada isolada de *Garcinia brasiliensis*, usada na medicina tradicional para o tratamento de doenças inflamatórias, teve sua atividade anti-inflamatória avaliada através do ensaio de edema de pata induzido por carragenina e de peritonite. Os resultados desses ensaios revelaram que, para as doses de 5, 10 e 15 mg/Kg a 7-*epi*-clusianona exibiu efeito anti-inflamatório, o qual foi demonstrado pela redução do edema de pata induzido por carragenina e pela inibição do recrutamento de leucócitos para o interior da cavidade peritoneal (SANTA-CECÍLIA et al., 2011).

Bandgar e colaboradores (2010) sintetizaram uma nova série de análogos de benzofenonas, contendo nitrogênio, e os compostos foram avaliados quanto à inibição de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6. Todos os compostos sintetizados exibiram uma atividade promissora. Outra série de análogos da benzofenona-*N*-etil piperidina foi sintetizada e submetida a avaliação da atividade anti-inflamatória através do ensaio edema de pata induzido por carragenina,

obtendo-se resultados satisfatórios (KHANUM et al., 2009).

O cetoprofeno, por exemplo, é um fármaco pertencente ao grupo dos anti-inflamatórios não-esteróides (AINES) e exibe ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica, sendo o mesmo uma benzofenona sintética (SAKEENA et al., 2010).

A aplicação de produtos tópicos contendo benzofenonas vêm sendo bastante utilizada, tanto para proteção solar quanto para inflamações de diversas naturezas. A benzofenona-3 (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona), também conhecida como oxibenzona, Eusolex 4360®, metanona e difenilcetona é um derivado benzofenônico utilizado em aplicações tópicas como filtro solar químico. Efetivamente absorve luz UVB (290 a 320 nm) e também parte da luz UVA (320 a 360 nm) e pouca luz UVC (250 a 290 nm) (FLOR et al., 2007; MARTINDALE, 1999; YESUDIAN, 2002). O uso dermatológico do cetoprofeno (ácido (*RS*)-2-(3-benzoil-fenil)propanóico) é indicado para tratamento tópico de inflamações e dores em geral. O cetoprofeno inibe a atividade da enzima ciclooxigenase, provocando uma diminuição da formação de precursores das prostaglandinas e dos tromboxanos, a partir do ácido araquidônico (CIRRI et al., 2012; JORGE; FERES; TELES, 2010; KOMATSU; SAKURADA, 2012).

Com base nas atividades farmacológicas promissoras das benzofenonas, outros compostos derivados das benzofenonas foram sintetizados no laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL – LFQM (REZENDE et al., 2013), entre eles a 2-hidroxi-4-O-(3,3-dimetil)-alilbenzofenona (LFQM117), representada na Figura 1.

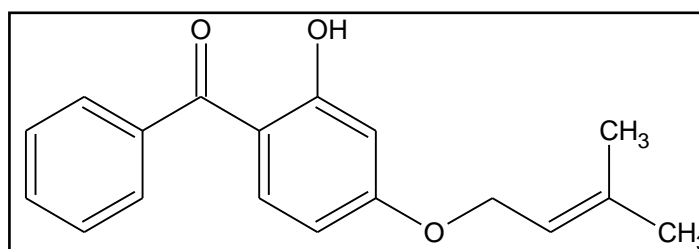


Figura 1 – Estrutura química da LFQM117  
Fonte: Da autora

Baseando-se nas atividades farmacológicas descritas para as benzofenonas em geral e para a substância LFQM117 houve o interesse em desenvolver

formulações anti-inflamatórias de uso tópico contendo a substância LFQM117, uma molécula inédita em que as características físico-químicas, a metodologia analítica, o comportamento em sistemas tópicos de liberação de fármacos e o mecanismo de ação da mesma ainda não foram estudados.

### 2.3 TERAPIA TÓPICA E PENETRAÇÃO CUTÂNEA

A pele é um órgão com múltiplas camadas que tem a função essencial de proteger o corpo do meio externo, sendo uma barreira eficiente para evitar a absorção de moléculas exógenas (ANISSIMOV et al., 2013; DARLENSKI et al., 2009; GODIN; TOUITOU, 2007; JEPPS et al., 2012).

A estrutura da pele é basicamente formada pela epiderme e derme. A derme possui entre 3 e 5 mm de espessura, tendo como composição uma mistura de proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e um gel interfibrilar de glicosaminoglicanas, sais e água. Vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas estão embebidos na derme. Os folículos pilosos e os dutos das glândulas sudoríparas se abrem diretamente para o meio externo da superfície da pele (CEVC; VIERL, 2010; EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014; NOTMAN; ANWAR, 2013).

A epiderme não possui vascularização e os nutrientes precisam se difundir da junção dermo-epidérmica para manter sua viabilidade. A epiderme tem uma estrutura de cinco camadas que representam os diferentes estágios de diferenciação celular. A sequência de camadas, de dentro para fora, são o estrato germinativo (camada basal), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo. Excluindo-se a camada córnea, mais externa, tem-se a epiderme denominada viável (WILLIAMS; BARRY, 2012).

A epiderme viável localiza-se logo abaixo do estrato córneo (EC) e é composta por uma faixa de células vivas, incluindo células de Langerhans com alta sensibilidade imunológica, queratinócitos, células tronco e melanócitos. Ao contrário da camada mais profunda constituída pela derme, a epiderme viável carece de vasos sanguíneos e terminações nervosas, o que confere características importantes de sítio indolor e não invasivo para a veiculação de fármacos (MATHES;

RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014; NOTMAN; ANWAR, 2013; WILLIAMS; BARRY, 2012).

O EC é formado por células densas, funcionalmente mortas, anucleadas e preenchidas com queratina, sendo denominadas corneócitos. O conteúdo intercelular é composto por uma mistura lipídica de ceramidas, colesterol, ésteres de colesterol, ácidos graxos e uma pequena fração de sulfato de colesterol, que formam diversas bicamadas ao redor dos corneócitos. O arranjo do estrato córneo é análogo a uma parede de “tijolos e cimento”, com os corneócitos representados como os tijolos e os lipídeos intercelulares como o cimento (ANISSIMOV et al., 2013; CEVC; VIERL, 2010; EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; JEPPS et al., 2012).

Provavelmente uma das funções mais importantes da pele seja a capacidade de funcionar como barreira para a difusão molecular, que é assegurada pela camada mais externa, o estrato córneo (EC) (ANISSIMOV et al., 2013; DARLENSKI et al., 2009; JEPPS et al., 2012; KALIA et al., 2001).

Os meios pelos quais moléculas de um fármaco podem penetrar a pele incluem a penetração através do EC e/ou através dos anexos cutâneos (foliculos pilosos, ductos sudoríparos, glândulas sebáceas e sudoríparas). Entretanto, como estes últimos representam uma fração pequena da área superficial da pele, admite-se que a penetração de fármacos por estas vias seja comparativamente de menor importância (ALEXANDER et al., 2012; FRASCH; BARBERO, 2013; KRETSUS et al., 2008; NOTMAN; ANWAR, 2013).

A penetração de substâncias através do EC pode ocorrer através das rotas transcelular, intercelular e folicular, conforme demonstrado na Figura 2. Desta maneira, atribuiu-se a impermeabilidade da pele a dois fatores principais: ao caminho tortuoso e ao problema de partição repetida e da difusão através da estrutura de bicamadas (HADGRAFT, 2001).

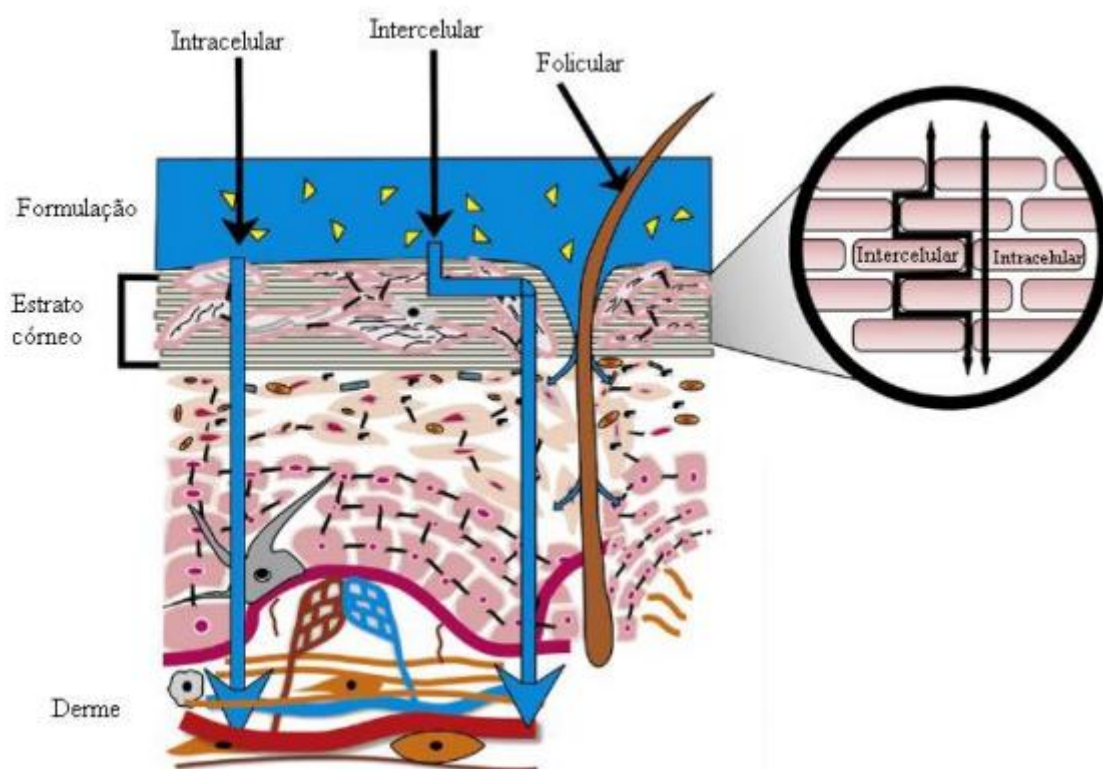


Figura 2 – Representação das rotas de permeação cutânea.  
 Fonte: Adaptado de Alexander, A. et al., 2012

A permeação de substâncias na pele depende, principalmente, de suas propriedades físico-químicas, do seu comportamento quando colocado em um sistema farmacêutico apropriado e, finalmente, da pele (CHORILLI et al., 2007). Em razão disso, cada combinação fármaco/forma farmacêutica deve ser examinada individualmente com rigoroso critério de avaliação na etapa que precede o desenvolvimento farmacotécnico (etapa de pré-formulação) para, somente após isso, realizar os estudos de permeação cutânea e eficácia (SILVA, 2008).

A absorção de fármacos na pele também é afetada por fatores como espessura da pele, temperatura, grau de hidratação, limpeza da pele, fluxo sanguíneo, concentração de lipídios, número de folículos pilosos, função das glândulas sudoríparas, etnia, pH na superfície da pele e integridade do estrato córneo (WOKOVICH et al., 2006).

Com relação ao fármaco, as propriedades físico-químicas ideais de uma molécula para penetrar no estrato córneo são: baixo peso molecular, em geral, menor que 600 Da; solubilidade adequada em lipídeos e água, de tal forma que o gradiente de concentração, que direciona a força de difusão, seja elevado; um valor de coeficiente de partilha óleo/água alto mas balanceado (geralmente recomendável

um log  $Ko/a \sim 2$ ); baixo ponto de fusão ( $< 200$  °C), correlacionando com boa solubilidade como predito pela teoria da solubilidade ideal (DELGADO-CHARRO; GUY, 2014; FARAHMAND; MAIBACH, 2009; KALIA; GUY, 2001; WILLIAMS; BARRY, 2012).

É importante assinalar que o desenvolvimento de formulações que garantam uma penetração eficiente através da barreira do EC é fundamental, já que a forma farmacêutica tem importância na absorção do fármaco. Nesse sentido, alguns aspectos devem ser considerados, tais como natureza e concentração de ingredientes ativos, tipo de excipientes e tipo de sistema usado para transportar o fármaco (CHORILLI et al., 2007; SILVA et al., 2009).

Entre os excipientes farmacêuticos usados para favorecer a permeação cutânea estão os promotores de absorção cutânea que são substâncias farmacologicamente inertes que podem permear ou interagir com os constituintes do EC quando incorporados em uma formulação e, desse modo, diminuir a resistência da pele à difusão do fármaco (ALEXANDER et al., 2012; CHOI et al., 2012; MÉLOT et al., 2009; PEREIRA et al., 2002).

Algumas das propriedades mais desejáveis para os promotores de permeação química, segundo Williams e Barry (2012) são:

- a) não devem ser tóxicos ou provocar irritações e alergias;
- b) devem agir de modo rápido, com atividade e duração de efeitos previsíveis e reprodutíveis;
- c) não devem ser fototóxicos ou comedogênicos;
- d) não devem ter atividade plasmática dentro do corpo, ligando-se a receptores locais;
- e) devem agir de modo a permitir que o agente terapêutico adentre a pele;
- f) devem permitir que as propriedades de barreira da pele retornem rapidamente e completamente quando forem removidos da pele; ,
- g) devem ser apropriados para a formulação e serem compatíveis com o excipiente e o fármaco;
- h) devem ser cosmeticamente aceitáveis com as propriedades da pele, além de inodoro, incolor e insípido.

Os mecanismos propostos para ação dos promotores químicos de permeação cutânea segundo Hadgraft e Lane (2005) e Allen; Ansel; Popovich (2013) são:

- a) redução da resistência do estrato córneo devido à alteração de suas propriedades físico-químicas;
- b) alteração da hidratação do estrato córneo;
- c) alteração da estrutura lipídica e lipoprotéica dos canais intercelulares pela desnaturação ou ação de solventes, e mecanismos de transporte dos princípios ativos ionizáveis.

O modo de ação dos promotores de permeação em geral é complexo. É clinicamente aceitável que a maioria dos promotores de permeação interage com os lipídios intercelulares do estrato córneo (WILLIAMS; BARRY, 2012).

A permeação cutânea de fármacos tem sido aumentada por uma variedade de ácidos graxos, sendo o mais popular deles o ácido oléico. De acordo com a literatura, os ácidos graxos têm sido utilizados para melhorar a liberação transdérmica de estradiol, progesterona, aciclovir, 5-fluorouracil e ácido salicílico, indicando que estes promotores podem ser usados para liberação de substâncias tanto hidrofílicas quanto lipofílicas (WILLIAMS; BARRY, 2012).

O ácido oléico (OA) é um promotor rotineiramente usado e seu mecanismo de ação tem sido amplamente estudado (KASLIWAL et al, 2008). Segundo Williams e Barry (2012), o OA tem maior atividade promotora em baixas concentrações (normalmente menores que 10%) e pode atuar sinergicamente quando combinado a outros excipientes, como, por exemplo, o propilenoglicol.

Além do uso desses tipos de excipientes, sistemas carreadores como as micro e nanoemulsões, as nanopartículas e os cristais líquidos podem levar a um aumento da permeação de fármacos através da pele (LOPES; SPERETTA; BENTLEY, 2007; SILVA et al., 2009; YULIN; PING; SHUANGYING, 2014; ZHAO et al., 2009). Os sistemas micro e nanoemulsionados são capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais possuem propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biológicas dos fármacos incorporados. Além disso, esses sistemas melhoram a solubilização de fármacos lipofílicos em água e os protegem contra hidrólise enzimática, além de aumentar o potencial de absorção devido à presença de tensoativo. A natureza e estrutura do tensoativo, co-tensoativo e óleo são fatores essenciais na formulação de sistemas microemulsionados (FORMARIZ; URBAN; SILVA JÚNIOR, 2005). As pesquisas abordando nanopartículas têm progredido bastante nos últimos dez anos e estão sendo

amplamente utilizadas em cosméticos, medicamentos e produtos domésticos. Devido ao seu pequeno tamanho, especula-se que as nanopartículas possam atravessar barreiras biológicas como a pele e, assim, funcionar como veículo para a aplicação tópica de produtos farmacêuticos (KARADZOVSKA et al., 2013).

## 2.4 CRISTAIS LÍQUIDOS

Os cristais líquidos (CLs) são conhecidos desde 1889, quando Lehmann descreveu um estado intermediário na transformação térmica a partir do estado sólido para o líquido. Em 1922, Friedel usou o termo “estado mesomórfico” (*mesos* – intermediário e *morphé* – forma) para definir este quarto estado da matéria; com isso, os CLs passaram a ser denominados como fases mesomórficas ou mesomórficas cristalinas (CHORILLI et al., 2009).

Esta fase intermediária apresenta propriedades características tanto de sólidos quanto de líquidos, ou seja, possui ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como os sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos (TYLE, 1989). Os CLs podem ser divididos em duas principais classes: os termotrópicos e os liotrópicos. Na classe dos termotrópicos, o estado líquido cristalino se forma através da variação da temperatura a que a substância é submetida, ou seja, quantidade de energia disponível para as moléculas se organizarem. Portanto, se formam a uma dada temperatura e por isso são pouco estáveis. São classificados em duas categorias: nemáticos, cujas moléculas se organizam de forma paralela, e os esméticos, cujas moléculas encontram-se de forma estratificada, mantendo-se em camadas. Já na classe dos liotrópicos, o estado se forma quando certos componentes, geralmente substâncias anfífilas, são tratados com alguns solventes como, por exemplo, a água.

Nas últimas duas décadas, sistemas líquido-cristalinos têm atraído grande atenção devido às suas aplicações em diversas áreas. O grande interesse nesses sistemas está na possibilidade de criar partículas estruturadas mediante o uso de métodos instantâneos e modular as forças formadas através de estímulos fisiológicos como pH, temperatura e força iônica (KRAINEVA et al., 2005).

Estes sistemas apresentam características interessantes para um sistema

de liberação tópico, tais como estrutura de camada lipídica e forma de gel, capacidade de controlar a liberação de fármacos incorporados e a possibilidade de incorporar promotores de absorção cutânea na formulação (LEE; KELLAWAY, 2000b; LOPES et al., 2006; SHAH; SADHALA; CHILUKURI, 2001).

Sistemas líquido-cristalinos são caracterizados por alta ordenação interna e simetria com ampla área interfacial e também apresentam a capacidade de incorporar moléculas hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas e modular a liberação dessas substâncias (BOYD et al., 2006). As fases mais comumente encontradas são: lamelar, hexagonal e cúbica (MISHRAKI et al., 2010), como representa a Figura 3.



Figura 3 - Representação esquemática das diversas fases líquido-cristalinas formadas pela monoleína em presença de água.

Fonte: Adaptado de SEDDON, A., 2010.

A fase lamelar caracteriza-se por intercalar bicamadas lipídicas com a fase aquosa, nas quais os grupamentos polares das moléculas localizam-se adjacentes e projetados para a fase aquosa, enquanto as caudas hidrocarbonadas encontram-se dispostas paralelamente formando uma rede unidimensional. Essa fase é caracterizada por sua fluidez e anisotropia na forma de mosaico planar e ou cruces malteses (TYLE, 1989).

A fase hexagonal é formada por longas estruturas cilíndricas, ocorrendo em duas formas: (i) a fase reversa, formada por canais aquosos circundados pelas cabeças polares do tensoativo, com a porção apolar localizada ao redor dos cilindros; e (ii) a fase normal, onde as cabeças polares do tensoativo localizam-se na região externa dos cilindros. Sua obtenção torna-se possível pela adição de

compostos apolares ao sistema, como, por exemplo, o ácido oléico. O gel de fase hexagonal apresenta-se anisotrópico ao campo de luz polarizada, com textura estriada não geométrica ou em formato de placas; sua menor viscosidade em relação à fase cúbica é uma importante propriedade que facilita suas aplicações práticas (BORNÉ; NYLAMDER, KHAN, 2001; LIBSTER et al., 2009; NORLING et al., 1992).

A estrutura da mesofase cúbica é formada por uma bicamada lipídica curva e contínua (com uma espessura de aproximadamente 3,5 nm) que se estende em três dimensões, separando dois canais congruentes de água de aproximadamente 5 nm quando hidratado. O gel de fase cúbica apresenta-se transparente, bastante viscoso, isotrópico e termodinamicamente estável na presença de excesso de água (GUO et al., 2010).

A elucidação da estrutura interna de um sistema líquido cristalino, além de ser muito importante, é também complexa. Técnicas como espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS), espalhamento de luz (*light scattering*), microscopia eletrônica de transmissão e ressonância magnética nuclear estão sendo cada vez mais utilizadas. Outros métodos mais comuns, como a condutividade iônica, medidas reológicas, espectroscopia de fotocorrelação, microscopia de luz polarizada, entre outros, também são frequentemente utilizados para o estudo do comportamento físico-químico interno de tais sistemas (CHORILLI et al., 2009).

A microscopia de luz polarizada é uma ferramenta vital para a identificação dos materiais líquido-cristalinos. Sob um plano de luz polarizada, uma substância pode ser classificada como anisotrópica ou isotrópica (ABRAMOWITZ et al., 2005). A amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano de luz incidente, como é o caso dos arranjos hexagonal e lamelar, ou isotrópica, se não desviar a luz, como é o caso do arranjo cúbico, que só é detectado com outras técnicas de análise, como o SAXS. O arranjo hexagonal apresenta uma forma chapada típica, com os agregados de tensoativo organizados em cilindros. O arranjo lamelar apresenta-se com várias camadas (lamelas) sobrepostas, formando estruturas denominadas “cruzes-de-malta” e também alongados oleosos (CLOGSTON et al., 2000; CHORILLI et al., 2009; FORMARIZ, 2005; FUJII et al., 2012; MILAK, 2015; MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Na caracterização de sistemas líquido-cristalinos a observação da

viscosidade fornece idéias relacionadas ao arranjo das moléculas de tensoativo num sistema tensoativo/água/óleo. A fase lamelar geralmente apresenta-se como líquido viscoso e a fase hexagonal tem a viscosidade semelhante à de um gel, enquanto que a viscosidade da fase cúbica é extremamente elevada (CHORILLI et al., 2009).

A utilização de CLs em produtos de uso tópico apresenta vantagens funcionais relacionadas aos fatos de promoverem liberação controlada de substâncias ativas; incorporarem princípios ativos em matrizes líquido-cristalinas ou mesmo em formulações que os contenham, pois os CLs protegem as substâncias ativas sensíveis à degradação térmica ou fotodegradação; promoverem aumento da retenção de água no estrato córneo, proporcionando aumento na hidratação cutânea (CHORILLI et al., 2009).

A monoleína, monoleato de glicerila, é um lipídeo polar, atóxico e biodegradável, o qual atua como promotor de absorção cutânea e é capaz de absorver água e formar cristais líquidos (FORMARIZ, 2005; LOPES, 2006; MILAK, 2015; PEREIRA, 2002). Os sistemas líquido-cristalinos de monoleína e água têm sido estudados como carreadores de fármacos em várias formas farmacêuticas, como matrizes semisólidas, implantes subcutâneos e intramusculares, sistemas bioadesivos, dispersões de nanopartículas, entre outros. E os autores reportam a capacidade destes sistemas de sustentar a liberação de fármacos e de incorporar fármacos hidrofílicos e lipofílicos (CREMONEZ; BENTLEY; LARA, 2013; FORMARIZ et al., 2005; LOPES et al., 2006; MILAK et al., 2015; PEREIRA et al., 2002). Fármacos hidrofílicos incorporados ficam localizados próximos à cabeça polar da monoleína ou nos canais de água, enquanto fármacos lipofílicos ficam localizados dentro da bicamada lipídica e fármacos anfifílicos ficam localizados na interface (GUO et al., 2010).

A formação de diferentes fases líquido-cristalinas ocorre com a hidratação das porções hidrofílicas da monoleína por um solvente hidrofílico, como a água, através de ligações de hidrogênio, enquanto as cadeias alifáticas se agregam com base em interações de Van de Waals. Além da dependência dos constituintes na determinação da estrutura líquido-cristalina, cristais líquidos liotrópicos também são sensíveis a parâmetros externos como temperatura, pressão (LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011) e aditivos (ROSSETTI et al., 2011).

A geometria molecular da anfifila possui um importante papel na determinação do tipo da mesofase líquido-cristalina que será formada. Dessa

maneira, a teoria do fator de empacotamento pode ser utilizada para prever a geometria molecular do sistema anfifila/água. Dependendo do valor do fator de empacotamento, diferentes mesofases líquido-cristalinas podem ser obtidas decorrentes da auto-organização das moléculas da anfifila no ambiente hidrofílico (FONG; LE; DRUMMOND, 2012; GUO et al., 2010).

A literatura revela diversos fatores que podem influenciar o comportamento das mesofases cúbica e hexagonal. A adição de um terceiro ao sistema anfifila/água como o ácido oléico, trioleína, monoleato de diglicerol, vitamina E, dentro outros, pode modular a textura das mesofases líquido-cristalinas e resultar em transição de fase. Variações de temperatura e pressão, concentração de sais e pH também podem induzir a transição de fase nos sistemas líquido-cristalinos (FERREIRA et al., 2006; FONG; HANLEY; BOYD, 2009; GUO et al., 2010; PHAN et al., 2011).

O desenvolvimento de formas farmacêuticas capazes de liberarem o fármaco e/ou permanecerem no local de aplicação por tempo prolongado é interessante, pois garante a presença do fármaco no sítio de ação por determinado período de tempo, sem a necessidade de repetidas aplicações do produto. Sistemas líquido-cristalinos de monoleína e água podem ser usados como sistemas de liberação de fármacos com esta característica, o que é bastante interessante para um produto de uso tópico (CREMONEZ; BENTLEY; LARA, 2013). Nesse sentido, o presente trabalho pretende explorar o uso de cristais líquidos como veículos para o desenvolvimento de formulação tópica contendo a benzofenona LFQM117.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi desenvolver uma formulação tópica contendo a benzofenona LFQM117 e avaliar esta formulação através de estudos de penetração cutânea *in vitro* e *in vivo* e estudo da ação anti-inflamatória *in vivo*.

Os objetivos específicos deste trabalho estão citados a seguir:

- a) desenvolver e validar uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de LFQM117;
- b) realizar a caracterização físico-química da LFQM117 através de espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR-FTIR), análise térmica, determinação de solubilidade, determinação do coeficiente de partilha óleo/água e estudo de estabilidade;
- c) obter formulações de aplicação tópica e avaliar estratégias de otimizar a penetração e retenção cutânea *in vitro* da LFQM117;
- d) estudar a cinética de retenção cutânea *in vitro* da LFQM117 a partir da formulação selecionada;
- e) caracterizar a formulação selecionada;
- f) estudar a cinética de retenção cutânea *in vivo* da LFQM117 a partir da formulação selecionada;
- g) estudar a atividade anti-inflamatória da LFQM117 após a aplicação da formulação *in vivo*;
- h) elucidar o mecanismo de ação da LFQM117.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental desse trabalho esta dividida em material, metodologia e análise estatística dos resultados.

### 4.1 MATERIAL

Os padrões, reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram: 2-hidroxi-4-O-(3,3-dimetil)-alilbenzofenona (LFQM117), acetonitrila grau HPLC JT Baker®; ácido clorídrico Vetec®, ácido acético grau HPLC JT Baker®, água ultrapura, cloreto de potássio P.A. Vetec®, cloreto de sódio P.A. Vetec®, fosfato de potássio monobásico anidro P.A. Vetec®, fosfato de sódio dibásico anidro P.A. Vetec®, fosfato de sódio monobásico monoidratado P.A. Vetec®, hidróxido de sódio (lentilhas) P.A. Vetec®, metanol grau HPLC JT Baker®, óleo mineral (vaselina líquida) Vetec®, peróxido de hidrogênio 30% P.A. Vetec®, soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 Vetec®, cremophor EL Sigma-Aldrich®, ácido oléico Synth®, tween 20 Vetec®; tween 80 Vetec®, span 20 Sigma-Aldrich®, span 80 Sigma-Aldrich®, álcool isopropílico grau HPLC Vetec®, etanol P.A Vetec®, monoleína Quest International®, propilenoglicol (PPG) Vetec®.

Os equipamentos e acessórios utilizados foram: agitador magnético com chapa de aquecimento Marconi® modelo MA-085, banho ultrassom Unique®, balança analítica Shimadzu® modelo AUY 220, balança analítica Bioprecisa® modelo FA2104N, bomba de vácuo Solab® modelo SL 61, célula de difusão vertical Hanson Research®, coluna cromatográfica C<sub>18</sub> LiChrospher® RP-select B (125,0 x 4,0 d.i.) mm com partículas de 5 µm Merck® e pré-coluna LiChrospher® RP-select B (4,0 x 3,0 d.i.) mm Merck®, coluna cromatográfica C18 XTerra RP C18, 5µm, (100 x 4.6 d.i.) mm com partículas de 5 µm Waters®, dermatômetro Nouvag AG® no 1990, estufa de secagem e esterilização com circulação de ar Solab Científica®, filtros de seringa Millex® com membrana de PTFE modificada 0,45 µm, medidor de pH MS Tecnopon Instrumentação® molelo mPA-210, homogeneizador de tecidos tipo TURRAX modelo MA102, centrífuga CELM® modelo LS-3 plus, centrífuga Sigma

Laborzentrifugen® modelo 2k15, membrana para filtração de solventes aquosos e orgânicos de fase móvel Millipore® em PTFE modificado 0,45 µm, fita adesiva transparente Scotch 3M® 18 mm x 50 m, papel de filtro quantitativo faixa azul J. Prolab® 11 cm, pipetador automático Kacil® de volume ajustável 100 - 1000 µL, pipetador automático Kacil® de volume ajustável 40 - 200 µL, pipetador automático Digipet® de volume ajustável 10 - 100 µL, pipetador automático Digipet® de volume ajustável 1 - 5 mL, sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu® com sistema controlador modelo CBM-20A, módulo de injeção automática modelo SIL-20AHT, e detector ultravioleta modelo SPD-20<sup>a</sup>, sistema Millipore® para filtração de solventes de fase móvel, sistema de purificação de água Milli-Q Direct 16 - Millipore®, microscópio de luz polarizada (Olympus SZ61TR) com capturador de imagem (DCM130E, 1.6 Megapixels), espectrofotômetro Thermo Electron corporation Genesys 10 uv scanning.

## 4.2 METODOLOGIA

O Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLAE para determinação de LFQM117 em estudos de permeação e retenção cutânea fazem-se importantes, uma vez que possibilitam quantificar, de forma segura e precisa, os valores de LFQM117 permeados e retidos em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os estudos de caracterização de uma molécula nova são essenciais para identificar, bem como prever as características físico-químicas como estabilidade térmica, solubilidade, coeficiente de partição e estabilidade em diferentes condições de estresse.

Nesta seção estão descritas as diversas técnicas empregadas na execução deste trabalho.

### **4.2.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLAE para determinação de LFQM117 em estudos de permeação e retenção cutânea.**

O método analítico para determinação de LFQM117 por CLAE foi desenvolvido em modo de fase reversa e empregando detector UV. Os parâmetros do método, tais como, coluna cromatográfica, comprimento de onda para detecção, composição e vazão de fase móvel, foram padronizados conforme avaliação da separação de interferentes da matriz (meio receptor e pele de orelha de porco) e cálculo dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico (tempo de retenção,  $k'$ ,  $N$  e assimetria dos picos cromatográficos), determinados de acordo com a USP 35-NF 30 (2012). Posteriormente o método foi validado quanto aos parâmetros seletividade, linearidade e intervalo, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão e exatidão (intra e interdias), recuperação e estabilidade (BRASIL, 2012; ICH, 2005; USA, 2001).

#### 4.2.1.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade, soluções padrões de LFQM117 na concentração de 20,0 µg/mL, preparadas em metanol e em tampão fosfato pH 7,4 (solução receptora utilizada nos estudos de permeação cutânea) foram injetadas no sistema cromatográfico. A pureza cromatográfica dos picos referentes à LFQM117 foi determinada por meio de varreduras espectrais na região do UV (200-370 nm) usando detector de DAD, sendo possível estabelecer o índice de similaridade espectral. Diferentes diluentes (tampão fosfato pH 7,4 + Cremophor®, metanol, extrato metanólico de pele e extrato metanólico de fita adesiva) foram analisados na ausência de LFQM117 de modo a avaliar a eluição de possíveis interferentes no tempo de retenção da LFQM117.

#### 4.2.1.2 Linearidade e intervalo

Para avaliar a linearidade do método preparou-se solução padrão estoque de LFQM117 em metanol na concentração de 1,0 mg/mL e diluições sucessivas foram realizadas de modo a obter soluções padrões nas concentrações de 0,10;

0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 10,00 e 20,00 µg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo possível a determinação do coeficiente de correlação ( $r$ ) e da equação de reta  $y = ax + b$ .

#### 4.2.1.3 Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão do método, seis amostras de concentrações 0,10, 1,00 e 10,00 µg/mL foram analisadas juntamente com a curva de calibração, em um mesmo dia para avaliar a precisão e a exatidão intra-ensaio, e em 3 dias consecutivos para avaliar a precisão e a exatidão interensaio. A precisão está relacionada com a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio, e é expressa matematicamente através da porcentagem do coeficiente de variação (% CV), calculada pela seguinte equação: % CV = (desvio padrão/média) X 100

A exatidão, que corresponde à diferença entre o valor obtido após a análise e o valor real da amostra, é calculada pela equação:

$$E = (\text{valor obtido} - \text{valor real} / \text{valor real}) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

#### 4.2.1.4. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto e inclinação média da curva, conforme a equação  $LQ = (DPa \times 3,3)/IC$ , em que: DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas analíticas; IC = inclinação da curva analítica.

#### 4.2.1.5 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) representa a concentração mais baixa da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais especificadas. Para a determinação do limite LQ utilizou-se a equação  $LQ = (DPa \times 10)/IC$ , em que; DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas analíticas; IC = inclinação da curva analítica.

#### 4.2.1.6 Estabilidade

A estabilidade da LFQM117 em solução metanólica foi determinada mantendo soluções padrões de LFQM117 na concentração de 5,0 µg/mL à temperatura ambiente por um período de 24h. Análises foram realizadas para quantificação do fármaco logo após o preparo e após esse período de 24h. Os ensaios foram realizados em triplicata. O valor inicial foi estabelecido como 100,0% e a variabilidade a partir do resultado inicial foi calculada.

#### 4.2.1.7 Estudo de recuperação

Para o estudo de recuperação da extração da LFQM117 do estrato córneo procedeu-se a retirada do EC de uma área de 1,77 cm<sup>2</sup> da pele de orelha de porco com o uso de 16 fitas adesivas tipo durex (tape stripping). Este procedimento foi feito em triplicata. As fitas contendo o estrato córneo foram colocadas em tubos falcon de 50 mL e contaminadas com LFQM117 através da adição de 10, 20 e 30 µL de solução de LFQM117 em metanol, para a obtenção das concentrações de 0,2; 0,4 e 0,6 µg/mL, respectivamente. O metanol foi evaporado e em seguida procedeu-se a extração da LFQM117 adicionando-se 5 mL de metanol em cada tubo, os quais foram submetidos à agitação, por 3 minutos, em agitador tipo vortex e depois submetidos à centrifugação por 15 minutos a 969 g. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro quantitativo, seguido por uma filtração em filtro Millex® e analisado por CLAE-UV.

Para o estudo de recuperação da extração da LFQM117 da pele, pedaços de pele dermatomizada correspondentes a uma área de 1,77 cm<sup>2</sup>, após a retirada do EC, foram picotados com o auxílio de uma tesoura e transferidos para tubos Falcon de 50 mL. Este procedimento foi feito em triplicata. Os fragmentos de pele foram contaminados com LFQM117 através da adição de 10, 20 e 30 µL de solução de LFQM117 em metanol, para a obtenção das concentrações de 0,2; 0,4 e 0,6 µg/mL, respectivamente. O metanol foi evaporado e em seguida procedeu-se a extração da LFQM117 da pele adicionando-se 5 mL de metanol em cada tubo, os quais foram submetidos à homogeneização em homogeneizador do tipo Ultra Turrax, por 5 minutos e, em seguida, foram colocados em banho de ultra-som por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro quantitativo, seguido por uma filtração em filtro Millex® e analisado por CLAE-UV.

A porcentagem de recuperação (*R*) foi calculada conforme a equação:

$$R = (\text{Concentração encontrada} / \text{Concentração teórica}) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

#### 4.2.2 Caracterização físico-química da LFQM117

Para a caracterização físico-química da LFQM117 foram realizadas análises de identificação como análise da LFQM117 por ATR-FTIR com e sem aquecimento, análises de decomposição térmica, como análise da LFQM117 por ATR-FTIR com aquecimento e análise térmica e análises para prever o comportamento da molécula em relação à solubilidade, coeficiente de partição octanol/água e estabilidade frente a diversas condições de estresse.

##### 4.2.2.1 Análise da LFQM117 por ATR-FTIR

Foi realizada varredura espectral da LFQM117 utilizando espectroscopia na região do infravermelho (IV) com transformada de Fourier usando o modo de transmitância e refletância total atenuada (ATR-FTIR). Os espectros foram obtidos

na faixa de comprimento de onda de  $3500 - 500 \text{ cm}^{-1}$ , sendo as amostras colocadas diretamente sobre o cristal de reflexão. Os espectros foram normalizados e as bandas associadas aos grupamentos químicos foram avaliadas para caracterização dos materiais.

Estudos adicionais foram realizados utilizando ATR-FTIR acoplada ao módulo “hot stage” para caracterização da substância. Os espectros foram obtidos em diferentes temperaturas de 30 até  $230^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.2.2 Análise Térmica

A análise termogravimétrica foi realizada com 3,5 mg da LFQM117 em cadinho de alumínio. A análise foi realizada em atmosfera dinâmica com fluxo de nitrogênio constante de 50 mL/min, no intervalo de temperatura de 30 a  $500^\circ\text{C}$  com razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .

#### 4.2.2.3 Determinação dos coeficientes de solubilidade de LFQM117 em diversos veículos

Foram determinadas as solubilidades de LFQM117 nos seguintes veículos: água; álcool isopropílico; tampão fosfato pH 5,0; tampão fosfato pH 7,4; tampão fosfato pH 7,4 com Tween 20 a 5%; tampão fosfato pH 7,4 com Tween 80 a 5%; tampão fosfato pH 7,4 com laurilsulfato de sódio a 5%; tampão fosfato pH 7,4 com Pluronic® a 5%; e tampão fosfato pH 7,4 com Cremophor® a 10%. Para esta determinação foi utilizado o método proposto por Wells (1988), em que um excesso de LFQM117 foi adicionado a 10,0 mL de cada veículo em um erlenmeyer, o qual foi tampado e submetido a um processo de agitação a 300 rpm por 24 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a filtração em papel de filtro quantitativo, seguida por uma filtração Millex® ( $0,45 \mu\text{m}$ ) e quantificação por CLAE-UV.

#### 4.2.2.4 Determinação do coeficiente de partição octanol/água

O coeficiente de partição octanol/água de LFQM117 foi determinado utilizando-se o método indireto por CLAE (MINICK et al., 1988; TAVARES, 2004) numa coluna C18 (XTerra RP C18, 5 $\mu$ m, 4,6x100mm, Waters) acoplada a um detector de ultravioleta ( $\lambda = 254$ nm). A fração orgânica da fase móvel foi constituída por metanol com 0,25% (v/v) de *n*-octanol e a aquosa por tampão fosfato de potássio monobásico, ajustada a pH 7,4 com NaOH e, posteriormente, saturada com *n*-octanol. Dissolveu-se a substância em metanol (0,1mg/ml) e o volume injetado na coluna foi de 20 $\mu$ l. Fixou-se a vazão da fase móvel em 0,5 ml/min.

Efetuarão-se três corridas cromatográficas com seis diferentes proporções de fase móvel orgânica: 65%, 70%, 75%, 80%, 85% e 90%. Com os dados obtidos construiu-se um gráfico  $\log k'$  vs. % de fase móvel orgânica. Os valores de  $k'$  são definidos como  $(t_r - t_0)/t_0$ , onde  $t_r$  e  $t_0$  são os tempos de retenção da substância analisada e do solvente (tempo morto da coluna), respectivamente. Estes valores de  $k'$  foram então extrapolados para os que ocorreriam numa fase móvel 100% aquosa, ou seja,  $\log k'_w$ , através da equação de relação linear obtida com o gráfico. O valor da lipofilia foi então calculado através da seguinte equação, que demonstra uma correlação positiva perfeita ( $r^2=0,996$ ) entre as duas variáveis:

$$\log P = 0,13418 + 0,98452 \cdot \log k'_w \quad (\text{Equação 3})$$

#### 4.2.2.5 Estudos de estabilidade da LFQM117

A estabilidade da LFQM117 foi avaliada através de estudos de degradação forçada empregando diferentes condições de estresse (solução ácida, solução alcalina, temperatura, solução oxidante e exposição à luz) para identificar e separar possíveis produtos da degradação do fármaco. Todas as soluções do fármaco foram preparadas na concentração teórica de 20,0  $\mu$ g/mL. A recuperação do fármaco ( $R$ ) após ser submetida à condição de degradação forçada foi calculada conforme

apresentado na equação abaixo:

$$R = (\text{Concentração encontrada} / \text{Concentração teórica}) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

#### **4.2.3 Desenvolvimento de formulação tópica de LFQM117**

Nos estudos preliminares de formulação, foi avaliada a incorporação da LFQM117 em diferentes veículos: veículo oleoso, veículo oleoso acrescido de promotor de absorção cutânea, veículos microemulsionados e dispersões de monoleína. Para os sistemas microemulsionados foram testadas diferentes proporções de fase oleosa (ácido oléico, óleo de soja, miristato de isopropila, óleo de oliva), e tensoativos e co-tensoativos (Tween 20, Tween 80, Cremophor, Span 20, Span 80, etanol e álcool isopropílico).

Os veículos, nos quais foi possível a incorporação do fármaco e que foram avaliados quanto à permeação e retenção cutânea *in vitro* da LFQM117, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Veículos empregados como formulação tópica da LFQM117

Veículo	Composição
Veículo oleoso (C1)	Óleo mineral
Veículo oleoso + promotor (C2)	Óleo mineral, Ácido oléico a 5%.
Veículo oleoso + promotor (C3)	Óleo mineral, Ácido oléico a 10%.
Veículo microemulsionado (D)	Ácido oleico (45%), Span 80 (25%), etanol (25%), água (5%)
Sistema contendo monoleína (E)	Monoleína (65%), ácido oléico (5%), e água (29%)
Sistema contendo monoleína (F)	Monoleína (69%), ácido oléico (5%), e água (25%)
Sistema contendo monoleína (G)	Monoleína (69%), ácido oléico (5%), propilenoglicol (20%) e NaOH 0,1N (5%)
Sistema contendo monoleína (H)	Monoleína (65%), ácido oléico (5%), propilenoglicol (19%) e água (10%)
Sistema contendo monoleína (I)	Monoleína (65%), ácido oléico (5%), propilenoglicol (14%) e água (6%) **

\*A LFQM117 foi incorporada no veículo na concentração de 1%.

\*\*A LFQM117 foi incorporada no veículo na concentração de 10%.

Fonte: Da autora

#### 4.2.3.1 Estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* da LFQM117

Os estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* foram realizados em células de difusão vertical utilizando peles de orelhas de porcos adquiridas do frigorífico Olhos d'Água (Ipuã – SP) logo após o abate dos animais.

#### 4.2.3.1.1 Preparação da pele

As peles sem lesões superficiais foram higienizadas com água potável e imediatamente dissecadas com auxílio de material cirúrgico para separação da cartilagem. Vasos sanguíneos, nervos e tecido adiposo também foram removidos. As peles foram mantidas congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização. Previamente ao início dos estudos de permeação cutânea, as peles foram descongeladas e dermatomizadas a  $700\ \mu\text{m}$  com auxílio de um dermatômetro.

#### 4.2.3.1.2 Permeação cutânea

As peles foram cortadas em tamanho adequado para cobrir a área de difusão efetiva do compartimento doador da célula de difusão vertical tipo Franz ( $1,77\ \text{cm}^2$ ) e colocadas entre o compartimento receptor e doador com o lado da derme em contato com a solução receptora (Figura 4). A formulação foi aplicada sobre a camada córnea e a derme ficou em contato com o meio receptor. As células foram previamente preenchidas com o meio receptor degaseificado (tampão fosfato pH 7,4 acrescido de 10% de Cremophor), que foi mantido sob agitação magnética a 600 rpm e na temperatura de  $32\ ^{\circ}\text{C}$ . Foram coletadas amostras de 2,0 mL do meio receptor em tempos pré-determinados com imediata reposição do meio aquecido a  $32^{\circ}\text{C}$ . A quantificação de LFQM117 no meio receptor foi realizada por CLAE-UV.

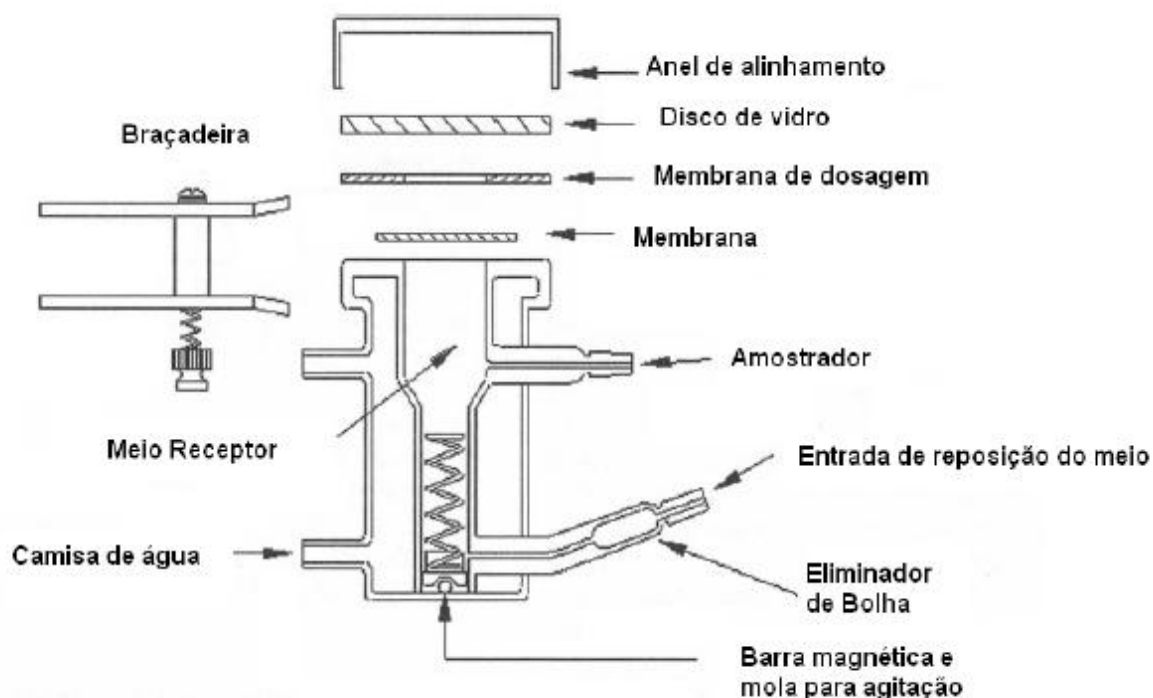


Figura 4 – Esquema da célula de difusão do tipo Franz  
 Fonte: Adaptado de Shah et al. (2006, p. 1590)

#### 4.2.3.1.3 Retenção cutânea

No final dos estudos de permeação, a área da pele exposta à difusão foi retirada da célula, lavada com água para remoção do excesso de formulação e submetida ao estudo de retenção cutânea. Foram determinadas as quantidades de LFQM117 retidas no EC (isolado pela técnica do tape stripping) e na epiderme viável + derme.

Para a remoção do EC pela técnica do Tape stripping, 16 pedaços de fita adesiva transparente Scotch 3M® foram coladas e removidas da área de difusão da pele. O primeiro pedaço de fita foi descartado e a partir do segundo pedaço as fitas foram colocadas em tubos falcon de 50 mL contendo 5 mL de metanol para a extração do fármaco. Os tubos foram submetidos à agitação por 3 minutos, em agitador vortex. Depois foram submetidos à centrifugação por 15 minutos a 969 g, e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro quantitativo, seguido por uma filtração em filtro Millex® e analisado por CLAE-UV.

Em seguida, recortou-se a pele remanescente (sem o EC) em pequenos

pedaços que foram colocados em tubos falcon de 50 mL, contendo 5 mL de metanol para a extração do fármaco. Os tubos foram submetidos à homogeneização em homogeneizador do tipo UltraTurrax® por 5 minutos e, em seguida, foram colocados em banho de ultra-som por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro quantitativo, seguido por uma filtração em filtro Millex® e analisado por CLAE-UV.

#### 4.2.3.2 Caracterização da formulação por microscopia de luz polarizada

O sistema contendo monoleína que mais atendeu aos objetivos propostos foi caracterizado por microscopia de luz polarizada. Para tanto, uma pequena alíquota da formulação foi colocada sobre lâmina de vidro, coberta com lamínula e analisada em microscópio (Olympus SZ61) com capturador de imagens (DCM130E) sob luz polarizada.

#### 4.2.3.3 Estudos de retenção cutânea *in vivo* da LFQM117

Como modelo animal foram usados ratos machos, com idade de 8 semanas (250 a 299 gramas), linhagem Wistar, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Os animais foram criados no biotério da UNIFAL com suprimento de água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética da UNIFAL.

Os animais foram imobilizados e foi aplicado creme depilatório Veet® numa área circular de 1,77 cm<sup>2</sup> no dorso do animal, por 5 minutos, e depois retirado com auxílio de algodão umedecido em água, para a remoção dos pêlos. Após 24 horas a formulação foi aplicada na área depilada (Figura 5). E após um período de 3, 6 ou 12 horas, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e a área da pele exposta à formulação foi retirada, lavada com água destilada para remoção do excesso de formulação e submetida ao estudo de retenção cutânea. Foram determinadas as quantidades de LFQM117 retidas no EC (isolado pela técnica do tape stripping) e na epiderme viável + derme, conforme metodologia já descrita no item 4.2.3.1.3.



Figura 5 - Aplicação da formulação teste em área depilada de 1,77 cm<sup>2</sup>  
Fonte: Da autora

#### 4.2.3.4 Estudos *in vivo* da atividade anti-inflamatória da LFQM117

A avaliação da atividade anti-inflamatória da LFQM117 após aplicação da formulação *in vivo* foi realizada através da avaliação do edema de orelha (ROMAY et al., 1998) e através da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (BRADLEY et al, 1982; DYPBUKT et al., 2005; ZAIA et al., 1998).

##### 4.2.3.4.1 Animais experimentais

Como modelo animal foram usados camundongos machos, com idade de 4 semanas (20 a 30 gramas), linhagem SWISS, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Os animais foram criados no biotério da UNIFAL com suprimento de água e ração *ad libitum*. Os

experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética da UNIFAL.

#### 4.2.3.4.2 Avaliação do edema de orelha

Para este estudo, os animais foram divididos em quatro grupos:

- a) controle positivo = animais tratados apenas com o agente inflamatório (óleo de cróton – 50 mg/kg);
- b) controle negativo = animais tratados com o agente inflamatório (óleo de cróton – 50 mg/kg) e posteriormente com agente anti-inflamatório (gel de cetoprofeno – 100 mg/kg);
- c) teste = animais tratados com o agente inflamatório (óleo de cróton – 50 mg/kg) e posteriormente com a formulação teste (100 mg/kg);
- d) veículo = animais tratados com o agente inflamatório (óleo de cróton) e posteriormente com o veículo da formulação teste.

Inicialmente, os animais foram imobilizados e a inflamação foi induzida através da aplicação tópica de 20 µL de óleo de cróton a 5% em acetona, na parte interna do pavilhão auricular direito de cada camundongo. No pavilhão auricular esquerdo não foi aplicado o agente inflamatório (Figura 6). Após 30 minutos as formulações foram aplicadas na parte interna do pavilhão auricular direito do animal.



Figura 6 - Inflamação induzida por aplicação tópica do óleo de cróton na parte interna do pavilhão auricular direito do camundongo

Fonte: Da autora

Após 6 horas da aplicação das formulações, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, fragmentos de 7 mm de diâmetro de cada orelha foram recortados e pesados em balança analítica. O edema induzido pelo óleo de cróton foi medido pela diferença de peso (gramas) entre a orelha direita e esquerda de cada animal. O estudo foi realizado em sextuplicata.

Após a pesagem dos fragmentos das orelhas, estes foram acondicionados em frascos individuais embebidos em 400  $\mu$ L de tampão fosfato pH 7,4 e mantidos congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização na determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

#### 4.2.3.4.3 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Inicialmente a MPO foi extraída dos fragmentos de orelhas utilizando hexadeciltrimetilamônio bromídico (HTAB) 0,5% em tampão fosfato pH 5,4, de acordo com Bradley et al (1982). Posteriormente o homogeneizado foi centrifugado à 956 g por 15 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante utilizado para a avaliação tecidual da

atividade de MPO.

A determinação da atividade clorinante da MPO foi baseada na reação do ácido hipocloroso (HOCl). A formação de HOCl reflete a atividade de MPO e é acompanhada por espectrofotometria baseada na formação de taurina-cloramina resultante da reação de ácido hipocloroso com taurina. A concentração de taurina-cloramina é estimada pela oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) a 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzoico (DTNB) medindo o decréscimo da absorvância de TNB a 412 nm. O ensaio de DTNB utilizado para quantificar a produção de HOCl pela MPO foi realizada segundo Dypbukt et al. (2005) com algumas modificações. As reações foram montadas com volume final de 1,0 mL, contendo PBS 0,5% (pH 5,4), taurina 15 mM, peróxido de hidrogênio 0,216 mM e 100 µL de amostra. A reação foi desencadeada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubada a 37°C por 30 minutos, sob agitação suave. A taurina cloramina acumulada na reação foi determinada pela adição de 100 µL de TNB (1mM) em que o decréscimo da absorvância de TNB a 412 nm representa a estimativa da oxidação do TNB a DTNB. Os resultados foram normalizados pelos valores de proteínas das amostras determinado por Bradford (ZAIA et al., 1998). Para validação do experimento foi utilizado um grupo contendo a amostra, todos os reagentes participantes da reação e a Azida, e outro grupo contendo todos os reagentes participantes da reação, porém sem amostra e sem a Azida. A Azida é um inibidor seletivo do ácido hipocloroso, e quando adicionada à reação impede a formação desse ácido, sendo quantificados apenas seus níveis basais.

#### **4.2.4. Análise estatística dos resultados**

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2008). Os resultados encontrados foram avaliados estatisticamente pelo teste Scott-Knott para comparação de médias com nível de significancia  $\alpha=5\%$ . Foram consideradas diferenças significativas valores de  $p<0,05$ .

## 5 RESULTADOS

A seguir estão apresentados os resultados obtidos a partir do desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLAE para determinação de LFQM117 em estudos de permeação e retenção cutânea, caracterização físico-química da LFQM117, estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* da LFQM117, estudos de retenção cutânea *in vivo* da LFQM117 e estudos *in vivo* da atividade anti-inflamatória da LFQM117.

### 5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DE LFQM117 EM ESTUDOS DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA

O método foi desenvolvido e validado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia por CLAE desenvolvida para a quantificação da LFQM117 empregou as seguintes condições: coluna cromatográfica C<sub>18</sub> LiChrospher® RP-select B (125,0 x 4,0 d.i.) mm com partículas de 5 µm Merck® e pré-coluna LiChrospher® RP-select B (4,0 x 3,0 d.i.) mm Merck®; fase móvel metanol:solução de ácido acético a 0,1% (80:20 v/v); vazão de fase móvel de 1,0 mL/min; volume de injeção de 50 µL; e detecção no UV a 290 nm.

Os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados de adequação do sistema cromatográfico, n=6.

Parâmetros	Resultados
Fator de retenção	3,473
Fator de assimetria	1,112
Número de pratos teóricos	2652,522
Tempo de retenção (minutos)	7,7

Fonte: Da autora

De acordo com o estudo de seletividade, picos de interferentes não foram detectados no mesmo tempo de retenção da LFQM117 nas amostras de branco de meio receptor, homogeneizado de pele de orelha de porco e homogeneizado de fita adesiva, como pode ser visualizado na Figura 7.

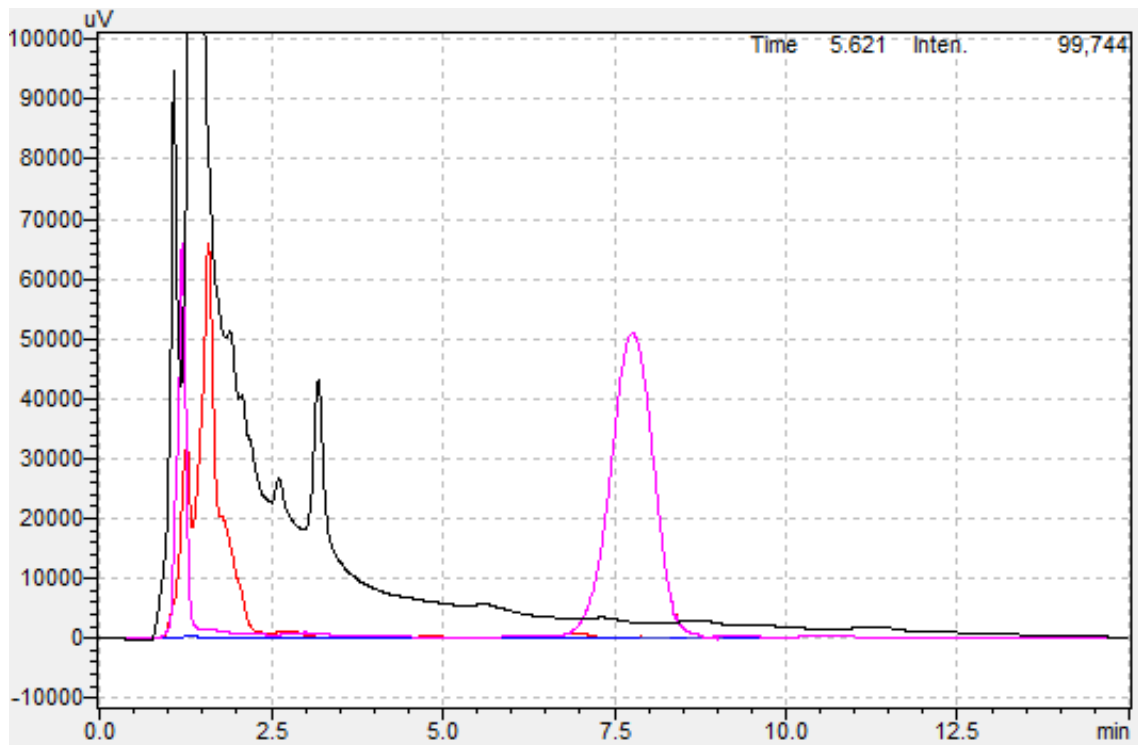


Figura 7 - Cromatogramas da solução padrão de LFQM117 na concentração de 20 µg/mL (--- curva em rosa), branco de meio receptor (--- curva em preto), branco do homogeneizado de pele de orelha de porco (--- curva em azul) e branco do homogeneizado de fita adesiva (--- curva em vermelho).

Fonte: Da autora

O método apresentou-se linear no intervalo de concentrações de 0,10 a 20,00 µg/mL. A equação da reta obtida foi  $y = 155772x - 7027,5$ . O coeficiente de correlação foi satisfatório ( $r = 0,9997$ ) indicando excelente correlação linear entre os dados analisados. A Figura 8 representa a curva de calibração da LFQM117 por CLAE.

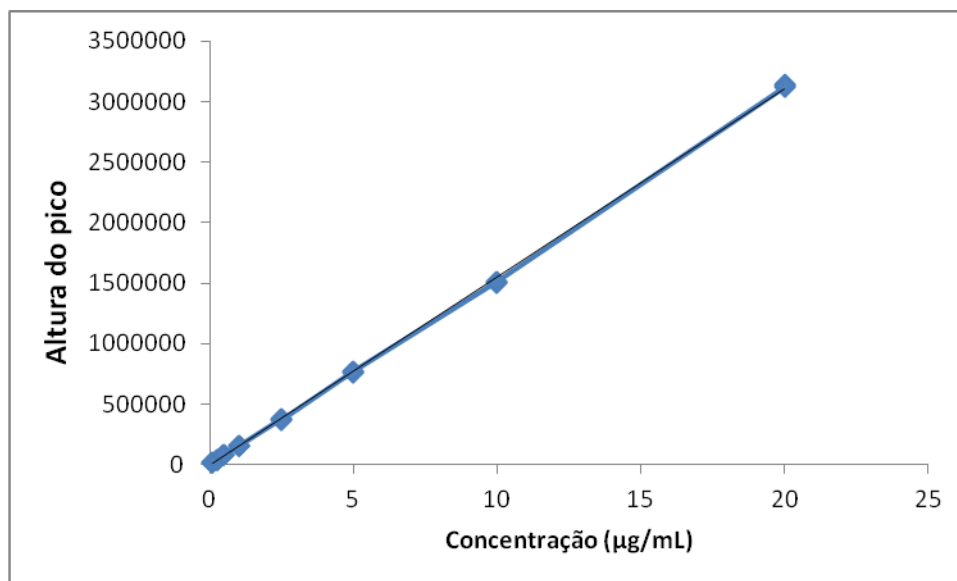


Figura 8 – Representação da curva de calibração da LFQM117 por CLAE  
Fonte: Da autora

A Tabela 3 apresenta os valores referentes à avaliação da precisão e da exatidão do método.

Tabela 3 – Avaliação da precisão e exatidão do método para determinação da LFQM117

Parâmetros	LFQM117		
Precisão intra-ensaio			
Concentração (µg/mL)	0,1	1	10
N	6	6	6
CV (%)	3,41	0,12	0,57
Precisão interensaio			
Concentração (µg/mL)	0,1	1	10
N	3	3	3
CV (%)	7,55	4,50	5,06
Exatidão			
Intra-ensaio (%)	1,89	0,93	- 0,57
Interensaio (%)	-2,19	7,38	6,77

N, número de determinações; CV, coeficiente de variação  
Fonte: Da autora

Utilizando-se a equação citada no item 4.2.1.4 para calcular o LD, em que:  $DPa = 690,88$  e  $IC = 162028,31$ , de acordo com a Tabela 4, o resultado encontrado foi que a concentração mínima que o método bioanalítico é capaz de detectar é  $14,1$  ng/mL de LFQM117 .

Tabela 4 - Determinação do limite de detecção do método de quantificação de LFQM117 por CLAE

Curvas	Intercepto com o eixo Y	Inclinação da curva analítica
Curva 1	2590,4959	150844,6402
Curva 2	2217,657	168820,0342
Curva 3	1251,8161	166420,2463
Média	2019,989667	162028,3069
Desvio padrão	690,8836246	9759,382467

Fonte: Da autora

Utilizando-se a equação citada no item 4.2.1.5 para calcular o LQ, em que:  $DPa = 690,8836246$  e  $IC = 162028,31$ , de acordo com a Tabela 4, o resultado encontrado foi que a concentração mínima que o método é capaz de quantificar é  $42,64$  ng/mL de LFQM117.

A Tabela 5 apresenta os valores referentes à estabilidade da LFQM117 em solução metanólica, num período de 24 horas.

Tabela 5 - Estabilidade da LFQM117 em solução metanólica (n=3). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão

Tempo	Área do pico	%
Início	765616 $\pm$ 3021	100.00
Após 24 horas	765884 $\pm$ 1989	100.03

Fonte: Da autora

Com relação ao estudo de recuperação, a recuperação de quantidades conhecidas de LFQM117 a partir do estrato córneo e da epiderme viável + derme de orelha de porco variou de  $80,6$  a  $110,1\%$ , como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Recuperação de LFQM117 a partir do estrato córneo e da epiderme viável + derme

Concentração( $\mu\text{g/mL}$ )	Camada analisada	% recuperação
0,2	Estrato córneo	102,3
0,2	Estrato córneo	90,9
0,2	Estrato córneo	93,3
0,4	Estrato córneo	86,3
0,4	Estrato córneo	89,0
0,4	Estrato córneo	81,2
0,6	Estrato córneo	84,5
0,6	Estrato córneo	80,6
0,6	Estrato córneo	85,6
0,2	Epiderme + derme	89,6
0,2	Epiderme + derme	105,2
0,2	Epiderme + derme	98,6
0,4	Epiderme + derme	110,1
0,4	Epiderme + derme	107,1
0,4	Epiderme + derme	109,3
0,6	Epiderme + derme	93,3
0,6	Epiderme + derme	100,6
0,6	Epiderme + derme	93,2

Fonte: Da autora

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LFQM117

Para a caracterização físico-química da LFQM117 foram realizados ensaios por ATR-FTIR, análise térmica, determinação dos coeficientes de solubilidade em diversos solventes, determinação do coeficiente de partilha octanol/água e estudo de estabilidade, cujos resultados estão descritos a seguir.

A Figura 9 representa o espectro de ATR-FTIR da LFQM117, na qual pode-se observar a presença de bandas relativas aos estiramentos e deformações de ligações presentes nos grupos funcionais, que servem de base para a identificação da molécula. A Figura 10 representa o espectro de ATR-FTIR acoplada ao módulo “hot stage” da LFQM117 que permite tanto a caracterização através dos estiramentos e deformações de ligações presentes nos grupos funcionais como a avaliação da estabilidade térmica da molécula, na faixa de temperatura selecionada (30 a 230°C). Por meio do espectro de ATR-FTIR acoplada ao módulo “hot stage” é

possível verificar a presença de eventos térmicos, como a fusão da molécula.

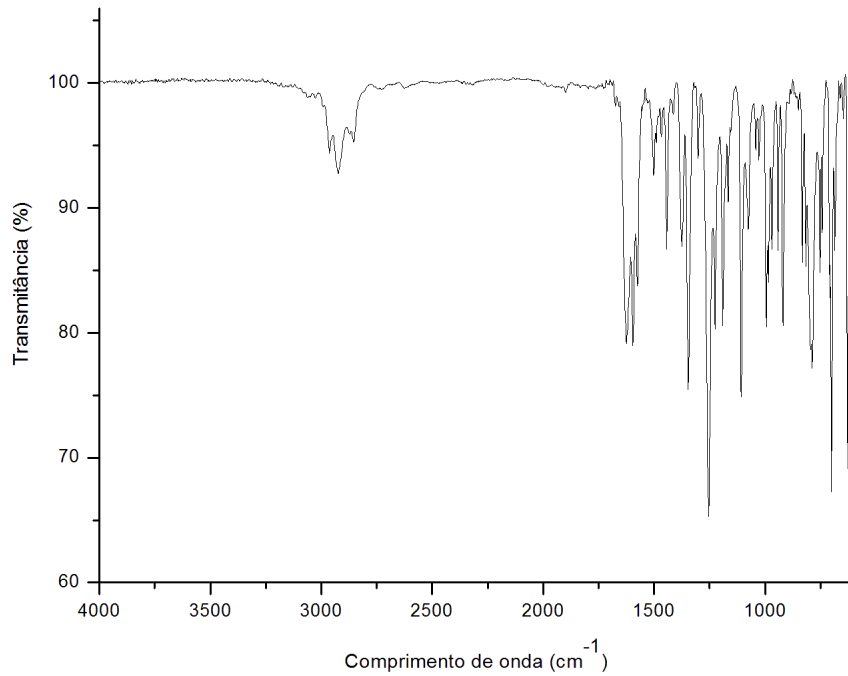


Figura 9 – Espectro de ATR-FTIR da LFQM117  
Fonte: Da autora

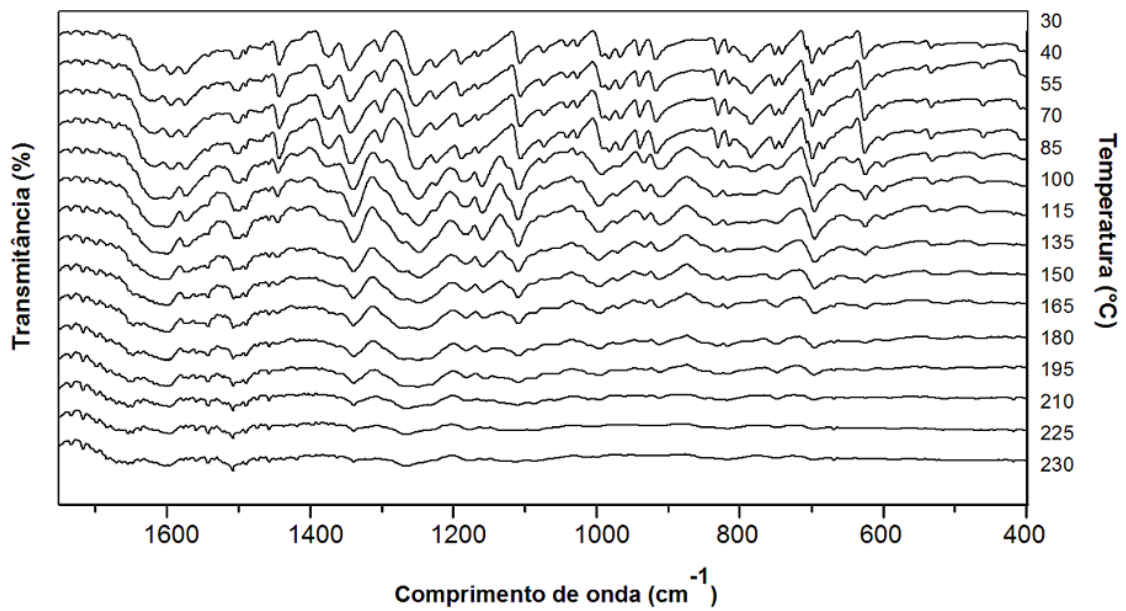


Figura 10 – Espectro de ATR-FTIR acoplada ao módulo “hot stage” da LFQM117  
Fonte: Da autora

Na Figura 11 estão representadas as curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) obtidas para a LFQM117, evidenciando a ocorrência de dois eventos, um deles próximo a 95°C e o outro próximo a 300°C, provavelmente a fusão da substância e a degradação térmica, respectivamente.

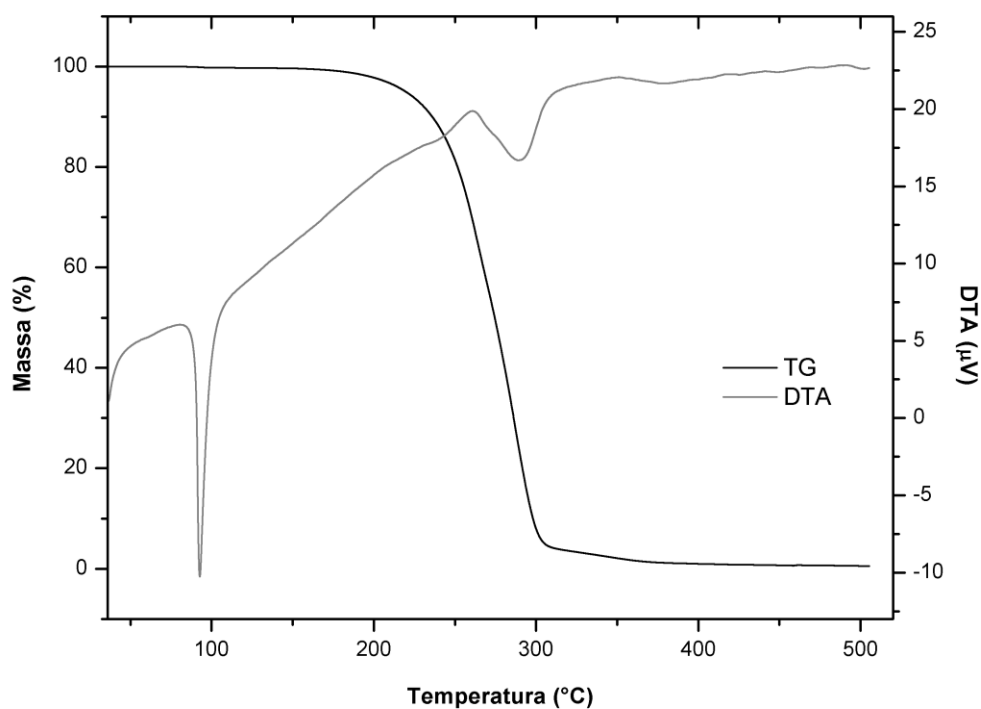


Figura 11 – Curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) obtidas para a LFQM117.

Fonte: Da autora

A Tabela 7 representa os valores de solubilidade da LFQM117 em diferentes veículos.

Tabela 7 - Solubilidade da LFQM117 em diversos veículos (n = 3). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão

Veículos	Solubilidade ( $\mu\text{g/mL}$ )
Água	0,0718 $\pm$ 0,0503
Álcool isopropílico	0,5678 $\pm$ 0,0344
Tampão fosfato pH 5,0	0,0467 $\pm$ 0,0091
Tampão fosfato pH 7,4	0,0706 $\pm$ 0,0044
Tampão fosfato pH 7,4 + Tween 20 <sup>®</sup> (5%)	168,0225 $\pm$ 8,0610
Tampão fosfato pH 7,4 + Tween 80 <sup>®</sup> (5%)	272,9387 $\pm$ 25,0076
Tampão fosfato pH 7,4 + LSS (5%)	183,9243 $\pm$ 6,2002
Tampão fosfato pH 7,4 + Pluronic <sup>®</sup> (5%)	2,7841 $\pm$ 0,1910
Tampão fosfato pH 7,4 + Cremophor <sup>®</sup> (10%)	819,2110 $\pm$ 92,9614

Fonte: Da autora

O coeficiente de partição octanol/água da LFQM117 foi determinado através do método indireto por CLAE (MINICK et al., 1988; TAVARES, 2004) e o valor encontrado do log P foi de 4,8, indicando que a molécula possui características lipofílicas. A LFQM117 foi submetida a diferentes condições de estresse forçado para determinação da sua estabilidade e os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Quantidades de LFQM117 recuperadas após 24 h quando submetidas a diferentes condições de estresse forçado (n=3). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão

Condições de estresse	Área do pico	LFQM117 (%)
Sem estresse (inicial)	3130773 $\pm$ 6822	100,00
Adição de HCl 0,1N	3227722 $\pm$ 7020	103,10
Adição de HCl 0,01N	3132403 $\pm$ 2771	100,05
Adição de NaOH 0,1N	3260160 $\pm$ 91	104,13
Adição de NaOH 0,01N	3122444 $\pm$ 816	99,73
Adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,1N	3116152 $\pm$ 22638	99,53
Adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,01N	3141697 $\pm$ 9356	100,35
Temperatura 60°C	3160015 $\pm$ 34	100,93
Incidência de luz	3100605 $\pm$ 2206	99,04

Fonte: Da autora

### 5.3 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DA LFQM117

A LFQM117 foi incorporada em diferentes veículos e avaliada quanto a sua permeação e retenção cutânea *in vitro*. E as Tabelas 9 e 10 trazem os resultados de permeação e retenção cutânea *in vitro*, respectivamente.

Tabela 9 - Valores de permeação cutânea *in vitro* da LFQM117 a partir de diferentes veículos (n = 3). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Veículo	LFQM117 permeada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )		
	3 horas	6 horas	9 horas
Óleo mineral (C1)	0,25 $\pm$ 0,23	1,00 $\pm$ 0,70	14,56 $\pm$ 9,84
Óleo mineral + 5% de ácido oléico (C2)	9,15 $\pm$ 3,14	25,99 $\pm$ 18,76	73,54 $\pm$ 46,69
Óleo mineral + 10% ácido oléico (C3)	5,13 $\pm$ 3,31	22,55 $\pm$ 28,55	78,28 $\pm$ 118,88
Microemulsão (D)	13,90 $\pm$ 15,70	36,36 $\pm$ 32,68	52,79 $\pm$ 65,92
Sistema contendo monoleína (E)	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Sistema contendo monoleína (F)	1,10 $\pm$ 1,60	1,19 $\pm$ 1,50	0,14 $\pm$ 0,12
Sistema contendo monoleína (G)	1,56 $\pm$ 1,96	1,70 $\pm$ 1,69	2,45 $\pm$ 2,11
Sistema contendo monoleína (H)	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Sistema contendo monoleína (I)	n.d.*	n.d.*	n.d.*

\*n.d. = não detectado  
Fonte: Da autora

Tabela 10 - Valores de retenção cutânea *in vitro* da LFQM117 a partir de diferentes veículos após 9 horas de aplicação (n = 3). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão

Veículo	LFQM117 retida ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )		
	EC	Epiderme viável+derme	Retenção total
Óleo mineral (C1)	————	————	4,90 $\pm$ 1,90
Óleo mineral + 5% de ácido oléico (C2)	————	————	2,90 $\pm$ 0,62
Óleo mineral + 10% ácido oléico (C3)	————	————	5,64 $\pm$ 0,97
Microemulsão (D)	12,34 $\pm$ 15,76	4,78 $\pm$ 2,49	17,11 $\pm$ 16,62
Sistema contendo monoleína (E)	7,41 $\pm$ 2,17	3,58 $\pm$ 0,52	10,99 $\pm$ 2,41
Sistema contendo monoleína (F)	1,85 $\pm$ 0,56	4,86 $\pm$ 3,73	6,71 $\pm$ 4,12
Sistema contendo monoleína (G)	2,89 $\pm$ 0,59	3,62 $\pm$ 0,94	6,50 $\pm$ 0,72
Sistema contendo monoleína (H)	7,77 $\pm$ 2,32	4,90 $\pm$ 2,24	12,68 $\pm$ 3,13
Sistema contendo monoleína (I)	5,96 $\pm$ 2,59	8,02 $\pm$ 3,15	13,98 $\pm$ 5,61

\*Para algumas formulações foi determinada a retenção na pele sem a separação do estrato córneo e denominada retenção total. Para outras formulações, foi determinada a retenção no EC e na epiderme viável + derme, e a somas dos dois valores resultou na retenção total na pele.  
Fonte: Da autora

Após selecionar a melhor formulação (formulação H), de acordo com os resultados de permeação e retenção cutânea *in vitro*, procedeu-se o estudo da cinética de retenção da formulação selecionada, cujos resultados estão demonstrados na Figura 12.

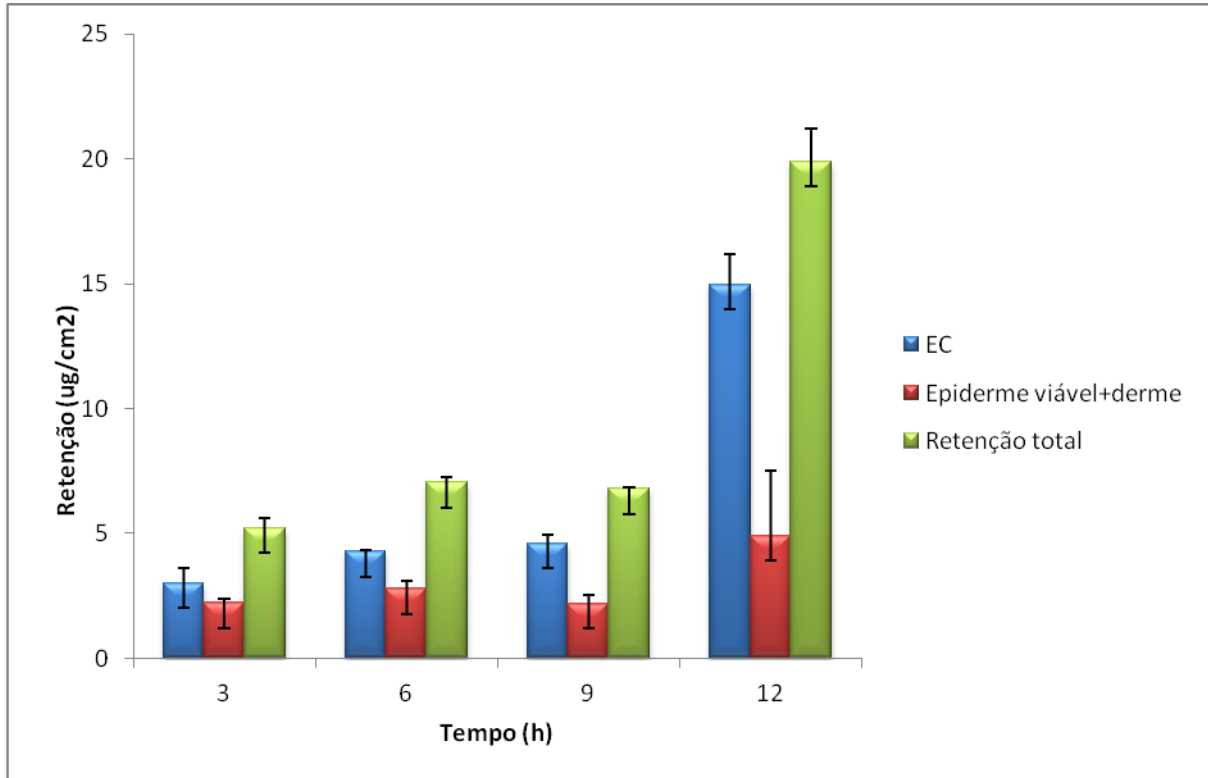


Figura 12 - Valores de retenção cutânea *in vitro* da LFQM117 em pele de orelha de porco a partir da formulação H nos tempos 3, 6, 9 e 12h (n = 6). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão

Fonte: Da autora

A dispersão de monoleína (formulação H) foi caracterizada através de microscopia de luz polarizada e na Figura 13 estão representadas as fotomicrografias obtidas no dia da manipulação e 30 dias após a manipulação do cristal líquido de fase lamelar. Na Figura 14 estão representadas fotomicrografias da formulação após adição de 5 mL de água, para avaliação da estabilidade da mesofase frente à absorção de água. A absorção de água ocasionou mudança de fase lamelar para fase hexagonal.

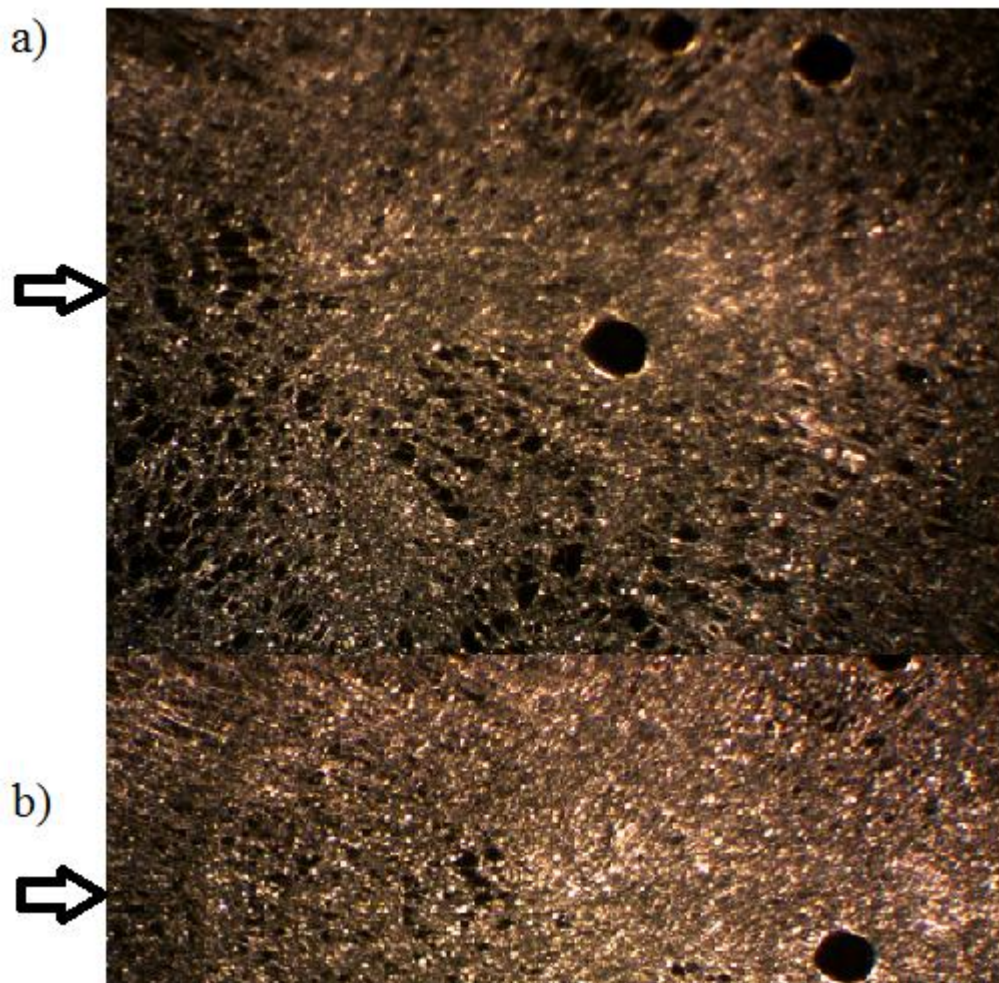


Figura 13 - Fotomicrografias da formulação H no dia da manipulação (a) e após 30 dias (b), destacando raias oleosas da mesofase lamelar  
Fonte: Da autora

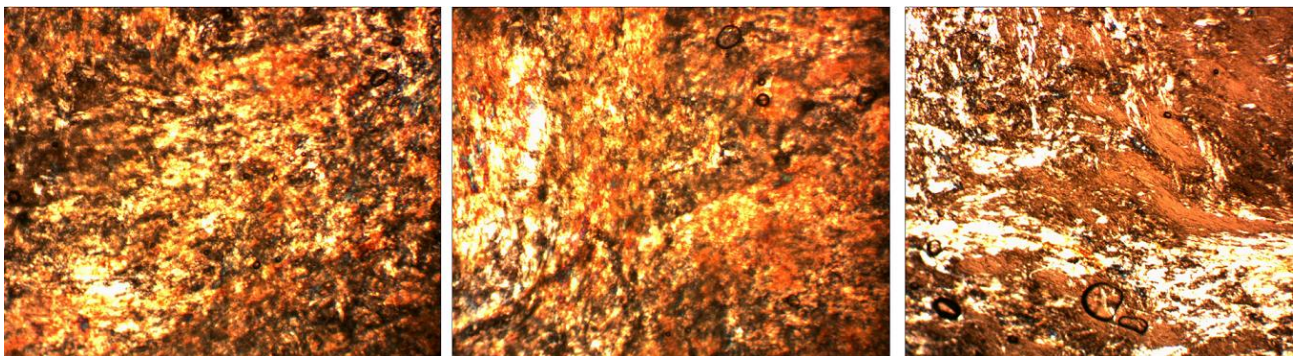


Figura 14 - Fotomicrografia da formulação H após adição de 5 mL de água, indicando mudança de fase lamelar para hexagonal.  
Fonte: Da autora

#### 5.4 ESTUDOS DE RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VIVO* DA LFQM117

A retenção cutânea *in vivo* da LFQM117 em ratos foi avaliada a partir da aplicação tópica da dispersão de monoleína (formulação H) e os resultados obtidos estão representados na Figura 15.

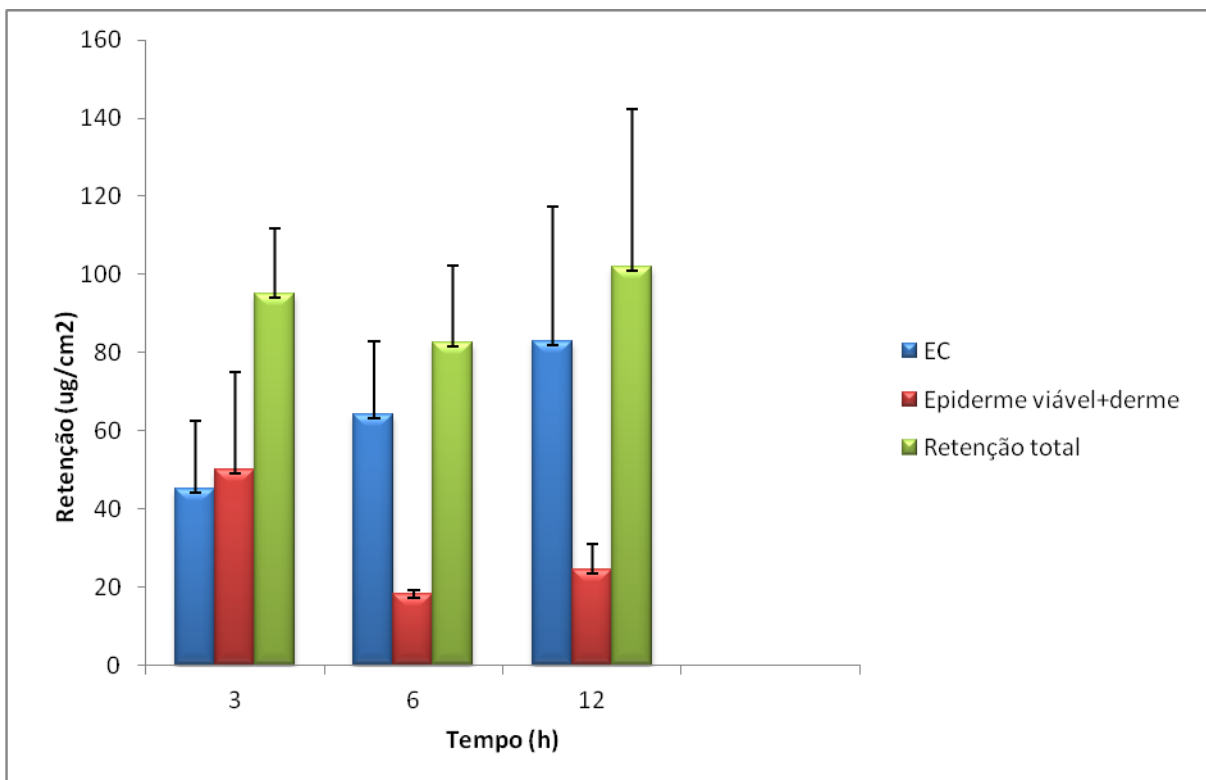


Figura 15 - Valores de retenção cutânea *in vivo* da LFQM117 em ratos a partir da dispersão de monoleína (formulação H) nos tempos 3, 6 e 12h (n = 6). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão

Fonte: Da autora

#### 5.5 ESTUDOS *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA LFQM117

A atividade anti-inflamatória da LFQM117 a partir da aplicação tópica da dispersão de monoleína (formulação H) foi avaliada *in vivo* através da diminuição de edema em orelha de camundongos. Os resultados apresentados na Figura 16 referem-se à formação de edema após aplicação do óleo de cróton e diminuição do

mesmo após aplicação das formulações teste (LFQM117) e controles (cetoprofeno e veículo), dados em peso dos fragmentos das orelhas.

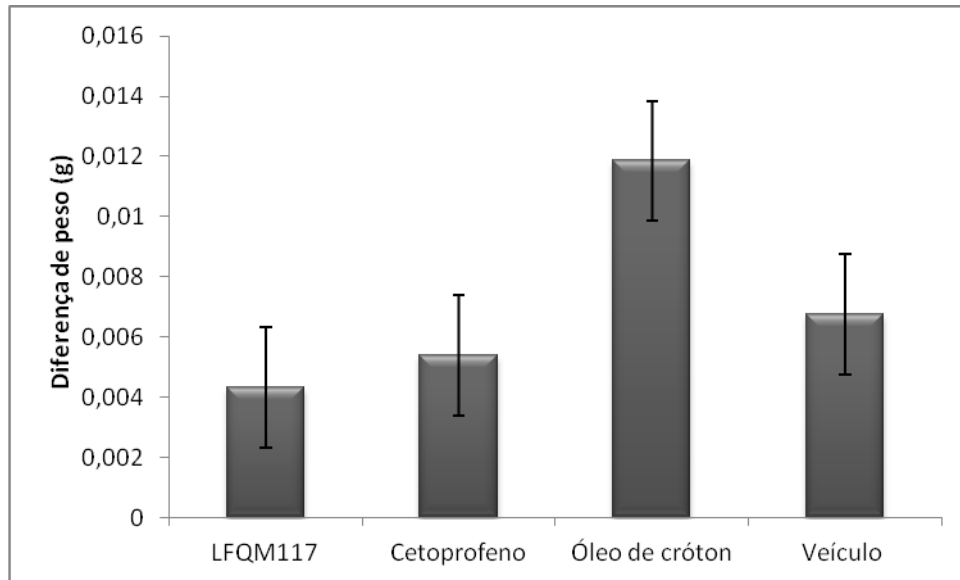


Figura 16 - Formação de edema após aplicação do óleo de cróton e diminuição do mesmo após aplicação de formulações distintas. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  D.P. do peso de fragmentos de orelhas de seis animais em cada grupo ( $n = 6$ ).

Fonte: Da autora

A formação de ácido hipocloroso, que reflete a atividade de MPO, foi determinada, após a inflamação induzida por óleo de cróton, nos fragmentos das orelhas de camundongos submetidos ao teste de edema de orelha. E a Figura 17 representa os resultados referentes à concentração de ácido hipocloroso nos fragmentos de orelhas de camundongos com ou sem tratamento posterior à inflamação.

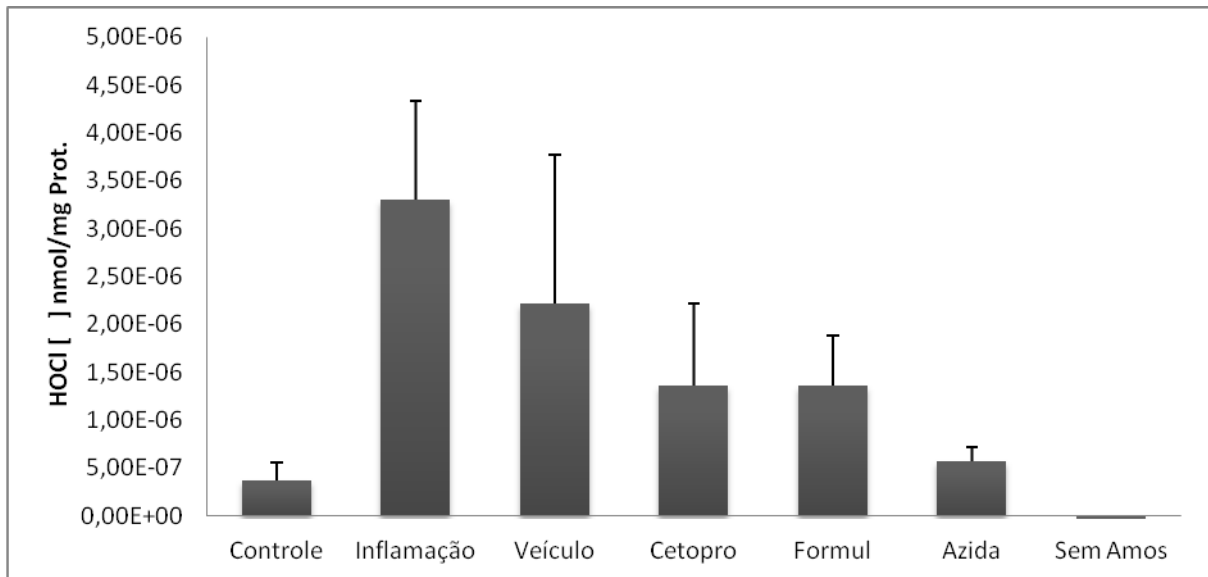


Figura 17 – Determinação de ácido hipocloroso em fragmentos de orelhas de camundongos após inflamação induzida por óleo de cróton, com ou sem tratamento posterior à inflamação. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  D.P. de seis animais em cada grupo (n = 6)

Fonte: Da autora

## 6 DISCUSSÃO

Nos estudos de permeação e retenção cutânea é necessário quantificar o fármaco em amostras complexas e normalmente a quantidade de fármaco a ser analisada é pequena, o que requer a utilização de métodos bioanalíticos seletivos e de alta sensibilidade. A CLAE apresenta-se como uma técnica analítica adequada para este fim e é muito empregada nestes estudos (BRASIL, 2012; MUTALIK et al., 2009; ROTTK; LUNTER; DANIELS, 2014; RUELA; ARAÚJO; PEREIRA, 2009).

Para afirmar que um método bioanalítico é confiável e apresenta aplicação quantitativa é importante realizar a validação bioanalítica, que é definida como um conjunto de ensaios para demonstrar que a metodologia é apropriada à sua finalidade (BRASIL, 2012; ICH, 2005; USA, 2001). Os parâmetros analisados neste estudo para a validação do método incluíram: seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limite de quantificação, limite de detecção, teste de recuperação e estabilidade.

A apresentação dos resultados de adequação do sistema também é parte integrante dos ensaios de validação (BRASIL, 2012; ICH, 2005; USA, 2001). Os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico foram apresentados na Tabela 2 e estão de acordo com os critérios estabelecidos.

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI, 2004).

De acordo com o estudo de seletividade, picos de interferentes não foram detectados no mesmo tempo de retenção da LFQM117 nas amostras de branco de meio receptor, homogeneizado de pele de orelha de porco e homogeneizado de fita adesiva, como pode ser visualizado na Figura 7.

A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa

dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta (RIBANI, 2004). O método proposto para quantificação da LFQM117 apresentou linearidade na faixa de 0,10 a 20,00 µg/mL, como mostrado na Figura 8.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI, 2004). Os resultados obtidos para precisão e exatidão foram considerados satisfatórios, como demonstrado na Tabela 3, pois estão de acordo com os limites especificados pela ANVISA (BRASIL, 2012), FDA (USA, 2001) e International Conference on Harmonisation (ICH, 2005).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI, 2004). Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental. O LQ pode ser calculado utilizando a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica (RIBANI, 2004). Neste trabalho foi utilizada a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica para a determinação do LD e LQ, que foram iguais a 14,1 ng/mL e 42,64 ng/mL, respectivamente.

A determinação da estabilidade é um estudo importante para demonstrar que não ocorrem degradações químicas da molécula durante as análises. Pode-se considerar que, de acordo com os resultados obtidos para o início do processo e após 24 horas da solução do analito em repouso, a LFQM117 permaneceu estável, com concentração de aproximadamente 100% em relação à concentração inicial, como pode ser visualizado na Tabela 5. Geralmente aceita-se que resultados entre 98 e 102% são indicativos de que não ocorrem alterações significativas relacionadas à degradação química do fármaco em estudos de liberação (USP, 2012).

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa,

média e alta, da faixa de uso do método. A recuperação de quantidades conhecidas de LFQM117 a partir do estrato córneo e da epiderme viável + derme de orelha de porco foi satisfatória, uma vez que os valores tiveram uma variação de 80,6 a 110,1% (Tabela 6).

Para a caracterização físico-química da LFQM117 foram realizados diversos estudos, entre eles, a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, que é um dos métodos analíticos mais importantes na determinação de grupos orgânicos de materiais no estado líquido e sólido. Na espectroscopia de reflexão total atenuada com transformada de Fourier (ATR-FTIR) a amostra é colocada em contato direto com o cristal de ATR, que possui alto índice de refração e em seguida é obtido o espectro de absorção (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Por meio do espectro de ATR-FTIR da LFQM117, apresentado na Figura 9, pode-se observar a presença de bandas relativas aos estiramentos e deformações de ligações presentes nos grupos funcionais. As bandas localizadas nos comprimentos de onda de 2872 e 2963  $\text{cm}^{-1}$  são características de estiramentos simétricos e assimétricos (C-H  $\text{sp}^3$ ). Aquelas localizadas nos comprimentos de onda de 2855 e 2924  $\text{cm}^{-1}$  são características de estiramentos simétricos e assimétricos (C-H  $\text{sp}^2$ ). Uma deformação assimétrica C-H pôde ser observada no comprimento de onda de 1375  $\text{cm}^{-1}$ . Um estiramento C=O pôde ser observado em baixas frequências (1624  $\text{cm}^{-1}$ ) devido ao efeito de conjugação C=C de anéis aromáticos. As duplas ligações C=C aromáticas foram observadas em 1443  $\text{cm}^{-1}$ . Um estiramento não-planar de benzenos foi observado em 789, 752 e 700  $\text{cm}^{-1}$ , e um estiramento C-O foi observado em 1107  $\text{cm}^{-1}$ . Esses resultados estão de acordo com o trabalho realizado por Rezende et al. (2013).

Já a técnica de ATR-FTIR acoplada ao módulo "hot stage" permite tanto a caracterização como a avaliação da estabilidade térmica da molécula, na faixa de temperatura selecionada. Quando se comparam as Figuras 9 e 10, pode-se perceber alterações como diminuição e desaparecimento de bandas no espectro, próximas aos comprimentos de onda de 1000, 800 e 750  $\text{cm}^{-1}$ , quando a temperatura excede os 85°C (Figura 10), indicando algum efeito térmico físico, provavelmente a fusão da substância.

As análises térmicas consistem em um grupo de técnicas de grande interesse na área farmacêutica, permitindo a caracterização do comportamento térmico de fármacos e insumos farmacêuticos e a obtenção de informações

importantes para o desenvolvimento de novos produtos (BAZZO; SILVA, 2005). A aplicação de técnicas de análise térmica fornece um indicativo da estabilidade de um produto nas etapas de pré-formulação (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

Observou-se na curva termogravimétrica, representada na Figura 11, que a LFQM117 praticamente não apresentou perda de massa até 200°C. Entretanto, após 200°C houve um decaimento rápido de massa até atingir 300°C. A partir de 300°C, praticamente não foi detectada massa de LFQM117, indicando a possibilidade de decomposição térmica da substância a partir dessa temperatura. Quando observa-se a curva DTA, pode-se perceber dois eventos principais, o primeiro em torno de 100°C, indicativo de fusão e confirma a hipótese de ocorrência de evento físico mencionada anteriormente, e o segundo em torno de 300°C, indicativo de decomposição térmica da LFQM117.

A determinação dos coeficientes de solubilidade para um fármaco é de extrema importância quando são incluídos testes de permeação e retenção cutâneas, uma vez que o fármaco deve ter a capacidade de se solubilizar no meio receptor para garantir as “condições sink”, ou seja, a concentração do fármaco no meio durante os estudos não deve alcançar valores maiores que 10 % da sua concentração de saturação. Os resultados apresentados na Tabela 7 demonstraram que a LFQM117 apresentou uma baixa solubilidade em água e também em tampão pH 5,0 e pH 7,4. Um aumento de solubilidade foi observado com a adição de diferentes tipos de tensoativos, como Tween 20<sup>®</sup>, Tween 80<sup>®</sup>, Laurilsulfato de sódio, Pluronic<sup>®</sup> e Cremophor<sup>®</sup>. No entanto, somente a adição de Cremophor<sup>®</sup> a 10% no tampão fosfato pH 7.4 mostrou um aumento de solubilidade adequado para garantir as condições *sink* nos estudos de permeação cutânea *in vitro*.

A hidro e lipossolubilidade de um fármaco são as duas principais características que determinam sua absorção através da pele por difusão passiva. O coeficiente de partição mede a quantidade de fármaco que se difunde de um veículo líquido, semi-sólido ou sólido para uma fase adjacente, com a finalidade de se estabelecer o equilíbrio entre elas (BARRY, 1983). Os veículos que conseguem aumentar a partilha do fármaco no estrato córneo podem levar a um aumento da permeabilidade do mesmo (TOJO et al.,1987). Quando a membrana promove resistência à difusão, ou seja, é o passo limitante no processo de permeação, os valores do coeficiente de partilha são muito importantes. O coeficiente de partição ( $\log P$ ) é o valor utilizado para caracterizar a lipofilia e pode ser obtido por medição

direta (técnica experimental *shake flask*) ou indireta (como os métodos experimentais cromatográficos ou os teóricos computacionais). A determinação da lipofilia por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa também é uma técnica indireta mas, no entanto, experimental, que se destaca pela determinação de um parâmetro cromatográfico correlacionado ao  $\log P$ , o fator de retenção ( $k'$ ). Uma vez que o método direto para a medição do  $\log P$  através da técnica *shake flask* é limitado para valores entre -2 e 4, pode revelar-se bastante moroso e complexo devido aos processos de separação e determinação da concentração em cada uma das fases e, também pelo fato de ser bastante sensível à presença de impurezas, torna-se importante ter uma forma de mensuração da lipofilia de forma rápida e prática (MINICK et al., 1988; TAVARES, 2004). O valor encontrado para  $\log P$  foi de 4,8, valor que indica que a molécula possui características lipofílicas. Esse valor foi comparado com o obtido pelo método computacional por meio do programa ACD/I-Lab (Versão 6.0 para Microsoft Windows), cujo valor obtido foi  $\log P = 5,5$ . Pôde-se observar que os valores são próximos, comprovando que o método experimental indireto adotado é seguro e confiável.

O estudo de degradação forçada é uma ferramenta importante que permite obter informações importantes sobre a estabilidade intrínseca do fármaco. O conhecimento da estabilidade intrínseca da molécula é importante no desenvolvimento de novas formulações de modo a garantir a estabilidade destas preparações farmacêuticas. Durante a produção e armazenamento da formulação, o fármaco pode estar susceptível a variações de temperatura, hidrólise, oxidação ou outras reações químicas que podem comprometer a estabilidade do produto farmacêutico. Interações físicas ou até mesmo reações químicas com componentes da formulação ou materiais de embalagem podem alterar a formulação, comprometendo sua eficácia e segurança. Este método emprega condições bruscas de estresse e são úteis para avaliar a estabilidade da molécula a curto tempo. Observando-se os dados da Tabela 8 sugere-se que a LFQM117 apresenta uma boa estabilidade química nas condições estudadas.

A eficácia de formulações dermatológicas é influenciada pelo grau de penetração do fármaco na pele, que pode ser aumentado pelo uso adequado de formulações tópicas. Neste sentido, o desenvolvimento das formulações para aplicação tópica de LFQM117 levou em consideração dois fatores: a incorporação do fármaco no veículo e o uso de excipientes ou sistemas capazes de promover uma

maior penetração e retenção cutânea. Desta forma, cada formulação desenvolvida foi submetida aos ensaios de permeação e retenção cutânea, e as Tabelas 8 e 9 trazem os resultados de permeação e retenção cutânea, respectivamente.

Inicialmente avaliou-se a permeação e retenção cutânea *in vitro* da LFQM117 a partir de um veículo oleoso simples (óleo mineral) e a influência da adição de promotor de absorção cutânea (ácido oléico). A adição de promotores de absorção cutânea em formulações de uso tópico e transdérmico é uma estratégia bastante empregada para aumentar a permeação e retenção cutânea de fármacos. Os promotores de permeação são compostos químicos, farmacologicamente inertes que podem permear ou interagir com constituintes do estrato córneo, quando incorporados numa formulação, e, deste modo, diminuir a resistência da pele à difusão do fármaco (MARTINS, 2002). O ácido oléico é um ácido graxo de cadeia longa (18 carbonos) monoinsaturado, muito estudado e empregado como promotor de absorção cutânea (KASLIWAL et al., 2008; PIERRE et al., 2006). Como podemos observar na Tabela 9, a adição de ácido oléico aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a permeação da LFQM117 (mais de 20 vezes após 6 horas de aplicação e cerca de 5 vezes após 9 horas de aplicação), porém não houve diferença significativa entre as formulações contendo 5 ou 10% de ácido oléico ( $p > 0,05$ ). Em relação à retenção, a adição de ácido oléico não alterou significativamente a quantidade de fármaco retida ( $p > 0,05$ ), independente da concentração utilizada, conforme observado na Tabela 10.

As microemulsões (ME) são sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes de dois líquidos imiscíveis estabilizados por um tensoativo, uma mistura desses ou ainda pela combinação de um tensoativo com um co-tensoativo. As ME se formam espontaneamente e geralmente são caracterizados como agregados esféricos com diâmetro muito pequeno, na faixa de 5 a 140 nm. Esses sistemas podem ser classificados como água em óleo (a/o), bicontínuo ou óleo em água (o/a) o que depende de suas microestruturas e de seus componentes. Sistemas microemulsionados são muito empregados devido a sua capacidade de solubilizar fármacos com dificuldade de solubilidade, além dos tensoativos e co-tensoativos empregados nestes sistemas poderem atuar como promotores de absorção cutânea (FANUN, 2012; LAWRENCE; RESS, 2000). Nesse sentido, outra estratégia avaliada para aumentar a penetração e retenção do fármaco foi um sistema microemulsionado (formulação D). E como observado nas Tabelas 9 e 10,

houve aumento significativo (cerca de 3 vezes após 9 horas de aplicação) tanto na permeação quanto na retenção cutânea do fármaco a partir deste sistema ( $p < 0,05$ ). No entanto, numa terapia tópica da pele, é desejável que haja penetração cutânea, porém com uma alta taxa de retenção e uma baixa taxa de permeação, uma vez que o sítio de ação do fármaco são as camadas da pele (estrato córneo, epiderme viável ou derme), e uma alta permeação, com consequente absorção sistêmica, pode resultar em efeitos adversos indesejados.

Sistemas contendo monoleína, ácido oléico, propilenoglicol e água foram obtidos e avaliados quanto ao efeito na permeação e retenção cutânea da LFQM117. Como observado nas Tabelas 9 e 10, todos os sistemas de monoleína levaram a um aumento na retenção do fármaco ( $p < 0,05$ ), sem, no entanto, promover permeação cutânea. Como já abordado anteriormente, diferentes concentrações de tensoativos e água, acarretam a formação de diferentes fases líquido-cristalinas, as quais favorecem de modo distinto a penetração e a retenção. A adição de água acarreta o entumescimento dos lipídeos, aumentando a viscosidade da formulação.

Algumas proporções monoleína:água foram testadas com o objetivo de obter uma formulação de viscosidade adequada, mantendo permeação e retenção desejáveis. A adição de NaOH à formulação (formulação G) ocorreu a fim de verificar a influência do pH tanto na solubilidade, quanto no comportamento do fármaco retido e permeado. E pôde-se concluir que a alteração de pH não influenciou no comportamento do fármaco, para ambos os aspectos.

A mistura de água e propilenoglicol na formulação H possibilitou que a viscosidade ficasse adequada para ser utilizada topicamente. Além disso, essa formulação apresentou retenção cutânea significativa sem, entretanto, apresentar permeação. Lopes et al. (2006) demonstraram que uma dispersão de monoleína com ácido oléico, poloxamer e água aumentou a retenção cutânea *in vitro* de Ciclosporina A em pele de orelha de porco, sem, entretanto, aumentar a permeação.

Também foi avaliado o aumento da concentração do fármaco na formulação (formulação I) que eleva a atividade termodinâmica do sistema e consequentemente aumenta-se o fluxo através da pele (ALEXANDER et al, 2012). No entanto, o aumento na concentração de LFQM117 para 10% na formulação I não aumentou significativamente a retenção total do fármaco quando comparada à formulação com 1% de fármaco (formulação H), demonstrando que as interações fármaco-veículo-pele se sobrepuseram ao efeito da concentração na liberação do fármaco.

Com base nos resultados obtidos, a formulação que melhor se adequou aos objetivos propostos foi aquela composta por monoleína (65%), ácido oléico (5%), LFQM117 (1%), propilenoglicol (19%) e água (10%) – formulação H. Foi então realizado o estudo da cinética de retenção cutânea *in vitro* da LFQM117 a partir desta formulação (Figura 12), que demonstrou um aumento na retenção cutânea *in vitro* da LFQM117 ( $p < 0,05$ ) em pele de orelha de porco até 12 horas após a aplicação, demonstrando que a formulação está sustentando a liberação do fármaco por este período de tempo. E vale mencionar que durante estes estudos não houve permeação do fármaco até 12 horas. De fato, formulações líquido-cristalinas funcionam como sistemas de liberação controlada de fármacos (BENDER et al., 2005; FORMARIZ et al., 2005; LOPES et al., 2006; MILAK et al., 2015; PEREIRA et al., 2002; VICENTINI et al., 2013). Segundo Herai et al. (2007), em estudos *in vitro*, formulações que apresentaram concentrações de monoleína maiores que 5% conseguiram aumentar o tempo de liberação do fármaco na pele, comprovando que esses sistemas realmente controlam a liberação de fármacos.

A formulação H foi caracterizada quanto à mesofase formada através de microscopia de luz polarizada. A microscopia de luz polarizada fundamenta-se em um campo elétrico de raio luminoso polarizado que uma substância birrefringente é capaz de provocar. O comportamento de uma substância em relação ao efeito que causa na luz polarizada pode ser classificado como anisotrópico ou isotrópico (ABRAMOWITZ et al., 2005). Se a substância permitir a passagem da luz polarizada sem modificação da sua propagação, tem-se o fenômeno de isotropia, exemplo desses sistemas são os micelares, as microemulsões. O arranjo cúbico também possui isotropia e em microscopia de luz polarizada apresenta-se como campo escuro, somente sendo detectado através de outras técnicas de análise, como espalhamento de raios-X de baixo ângulo. O arranjo hexagonal apresenta uma forma chapada típica (estruturas parecidas com fibras), com os agregados de tensoativo organizados em cilindros. Já o arranjo lamelar apresenta-se com várias camadas (lamelas) sobrepostas, formando estruturas denominadas “cruzes-de-malta” e também ocorre formação das “raias oleosas” (Oily Streaks) (CLOGSTON et al., 2000; FORMARIZ et al., 2005; FUJII et al., 2012; MILAK et al., 2015; MÜLLER-GOYMANN, 2004). Conforme observado na Figura 13, as fotomicrografias da formulação H exibem a presença de raias oleosas (indicadas por setas), sugerindo que o cristal líquido encontra-se na fase lamelar. Os cristais líquidos também são

caracterizados por serem formulações estáveis (SANTOS, 2007). A estabilidade da formulação foi avaliada por meio das fotomicrografias realizadas no dia de preparo da formulação e após 30 dias da preparação e observou-se que a formulação manteve-se estável durante o período avaliado, conforme pode ser visualizado na Figura 13.

Mudanças de fase ocorrem quando há alteração na concentração das fases aquosa/oleosa e de tensoativos da formulação (FORMARIZ et al., 2005; RIDELL et al., 2003). De acordo com Martino e Kaler (1995), quando ocorre adição de água em dispersões de monoleína contendo propilenoglicol, há um aumento na força eletrostática repulsiva gerada por ligações de hidrogênio que a água estabelece com o surfactante, tornando o sistema mais viscoso e compacto. Assim, foi avaliada a mudança de fase da formulação após a adição de água, uma vez que, observou-se que durante os estudos de retenção cutânea *in vitro* ocorria uma absorção de água pela formulação, que a tornava mais viscosa. De fato, a incorporação de água na formulação alterou o arranjo líquido-cristalino, como pode ser visualizado na Figura 14. É possível a visualização de fibras ou estrias que caracterizam a formulação como cristal líquido de fase hexagonal.

Os estudos pré-clínicos de retenção cutânea usando modelos animais têm como objetivo a determinação da concentração do analito nas diferentes camadas da pele, e devem ser realizados anteriormente aos estudos clínicos envolvendo voluntários humanos. Entre os modelos animais, os roedores são os mais empregados. Na maioria das vezes utilizam-se ratos dos tipos *hairless*, *Wistar* ou *Srage-Dawley*, sendo a formulação aplicada na região dorsal ou abdominal dos animais (JUNG et al., 2013; KIM et al., 2001; NISHIDA et al., 2010; YANG et al., 2012).

Desta forma, deve-se assumir a importância dos estudos de retenção cutânea *in vivo* para avaliação de formulações tópicas e transdérmicas, em que são consideradas diferentes variáveis que não podem ser facilmente reproduzidas *in vitro* durante ensaios de permeação cutânea usando células de difusão, como metabolismo e circulação sanguínea. Apesar disto, é fundamental considerar que os resultados dos estudos empregando modelos animais não podem ser extrapolados para humanos, principalmente ao se considerar que a permeabilidade da pele de cada animal pode ser significativamente diferente da pele humana, da mesma forma que outras variáveis como o metabolismo e a eliminação do fármaco (CHOI et al.,

2012; JUNG et al., 2013; LOPES et al., 2006). Os resultados referentes ao estudo de retenção cutânea *in vivo* podem ser visualizados na Figura 15.

Os experimentos realizados *in vivo* revelaram que a aplicação do cristal líquido contendo LFQM117 (formulação H) no dorso de ratos Wistar promoveu uma retenção cutânea em ambas as camadas de pele avaliadas e a quantidade de LFQM117 retida na pele foi maior, comparado com os resultados *in vitro*. Uma hipótese sugerida é que, durante os testes *in vitro*, tenha ocorrido uma modificação de fase da formulação, passando de lamelar a hexagonal. Como a fase hexagonal é mais viscosa, ocorre uma diminuição da liberação do fármaco e conseqüentemente uma menor retenção cutânea. Outra hipótese está relacionada com o tipo de pele utilizada nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. A pele de rato utilizada nos estudos *in vivo* é mais fina e permeável do que a pele de orelha de porco utilizada nos experimentos *in vitro* (LANGER; WISE, 1984). Assim, a penetração cutânea tende a ser maior em pele de ratos. Apesar disto, os resultados obtidos *in vivo* confirmaram o observado *in vitro*, que formulações líquido-cristalinas de monoleína promoveram uma penetração cutânea da LFQM117.

O processo inflamatório agudo pode ser definido como um conjunto de alterações bioquímicas e celulares que ocorrem em resposta a estímulos inespecíficos, tais como infecções ou danos teciduais (HANSSON, 2005). A inflamação é uma resposta complexa do tecido vivo e vascularizado, envolvendo eventos como retração de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo local, aumento da migração de granulócitos e células mononucleares, assim como proliferação de tecido ganulomatoso (ARRUDA, 2008).

Pode-se avaliar o efeito de substâncias capazes de reduzir o edema por meio de vários modelos farmacológicos. O teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton é um deles (OLIVEIRA et al., 2013). Esse teste permite avaliar a diminuição do edema por meio da diferença de peso entre a orelha inflamada e a orelha não inflamada.

Os resultados apresentados na Figura 16 referem-se à formação de edema após aplicação do óleo de cróton e diminuição do mesmo após aplicação de formulações distintas.

A diferença entre os pesos das orelhas direita e esquerda dos animais representa a formação de edema após aplicação do óleo de cróton na orelha direita do animal, com ou sem aplicação de formulação, após 30 minutos da aplicação do

óleo, conforme descrito no item 4.2.3.4.2. Pode-se observar que a aplicação do óleo de cróton (controle positivo) realmente ocasiona a formação de edema e que este é diminuído após a aplicação das formulações. Observa-se ainda, que a aplicação da formulação contendo LFQM117 ocasionou uma diminuição do edema em maior proporção que as demais formulações avaliadas (controles: veículo e gel de cetoprofeno), com diminuição de edema na ordem de 20% em relação ao tecido inflamado ( $p < 0,05$ ).

Outro teste que pode ser realizado para avaliação do efeito anti-inflamatório de uma substância é o teste da atividade clorinante da enzima mieloperoxidase. A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima da família das peroxidases que produz ácido hipocloroso (HOCl) na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e cloreto ( $Cl^-$ ). Os neutrófilos armazenam MPO no interior de seus grânulos e em processos inflamatórios ocorre a liberação de MPO no meio extracelular, causando um acúmulo de ácido hipocloroso e espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, a MPO é considerada um marcador de infiltração de células (principalmente neutrófilos) na inflamação. Muitos autores estão estudando sua inibição, focando tanto na cascata de formação de espécies reativas de oxigênio quanto na direta inibição da síntese de HOCl. O efeito inibidor da síntese de HOCl por fármacos anti-inflamatórios vêm sendo bastante investigado, e consiste na quantificação desse ácido para determinação indireta da MPO, por meio do teste da atividade clorinante da mieloperoxidase (ANTWERPEN et al., 2007).

A Figura 17 ilustra a formação de ácido hipocloroso após inflamação induzida por óleo de cróton, conforme descrito na metodologia referente ao teste de edema de orelha, com ou sem tratamento posterior à inflamação.

O tratamento pós-inflamação realizado com a formulação contendo LFQM117 e com o gel contendo cetoprofeno inibiram a formação de ácido hipocloroso em proporções estatisticamente semelhantes (em torno de 59% de inibição) ( $p > 0,05$ ). O tratamento com o veículo causou uma inibição menor da inflamação (em torno de 33%), comparado com as formulações ( $p < 0,05$ ). Essa atividade anti-inflamatória do veículo pode ser atribuída aos seus componentes como a monoleína e o ácido oléico, que promovem uma hidratação da pele e facilitam o processo de reparo e cicatrização tecidual. No grupo controle (orelhas esquerdas em que não houve inflamação) a formação de ácido hipocloroso ocorreu em níveis basais. No grupo Azida ocorreu a formação de níveis baixos de ácido hipocloroso,

confirmando que o produto formado é o ácido hipocloroso, pois a azida é um inibidor seletivo desse ácido. No caso das análises realizadas sem a amostra, apenas com os reagentes participantes da reação, não houve quantificação do ácido hipocloroso, ratificando a confiabilidade do método analítico adotado.

Com base nos resultados dos estudos de atividade anti-inflamatória, pode-se sugerir que a LFQM117 atua por inibição da migração de neutrófilos para o local da inflamação. A indução de E-selectina na superfície do endotélio por Interleucina (IL-1) e Fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) promove a migração precoce de neutrófilos. Esta indução dura de 4 a 12 horas e a expressão desaparece após 24 horas. Como o teste da atividade clorinante da mieloperoxidase foi realizado após 6 horas e trinta minutos decorridos da aplicação do óleo de cróton, pode-se dizer que a LFQM117 atua na fase aguda e inicial da inflamação e foi capaz de diminuir a extensão do edema formado, bem como a migração de neutrófilos para o local da inflamação.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados neste trabalho pode-se concluir que o método desenvolvido para determinação analítica de LFQM117 por CLAE em estudos de liberação e permeação cutânea *in vitro* mostrou-se seletivo, sensível, exato e preciso; a partir da determinação da solubilidade e do coeficiente de partição octanol/água ( $\log P$ ) foi possível concluir que a LFQM117 apresenta baixa solubilidade em água e caráter lipofílico; a LFQM117 mostrou-se estável nas condições de estresse avaliadas; a LFQM117 não apresentou penetração cutânea *in vitro* satisfatória, quando presente num veículo simples, o que condiz com sua estrutura altamente lipofílica; sistemas contendo monoleína foram capazes de aumentar significativamente a retenção cutânea *in vitro* e *in vivo* da LFQM117, sem provocar um aumento na permeação cutânea, o que é desejável para um produto de aplicação tópica; a atividade anti-inflamatória *in vivo* da LFQM117 a partir de um sistema contendo monoleína (formulação H) foi demonstrada através dos ensaios de avaliação de edema de orelhas e de determinação da atividade da enzima mieloperoxidase; o sistema contendo monoleína (formulação H) mostrou-se promissor para administração da benzofenona LFQM117, como um anti-inflamatório tópico.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ABRAMOWITZ, M.; PARRY-HILL, M. J.; DAVIDSON, M. **Polarized light microscopy**. 2005. Disponível em: <<http://www.microscope.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/filters/index.html>>. Acesso em: 12 dez. 2013.
- ALEXANDER, A. et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **J Control Release**, v. 164, n. 1, p. 26-40, 2012.
- ALLAN, G. et al. Myeloperoxidase activity as a quantitative marker of polymorphonuclear leukocyte accumulation into an experimental myocardial infarct--the effect of ibuprofen on infarct size and polymorphonuclear leukocyte accumulation. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 7, n. 6, p.1154-1160, 1985.
- ALLEN, L.; ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- ANISSIMOV, Y. G. et al. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. **Adv. Drug Deliv.**, v. 65, n. 2, p. 169-190.
- ANTWERPEN, P. V. et al. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs: flufenamic acid and its 5-chloro-derivative directly interact with a recombinant human myeloperoxidase to inhibit the synthesis of hypochlorous acid. **Eur J Pharmacol.**, v. 570, p. 235–243, 2007.
- ARRUDA, V. M. **Avaliação farmacológica das atividades anti-inflamatória, analgésica e anti-ucero gênica do fitoterápico Sanativo®**. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pernambuco, Pernambuco, 2008.
- BADRAN, M. M.; KUNTSCHE, J.; FAHR, A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: dependency on needle size and applied formulation. **Eur J Pharm Sci**, v. 36, n. 4-5, p. 511-523, 2009.

BAKANA, P. et al. Structure and chemotherapeutical activity of a polyisoprenylated benzophenone from the stem bark of *Garcinia Huillensis*. **J Ethnopharmacol.**, v. 21, p. 75-84, 1987.

BANDGAR, B. P. et al. Synthesis and biological evaluation of nitrogen-containing benzophenone analogues as TNF-  $\alpha$  and IL-6 inhibitors with antioxidant activity. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 20, p. 2292-2296, 2010.

BARNES, D. **Efeito do ultrassom sobre a nocicepção e o processo inflamatório em modelos animais e sobre a estrutura química de fármacos**. 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento) – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2008.

BARRY, B. W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**. New York: Marcel Dekker, 1983.

BAZZO, G. C.; SILVA, M. A. S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 3, p. 315-322, 2005.

BENDER, J. et al. Lipid cubic phases for improved topical drug delivery in photodynamic therapy. **J. Control. Release**, v. 106, p. 350–360, 2005.

BORNÉ, J.; NYLANDER, T.; KHAN, A. Phase behavior and aggregate formation for the aqueous monoolein system mixed with sodium oleate and oleic acid. **Langmuir**, v. 17, p. 7742–7751, 2001.

BOYD, B. J. et al. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. **Int. J. Pharm.**, v. 309, p. 218-226, 2006.

BRADLEY, P. P. et al. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618–622, 1982.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. RDC No. 27, 2012.

BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 12. ed. New York: McGraw Hill, 2011.

CEVC, G; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. **J Control Release.**, v. 141, n. 3, p. 277- 299, 2010.

CHOI, J. et al. Effect of fatty acids on the transdermal delivery of donepezil: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Int J Pharm.**, v. 422, p. 83–90, 2012.

CHORILLI, M. et al. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev Bras Farm.**, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

CHORILLI, M. et al. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Quim. Nova**, v. 32, n. 4, p. 1036-1040, 2009.

CIRRI, M. et al. Development of a new delivery system consisting in "drug--in cyclodextrin--in nanostructured lipid carriers" for ketoprofen topical delivery. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 80, n. 1, p. 46-53, 2012.

CLOGSTON, J. et al. Phase behavior of a monoacylglycerol (Myverol 18-99K): water system. **Chem Phys Lipids.**, v. 107, p. 191–220, 2000.

COSTA, A. D.; MACHADO, S.; SELORES, M. Corticóides tópicos, considerações sobre a sua aplicação na patologia cutânea. **Rev Port Clin Geral**, v. 21, p. 367-73, 2005.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CREMONEZ, C. P. et al. Caracterização do intumescimento de sistemas líquido-cristalinos de fase lamelar de monoleína e água contendo polihexametilenobiguanida. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 34, n. 4, p. 545-553, 2013.

DARLENSKI, R. et al. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 72, n. 2, p. 295 - 303, 2009.

DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Effective use of transdermal drug delivery in children. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 73, p. 63-82, 2014.

DYPBUKT, J. M. et al. A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase. **Free Radic Biol Med.**, v. 39, p. 1468–1477, 2005.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 34, n. 4-5, p. 203 -222, 2008.

FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Curr Opin Colloid In**, v. 17, n. 5, p. 306-313, 2012.

FARAHMAND, S.; MAIBACH, H. I. Transdermal drug pharmacokinetics in man: Interindividual variability and partial prediction. **Int J Pharm.**, v. 367, n. 1-2, p. 1-15, 2009.

FERREIRA, D. A. et al. Cryo-TEM investigation of phase behaviour and aggregate structure in dilute dispersions of monoolein and oleic acid. **Int J Pharm.**, v. 310, p. 203-212. 2006.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras), v. 6, p. 36-41, 2008.

FLOT, J.; DAVOLOS, M. R., CORREA, M. A. Protetores Solares. **Quim Nova**, v. 30, n.1, p. 153-158, 2007.

FONG, C.; LE, T.; DRUMMOND, C.J. Lyotropic liquid crystal engineering-ordered nanostructured small molecule amphiphile self-assembly materials by design. **Chem Soc Rev.**, v. 41, p. 1297-1322, 2012.

FONG, W. K.; HANLEY, T.; BOYD, B.J. Stimuli responsive liquid crystals provide 'on-demand' drug delivery in vitro and in vivo. **J Control Release.**, v. 135, p. 218-226, 2009.

FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev Bras Farm.**, v. 41, n. 3, p. 301–313, 2005.

FRASCH, H. F.; BARBERO, A. M. Application of numerical methods for diffusion-based modeling of skin permeation. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 65, n. 2, p. 208–220, 2013.

FUJII, S. et al. Shear-induced onion formation of polymer-grafted lamellar phase. **Soft Matter**, v. 8, p. 5381- 5390, 2012.

FULLER, R. W. et al. Vismiaphenones D-G, new prenylated benzophenones from *Vismia cayennensis*. **J Nat Products**, v. 62, p. 67-69, 1999.

GELLER, M. et al. Utilização do diclofenaco na prática clínica: revisão das evidências terapêuticas e ações farmacológicas. **Rev Bras Clin Med.**, v. 10, n. 1, p. 29-38, 2012.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 59, n. 11, p. 1152-1161, 2007.

GUO, C. et al. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug DiscovToday**, v. 15, n. 23-24, p. 1032-1040, 2010.

HADCGRAFT J. Skin, the final frontier. **Int J Pharm.**, v. 224, p.1-18, 2001.

HADCGRAFT, J.; LANE, E. M. Skin permeation: The years of enlightenment. **Int J Pharm**, v. 305, p. 2-12, 2005.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **New Engl J Med**, v. 352, n. 16, p. 1685-1695, 2005.

HOLLER, F. J; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HERAI, H. et al. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. **Int J Pharm.**, v. 329, n. 1-2, p. 88-93, 2007.

ICH - International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Publications: Guidelines. "Quality" topics. **Q2 (r1) Validation of Analytical Procedures: text and methodology**. Geneva, 2005. 13 p.

JEPPS, O. G. et al. Modeling the human skin barrier towards a better understanding of dermal absorption. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 65, n. 2, p. 152–168, 2013.

JORGE, L. L.; FERES, C. C.; TELES, V. E. Topical preparations for pain relief: efficacy and patient adherence. **J Pain Res.**, v. 4, p. 11-24, 2010.

JUNG, E. et al. Effect of permeation enhancers on transdermal delivery of fluoxetine: in vitro and in vivo evaluation. **Int J Pharm.**, v. 456, n. 2, p. 362-369, 2013.

KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Modeling transdermal drug release. **Adv Drug Deliver Rev**, Amsterdam, v. 48, n. 2-3, p. 159-172, 2001.

KARADZOVSKA, D. et al. Predicting skin permeability from complex vehicles. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 65, p. 265–277, 2013.

KASLIWAL, N. et al. Effect of permeation enhancers on the release and permeation kinetics of meloxicam gel formulations through rat skin. **Asian J Pharm Sci**, v. 3, n. 5, p. 193-199, 2008.

KHANUM, S. A.; SHASHIKANTH, S.; DEEPAK, A. V. Synthesis and anti-inflammatory activity of benzophenone analogues. **Bioorg Chem**, v. 32, p. 211, 2004.

KIM, M. K. et al. Formulation of a reservoir-type testosterone transdermal delivery system. **Int J Pharm.**, v. 219, n. 1-2, p. 51-59, 2001.

KOMATSU, T.; SAKURADA, T. Comparison of the efficacy and skin permeability of topical NSAID preparations used in Europe. **Eur J Pharm Sci.**, v. 47, n. 5, p. 890-895, 2012.

KRAINEVA, J. et al. Kinetics of lamellar-to-cubic and inter-cubic phase transitions of pure and cytochrome c containing monoolein dispersions monitored by time-resolved

small-angle X-ray diffraction. **Langmuir**, v. 21, p. 3559-3571, 2005.

KRETSOS, K. et. al. Partitioning, diffusivity and clearance of skin permeants in mammalian dermis. **Int J Pharm.**, v. 346, p. 64-79, 2008.

LAGER, R.; WISE, D. **Medical applications of controlled release**. Flórida: CRC, 1984. v. 1, cap.7, p. 203-251.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv Drug Deliver Rev**, n. 45, p. 89–121, 2000.

LEE, J.; KELLAWAY, I. W. Buccal permeation of [D-Ala(2), D-Leu(5)]enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **Int J Pharm.**, v. 195, p 35-38, 2000b.

LEES, P. et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **J Vet Pharmacol Ther.**, v. 27, p. 479-490, 2004.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: drug delivery and crystallization applications. **J Colloid Interface Sci.**, v. 356, p. 375-386, 2011.

LIBSTER, D. et al. Concentration- and temperature-induced effects of incorporated desmopressin on the properties of reverse hexagonal mesophase. **J Phys Chem B.**, v. 113, p. 6336-6346, 2009.

LOPES, L. et al. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: in vitro and in vivo skin penetration of cyclosporin A. **Pharm Res.**, v. 23, p. 1332-1342, 2006a.

LOPES, L. et al. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: characterization and study of in vitro and in vivo delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v. 63, p.146–155, 2006b.

LOPES, L.; SPERETTA, F.; BENTLEY, M. V. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **Eur J Pharm Sci**, v. 32, p. 209–215, 2007.

MARTINDALE. **The complete drug reference**. 32. ed. London: Pharmaceutical Press, p. 1486-1487, 1999.

MARTINO, A.; KALER, E. W. The stability of lamellar phases in water, propylene glycol, and surfactant mixtures. **J Colloid Interface Sci.**, v. 99, p. 91-99, 1995.

MARTINS, M. R. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Braz J Pharm Sci**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MATHES, S. H.; RUFFNER, H.; GRAF-HAUSNER, U. The use of skin models in drug development. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 69-70, p. 81–102, 2014.

MÉLOT, M. et al. Studying the effectiveness of penetration enhancers to deliver retinol through the stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy. **J Control Release**, v. 138, n. 1, p. 32–39, 2009.

MILAK, S.; ZIMMER, A. Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems. **Int J Pharm.**, v. 478, n. 2, p. 569–587, 2015.

MINICK, D. J. et al. A comprehensive method for determining hydrophobicity constants by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Med Chem.**, v. 31, n. 10, p. 1923 – 1933, 1988.

MISHRAKI, T. et al. Lysozyme entrapped within reverse hexagonal mesophases: physical properties and structural behavior. **Colloids Surf B Biointerfaces**. v. 75, p. 47-56, 2010.

MULLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 58, p. 343–356, 2004.

MURATA, R. M. et al. Inhibitory effects of 7-epiclusianone on glucan synthesis, acidogenicity and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 282, p. 174–181, 2008.

MURATA, R. M. et al. Antiproliferative effect of benzophenones and their influence on cathepsin activity. **Phytother Res.**, v. 24, n. 3, p. 379-383, 2010.

MUTALIK, S. et al. Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for quantification of peptide dendrimers in human skin permeation experiments. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 877, n. 29, p. 3556- 3562, 2009.

NISHIDA, N. et al. Development and evaluation of a monolithic drug-in-adhesive patch for valsartan. **Int J Pharm.**, v.402, n.1-2, p. 103-109, 2010.

NORLING, T. et al. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **J Clin Periodontol.**, v. 19, p. 687-692, 1992.

NOTMAN, R.; ANWAR, J. Breaching the skin barrier--insights from molecular simulation of model membranes. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 65, n. 2, p. 237-250, 2013.

OLIVEIRA, R. B. et al. Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. **Braz. J. Pharmacog**, v. 23, n. 3, p. 497-505, 2013.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quím Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

PEREIRA, G. R. et al. Glycerol monooleate/solvent systems for progesterone transdermal delivery: in vitro permeation and microscopic studies. **Brazilian J. Pharm. Sci.**, v. 38, n. 1, p. 55-62, 2002.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17; p. 339–345, 2010.

PHAN, S. et al. Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release. **Int J Pharm.**, v. 421, p. 176-182, 2011.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**, 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

REZENDE, C. M. et al. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. **Bioorg Med Chem.**, v.

21, n. 11, p. 3114-3119, 2013.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIDELL, A. et al. On the water content of the solvent/monoolein/water sponge (L<sub>3</sub>) phase. **Colloid Surface A**, v. 228, p. 17-24, 2003.

ROMAY, C.; LEDON, N.; GONZÁLEZ, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. **Inflamm. Res.**, v. 47, n. 8, p. 334-338, 1998.

ROSSETTI, F. C. et al. Analysis of liquid crystalline nanoparticles by small angle X-ray diffraction: evaluation of drug and pharmaceutical additives influence on the internal structure. **J Pharm Sci.**, v. 100, p. 2849-2857, 2011.

RUBIO, O. C. et al. Polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. **J Nat Products**, v. 62, p. 1013-1015, 1999.

RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B.; PEREIRA, G. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação in vitro. **Quím. Nova**, v. 32, p. 165-168, 2009.

SAKEENA, M. H. F. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of ketoprofen in palm oil esters nanoemulsion. **J Oleo Sci.**, v. 59, p. 667-671, 2010.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **Eur J Pharmacology**, v. 670, p. 280-285, 2011.

SANTOS, O. D. H.; ROCHA FILHO, P. A. Influence of surfactant on the thermal behaviour of marigold oil emulsions with liquid crystal phases. **Drug Dev Ind Pharm.**, v. 33, p. 543 – 549, 2007.

SCHIERWAGEN, C.; BYLUND-FELLENIIUS, A. C.; LUNDBERG, C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. **J Pharmacol Methods.**, v. 23, n. 3, p. 179–186, 1990.

SEDDON, A. **Bridging the gap between in vitro and in vivo models**. Bristol Centre for Functional Nanomaterials. Disponível em: <<http://www.portal.bcf.n.bris.ac.uk>>. Acesso em: 8 jun. 2015.

SHAH, J. C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 47, p. 229-250, 2001.

SILVA, J. A. **Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados**. 2008. 180f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SILVA, J. A. et al. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Quím Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389-93, 2009.

TAVARES, L. C. QSAR: A ABORDAGEM DE HANSCH. **Quim. Nova**, v. 27, p. 631-639, 2004.

TOJO, K. et al. Percutaneous penetration of drugs: a quantitative structure-permeability relationship study. **J. Pharm. Sci.**, v. 76, n. 2, p. 123-126, 1987.

TYLE, P. Liquid Crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: polymer and aggregate systems**. New York: VCH Publishers, 1989. Chapter 4, p. 125-162.

USA, F.D.A.; Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2001.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). 35. ed. Nacional Formulary 30. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2012.

VICENTINI, F. et al. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 83, n. 1, p. 16–24, 2013.

VOOTURI, S. K. et al. Benzophenones containing tetraamides. **J Med Chem**, v. 52, p. 5020–5031, 2009.

WELLS, J. I. **Pharmaceutical preformulation**: the physicochemical properties of

drug substances. Chichester: Ellis Horwood, 1988.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, p. 128-137, 2012.

WOKOVICH, A. M. et al. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 64, n. 1, p. 1-8, 2006.

YANG, Y. et al. Development and validation of in vitro-in vivo correlation (IVIVC) for estradiol transdermal drug delivery systems. **J. Control. Release**, v. 210, p. 58-66, 2015.

YULIN, C.; PING, M.; SHUANGYING, G. Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems. **Biomed Res Int.**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

YESUDIAN, P. D. Severe contact urticaria and anaphylaxis from benzophenone-3 (2-hydroxy 4-methoxy benzophenone). **Cont Dermatitis**, v. 46, p. 55-56, 2002.

ZAIA, D. A. M. et al. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quim. Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZHAO, Y. et al. A dynamic topical hydrofluoroalkane foam to induce nanoparticle modification and drug release in situ. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 72, n. 3, p. 521-528, 2009.

ZHAO, Y.; BROWN, M. B.; JONES, S. A. Engineering novel topical foams using hydrofluoroalkane emulsions stabilized with pluronic surfactants. **Eur J Pharm Sci.**, v. 37, n. 3-4, p. 370-377, 2009.