



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Mestrado Profissional

Dissertação de Mestrado

**Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol:
Desenvolvimento, Caracterização e Estudo de
Liberação *in vitro***

Alessander Carlos Bedin

Toledo, 2011



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Mestrado Profissional

**Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol:
Desenvolvimento, Caracterização e Estudo de
Liberação *in vitro***

*Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia*

Orientadora: Profa. Dra. Elenara Lemos Senna

Alessander Carlos Bedin

Toledo, 2011

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da Indústria Farmacêutica Prati, Donaduzzi.

Aos meus pais, Ciro Rocha Bedin e Iraci Eliza Bedin,
por sempre acreditarem em mim,
dedico, mais esta conquista, como forma de
gratidão.

Agradecimentos

Aos meus pais, Ciro Rocha Bedin e Iraci Eliza Bedin que durante toda a minha vida foram incentivadores do meu desenvolvimento intelectual e cultural, servindo de grandes exemplos para mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Elenara Lemos Senna, pela paciência e pelo grande empenho para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos do laboratório Prati, Donaduzzi e Biocinese: Lislaine, Andressa, Jean, Tuany pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho. Faço um agradecimento especial a Mariana Dalagnol e ao Luigi Berreta da UFSC, cuja colaboração na realização deste trabalho foi de muita importância.

À minha esposa, Rubia Fabiana Porsch, pelos sábios conselhos e apoio moral nas dificuldades.

À Mariely Pritsch, pela colaboração e prestatividade dispensada nos estudos de liberação

Ao Leandro Santolin, pelo forte apoio na parte analítica desse trabalho.

Ao Maurício Bedin, pelo forte apoio na parte estatística desse trabalho.

“ O ú n i c a o n d e o s u g c e s s o v e m a n t e s d o t r a b a l h o é n o d i c i o n á r i o ”

Albert Einstein

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

2 OBJETIVOS 27

2.1 Objetivo geral 27

2.2 Objetivos específicos 27

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 28

3.1 Administração vaginal de medicamentos 28

3.1.1 A mucosa vaginal 28

3.1.2 Infecções vaginais 29

3.2 Benzoilmetronidazol 30

3.3 Nanomedicina & Nanotecnologia farmacêutica 33

3.4 Nanoemulsões 35

3.4.1 Composição das nanoemulsões 37

3.4.1.1 Óleos 37

3.4.1.2 Tensoativos 38

3.4.1.3 Demais adjuvantes 41

3.4.2 Preparação e formação das nanoemulsões 41

- 3.4.2.1 Métodos que utilizam alta energia de emulsificação 42
- 3.4.2.2 Métodos que utilizam baixa energia de emulsificação 46
- 3.4.2.3 A técnica da emulsificação espontânea 48
- 3.4.2.4 Transposição para escala industrial (Scale up) 50
- 3.4.3 Caracterização das nanoemulsões 52
 - 3.4.3.1 Tamanho das gotículas da fase interna 53
 - 3.4.3.2 Potencial zeta 55
 - 3.4.3.3 Microscopia Eletrônica 57
 - 3.4.3.4 Estudo de liberação in vitro 61
- 3.4.4 Estabilidade das nanoemulsões 62

4 *MATERIAIS E MÉTODOS 64*

4.1 Materiais 64

- 4.1.1 Matérias-primas 64
- 4.1.2 Reagentes e solventes 64
- 4.1.3 Equipamentos e acessórios 65

4.2 Métodos 66

- 4.2.1 Determinação da solubilidade do BZM em óleos 66

4.2.2 Preparação das nanoemulsões 66

4.2.3 Preparação do gel de hipromelose contendo as nanoemulsões de BZM 67

4.3 Caracterização das nanoemulsões 67

4.3.1 Determinação do diâmetro de gotícula 67

4.3.2 Determinação do potencial zeta 68

4.3.3 Determinação do pH 69

4.3.4 Determinação da viscosidade 69

4.3.5 Avaliação da morfologia das nanoemulsões contendo BZM 69

4.3.6 Determinação do teor de BZM nas nanoemulsões 70

4.3.6.1 Condições instrumentais e analíticas 70

4.3.6.2 Validação da metodologia analítica 70

4.3.6.2.1 Especificidade 70

4.3.6.2.2 Linearidade 71

4.3.6.2.3 Limites de detecção e quantificação 71

4.3.6.2.4 Precisão intradia e interdia 71

4.3.6.2.5 Exatidão 71

4.3.6.2.6 Robustez 72

4.3.6.3 Determinação do teor de BZM nas nanoemulsões 72

4.3.6.4 Análise estatística 72

4.3.7 Estudo de liberação *in vitro* 72

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 74

5.1 Determinação da solubilidade do benzoilmetronidazol em diferentes óleos 74

5.2 Preparação e caracterização físico-química das nanoemulsões 75

5.3 Determinação do teor de BZM nas nanoemulsões por CLAE 78

5.3.1 Seleção das condições de análise 78

5.3.2 Validação da metodologia analítica 80

5.3.2.1 Especificidade 80

5.3.2.2 Linearidade 82

5.3.2.3 Precisão 83

5.3.2.4 Exatidão 86

5.3.2.5 Robustez 86

5.3.3 Determinação do teor de BZM nas nanoemulsões 87

5.4 Preparação e caracterização do gel de hipromelose contendo as nanoemulsões 88

5.5 Estudo de liberação *in vitro* 90

6 CONCLUSÕES 93

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 95

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática da organização estrutural das nanoemulsões.** _____ 25
- Figura 2: Representação esquemática do epitélio pluriestratificado pavimentoso não queratinizado da vagina na mulher em idade reprodutiva.** _____ 28
- Figura 3: Estrutura química do Benzoilmetronidazol.** _____ 31
- Figura 4: Estrutura química do (a) 2-metil-5-nitroimidazol , (b) metronidazol e (c) ácido benzóico.** _____ 33
- Figura 5: Ilustração de alguns sistemas de liberação nanoestruturados.** _____ 34
- Figura 6: Fotografia de uma nanoemulsão (à esquerda) e de uma macroemulsão (à direita).** _____ 35
- Figura 7: Estrutura química de um tensoativo aniônico.** _____ 38
- Figura 8: Estrutura química da Lecitina.** _____ 39
- Figura 9: Estrutura química do Solutol HS 15.** _____ 40
- Figura 10: Estrutura química do Polissorbato 80.** _____ 41
- Figura 11: Homogeneizador de alta velocidade do tipo rotor estator (Turbotest, Rayneri). (a) haste do misturador e (b) hélice do misturador.** _____ 43
- Figura 12: Homogeneizador ultrassônico. (a) Processador mostrando agitação em banho de água para dissipar calor produzido pelo ultrassom (HIELSCHER, 2005). (b) Sondas de ultrassom apresentando diferentes geometrias (Sonopuls, Bandelin Eletronic).** _____ 44

Figura 13: Homogeneizador de alta pressão. (a) equipamento Emulsiflex C-3 (Avestin) com capacidade de 3L/hora, (b) Esquema da válvula de passagem de da emulsão. _____45

Figura 14: (a) Microfluidizador® (Microfluidics, UK), (b) Esquema de funcionamento da microfluidização. _____46

Figura 15: Representação esquemática do possível mecanismo de formação de nanoemulsões O/A pelo método PIT. A curvatura do surfactante é alterada pelo resfriamento e a fase bicontínua D é rompida, formando nanogotas. (a) microemulsão D está inicialmente em equilíbrio de fase; (b) duas fases, W + D, estão inicialmente em equilíbrio. _____47

Figura 16: Esquema de preparação de nanoemulsões pela técnica de emulsificação espontânea. _____49

Figura 17: Principais parâmetros envolvidos na transposição de escala de nanoemulsões obtida pela técnica de emulsificação espontânea. _____52

Figura 18: Diagrama de um analisador granulométrico por difração a laser. a) Nenhuma partícula na célula de medição. b) Com partículas da amostra na célula de medição. _____54

Figura 19: Representação esquemática do potencial zeta. _____56

Figura 20: Aspecto da coluna do microscópio eletrônico de transmissão (MET). (A): Secção da coluna (Philips, EM 200); (B): Aspecto exterior (Leo, Libra 120). _____59

Figura 21: (A) Aspecto externo do microscópio de força atômica (MFA) e acessórios (MFP-3D-BIO, Asylum Research); (B) Esquema do princípio de funcionamento do MFA. _____60

Figura 22: Célula de difusão de Franz. _____61

Figura 23: Fotomicrografias obtidas por MET a partir das nanoemulsões contendo BZM (a) SOL e (b) SOL+TW _____ 78

Figura 24: Espectro de absorção da (a) solução padrão de BZM em metanol:água (50:50, v/v) (0,1mg/mL) e (b) da nanoemulsão. _____ 79

Figura 25: Cromatogramas obtidos após análise por CLAE das (a) nanoemulsões contendo BZM, (b) nanoemulsões brancas, (c) metronidazol base e (d) ácido benzóico. _____ 81

Figura 26: Curva de calibração do BZM obtida após análise das soluções padrões do fármaco por CLAE. _____ 82

Figura 27: Estrutura química do monômero da HPMC. _____ 89

Figura 28: Perfil de liberação do BZM a partir dos hidrogéis contendo as nanoemulsões e da formulação comercial. _____ 91

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Composição da fase oleosa das nanoemulsões contendo BZM. _____ 67**
- Tabela 2. Solubilidade do BZM em diferentes tipos de óleos. _____ 74**
- Tabela 3: Características físico-químicas das nanoemulsões _____ 76**
- Tabela 4: Resumo dos resultados obtidos após análise da regressão linear dos dados da curva de calibração do BZM. _____ 83**
- Tabela 5. Valores obtidos na avaliação da precisão intra-corrida (repetibilidade) do método de CLAE. _____ 84**
- Tabela 6. Valores obtidos na avaliação da precisão inter-corrida (precisão intermediária) do método de CLAE. _____ 85**
- Tabela 7. Valores de recuperação do benzoilmetronidazol após contaminação da nanoemulsão branca SOL+TW. _____ 86**
- Tabela 8: Parâmetros analíticos e valores experimentais obtidos na avaliação da robustez para a nanoemulsão de BZM. _____ 87**
- Tabela 9: Determinação do teor de BZM nas formulações SOL e SOL+TW. _____ 88**
- Tabela 10: Valores de pH e viscosidade dos hidrogéis contendo as nanoemulsões SOL e SOL+TW brancas e com BZM. _____ 89**
- Tabela 11: Parâmetros de liberação obtidos após análise da regressão linear da porção ascendente dos perfis de liberação. _____ 91**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O - água em óleo

ANOVA – análise de variância

BZM - benzoilmetronidazol ou benzoato de metronidazol

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DPR - desvio padrão relativo

dp – desvio padrão

EHL – equilíbrio hidrófilo-lipófilo

EPI – inversão de fases da emulsão

FDA – Food and Drug Administration

HPMC - hidroxipropilmetilcelulose ou hipromelose

J_{ss} – fluxo de permeação

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

m/v – massa/volume

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MFA – microscopia de força atômica

mg/mL – miligramas/mililitros

mL/min – mililitros/minuto

mV - milivolts

nm - nanômetro

O/A - óleo em água

PCS – espectroscopia de correlação fotônica

PIT – temperatura de inversão de fases

qsp – quantidade suficiente para

SOL – nanoemulsão com Solutol HS15

SOL+TW – nanoemulsão com Solutol HS15 + Tween80

SPAN – amplitude relativa

TCL - triglicerídeos de cadeia longa

TCM – triglicerídeos de cadeia média

UV – ultravioleta

µg - micrograma

µL – microlitro

µm – micrômetro

v/v – volume/volume

RESUMO

O benzoilmetronidazol (BZM) é um fármaco lipossolúvel e de escolha para o tratamento da tricomoníase e da amebíase sintomática. Também é considerado tratamento alternativo para giardíase, infecções bacterianas aeróbicas e anaeróbicas graves e vaginites causadas por *Gardnerella vaginalis*. Nesse trabalho, sistemas nanoemulsionados contendo BZM foram obtidos pela técnica de emulsificação espontânea, visando à administração tópica vaginal. Em uma primeira etapa, duas diferentes formulações foram preparadas, diferindo quanto ao sistema surfactante empregado, Solutol HS 15 ou Solutol HS 15 + Tween 80, as quais foram denominadas de SOL e SOL+TW, respectivamente. A solubilidade do BZM em vários óleos foi previamente testada, e os resultados obtidos após análise por CLAE levaram à seleção do óleo de oliva como componente oleoso das formulações. A técnica de emulsificação espontânea conduziu à obtenção de nanoemulsões com diâmetro médio de gotícula que variou de 90 a 740nm, o qual foi confirmado após visualização das formulações por microscopia eletrônica de transmissão. As nanoemulsões apresentaram potencial zeta negativo, decorrente da presença de lecitina nas formulações, mas os valores obtidos foram relativamente baixos, provavelmente devido à presença do surfactante não iônico na superfície das gotículas. Visando a obtenção de uma forma farmacêutica para uso tópico, hidrogéis contendo as nanoemulsões foram preparados pela adição de hipromelose às dispersões coloidais. Os resultados de viscosidade e pH dos hidrogéis foram similares para as formulações SOL e SOL+TW. Na segunda etapa do trabalho, uma metodologia analítica de CLAE foi desenvolvida e validada para a quantificação do BZM nas nanoemulsões. O método demonstrou ser linear, preciso, exato e específico para a determinação do BZM nas formulações. O teor de BZM foi de 0,943mg/mL e 0,969 mg/mL para as formulações SOL e SOL+TW, respectivamente. Em uma última etapa, foi realizado o estudo de liberação *in vitro* do BZM a partir dos hidrogéis contendo as nanoemulsões e do medicamento comercial na forma de emulsão, utilizando células de difusão tipo Franz e

membrana sintética de acetato de celulose. O fluxo (J , $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) e coeficiente de permeabilidade (K_p , $\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) variaram na seguinte ordem: SOL+TW < GENÉRICO < SOL. O conjunto dos resultados obtidos demonstra a influência dos componentes das formulações sobre as propriedades físico-químicas das nanoemulsões, bem como no perfil de liberação *in vitro* do BZM.

Palavras-chave: benzoilmetronidazol, nanoemulsões, administração vaginal, emulsificação espontânea

ABSTRACT

Benzoylmetronidazol (BZM) is a hydrophobic drug which is the first choice for the treatment of symptomatic trichomoniasis and amoebiasis. It is also considered an alternative drug for giardiasis, severe aerobic and anaerobic bacterial infections and vaginitis caused by *Gardnerella vaginalis*. In this study, nanoemulsions systems containing BZM were obtained by the spontaneous emulsification technique, aiming the intravaginal administration. Firstly, two different formulations were prepared using Solutol HS 15 and Solutol HS 15 + Tween 80 as surfactant systems and they were named as SOL and SOL+TW, respectively. The solubility of the BZM in different oils was previously evaluated and the results obtained after HPLC analyses conducted the selection of olive oil as oily component of the formulations. Nanoemulsions displayed mean droplet size ranging from 90 to 740nm, and this result was confirmed by transmission electron microscopy (TEM). The nanoemulsions exhibited negative zeta potential values, due to the presence of lecithin in the formulations, but the values were quite low and these results were related to the location of the non ionic surfactant at the droplet surface. Aiming to obtain a topical pharmaceutical dosage form, hydrogels were prepared by adding hypromellose into colloidal dispersions. The viscosity and pH values of hydrogels containing SOL and SOL+TW nanoemulsions were similar. In the second step, a HPLC method was developed and validated to quantify BZM in the nanoemulsions. The method was linear, precise, accurate and specific for determining the BZM in the formulations. The BZM content in the nanoemulsions was 0,943mg/mL and 0,969 mg/mL for SOL and SOL + TW, respectively. Finally, *in vitro* release studies of BZM from hydrogels containing nanoemulsions, as well as, from the market drug were carried out using Franz diffusion cells and cellulose acetate synthetic membrane. The permeation flux (J_{ss}) and permeability coefficient (K_p) was estimated after constructing a graph of the amount of drug permeated per unit area ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus time (min). The flux and permeability coefficient values decreased in the following order:

SOL+TW < market drug < SOL. These results evidenced the effect of the formulation composition on the nanoemulsion physicochemical properties as well as on the *in vitro* release profiles of the drug.

Keywords: benzoylmetronidazole, nanoemulsions, vaginal administration, spontaneous emulsification

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa e desenvolvimento de medicamentos são essenciais para a descoberta de produtos utilizados na luta contra doenças (VIDOTTI & CASTRO, 2009), além de ser estratégica para as empresas farmacêuticas. Acima de qualquer outro setor, a indústria farmacêutica mundial é a que mais investe em pesquisa, desenvolvimento e inovação, cerca de 20% do seu faturamento das vendas, contra 6% da indústria eletrônica, 5% das indústrias de telecomunicações e 4% da indústria automobilística (KALIL, 2007). Apesar de o Brasil ocupar a nona posição do mundo em relação às vendas de medicamentos, a indústria farmacêutica de capital nacional brasileira ainda é bastante incipiente, sendo considerada uma indústria de transformação. Apenas sete empresas nacionais figuram entre as 20 maiores indústrias farmacêuticas instaladas no Brasil. Assim, a grande maioria dos insumos farmacêuticos e de alguns medicamentos acabados é importada dos principais países desenvolvidos e/ou países em desenvolvimento (China, Índia, Israel e Coréia) (CALIXTO, 2008 ; CALIXTO & SIQUEIRA, 2008).

A constante busca por novos conhecimentos e a necessidade de dominar novas tecnologias, está rapidamente impelindo a humanidade para a próxima revolução tecnológica, ou seja, o domínio da nanotecnologia. A nanotecnologia é a ciência que está envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas que ocorrem a nível molecular e em escala nanométrica, onde o prefixo nano corresponde a bilionésima parte do metro. Como uma ciência que engloba o campo multidisciplinar, a nanotecnologia também está presente na biofísica, na biologia molecular e na bioengenharia. Atualmente, a nanotecnologia é um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em todos os países industrializados do mundo. Os investimentos superam dois bilhões de dólares por ano e o seu desenvolvimento tem sido apontado como uma nova revolução tecnológica, que, em ritmo acelerado de crescimento, simboliza uma área estratégica para economias consolidadas e emergentes, promovendo uma competição tecnológica mundial, dentro de um mercado de um trilhão de dólares estimados para o período entre 2010 e 2015 (ZANETTI-RAMOS & CRECZYNSKI-PASA, 2008).

Os campos da nanociência e da nanotecnologia são amplos e envolvem quase todas as disciplinas e áreas de relevância, sendo,

portanto, essencialmente multidisciplinares. Na área médica, essa ciência tem criado grande impacto na monitorização, tratamento, diagnóstico e controle de sistemas biológicos em áreas como a cardiologia, oftalmologia, endocrinologia, oncologia, pneumologia, imunologia e também em áreas específicas como a genética e em sistemas de vetorização de fármacos para regiões específicas do cérebro e de tumores (MARQUES, LOPES, SOUTO, 2009; JAIN, 2007).

Na área farmacêutica, a nanotecnologia tem como objetivos a prevenção, o diagnóstico, e o tratamento de enfermidades dos seres vivos. Desse modo, vem ocorrendo o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos em sítios específicos, além do desenvolvimento de elementos de diagnóstico, biosensores e técnicas mais avançadas para obtenção de imagens (VILLAFUERTE-ROBLES, [2008]). O uso de sistemas nanoestruturados tem o potencial de liberar o fármaco em alvos específicos fornecendo inúmeras vantagens, tais como: a solubilidade aumentada, a resistência às enzimas gástricas, o controle de liberação ou vetorização de agentes ativos, direcionando, desta maneira, as pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos mais sofisticados e personalizados (ZANETTI-RAMOS & CRECZYNSKI-PASA, 2008).

O desenvolvimento nanotecnológico de novas formulações visa corrigir problemas inerentes às propriedades físico-químicas de muitas moléculas terapêuticas que possuem baixa solubilidade, baixa permeabilidade na parede do epitélio intestinal, suscetibilidade a degradação enzimática e não enzimática, facilidade de complexação com íons e problemas de distribuição no organismo. Além disso, é possível atingir os níveis desejados dos perfis farmacocinéticos e toxicológicos, alterando o modo de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos fármacos (DEVALAPALLY, CHAKILAM, AMIJI, 2007).

Devido ao tamanho nanoscópico, as nanopartículas apresentam diferentes propriedades físico-químicas e biológicas em relação às formas farmacêuticas convencionais. Diante disso, a administração de um fármaco em escala nanométrica traz várias consequências farmacoterapêuticas: aumento da área superficial que é consequência direta da diminuição do tamanho das partículas podendo alterar a ligação com as proteínas plasmáticas; incremento na solubilidade levando a alternativas vantajosas tanto para fármacos muito hidrófilos quanto para os muito lipófilos; aumento na velocidade de dissolução

favorecendo o consequente aumento da biodisponibilidade; diminuição da dose necessária para atingir o efeito terapêutico; diminuição da variabilidade entre o estado de jejum/desjejum e entre pacientes devido à garantia de formas farmacêuticas que asseguram condições apropriadas e determinadas para a janela de absorção do princípio ativo que independe das características metabólicas ou alimentares do paciente; possibilidade de vetorização para um local específico do organismo e redução dos efeitos adversos (CARLUCCI & BREGNI, 2009)

Atualmente vários produtos com base nanotecnológica se encontram no mercado farmacêutico, entre eles destacam-se aqueles que usam a tecnologia dos nanocristais, as nanoemulsões, os lipossomas e as microemulsões. O uso de tais sistemas de liberação tem proporcionado melhorias nas características de solubilidade, estabilidade, absorção e biodisponibilidade dos fármacos encapsulados (ARAKI, 2007; CARLUCCI & BREGNI, 2009). Em particular, as nanoemulsões têm demonstrado serem sistemas vantajosos para a veiculação de fármacos hidrofóbicos, tanto para vias de administração enteral como parenteral, pois são capazes de solubilizar grandes quantidades de substâncias lipossolúveis na forma de uma dispersão aquosa. Também são sistemas promissores em outras áreas, como a cosmética, biotecnológica e em exames diagnósticos. Nanoemulsões podem ser classicamente definidas como uma dispersão nanométrica de gotículas oleosas em uma fase aquosa externa, estabilizada por um sistema tensoativo adequado, cujo tamanho das partículas (gotículas) podem variar de 100 a 500 nm. Apresentam-se como líquidos de aspecto leitoso, reduzido diâmetro de gotícula e baixa viscosidade. O fármaco veiculado encontra-se preferencialmente disperso e/ou adsorvido no núcleo oleoso da nanoestrutura. Essas partículas podem existir também na forma emulsão água em óleo (A/O) quando a fase dispersante é o óleo (FRONZA, CAMPOS, TEIXEIRA, 2004; SHAH *et al.*, 2010) (Figura 1). Vários estudos sugerem ainda que as nanoemulsões possuem o potencial de aumentar a penetração cutânea de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, quando comparadas aos veículos convencionais (WU & RAMACHANDRAN, 2001; SINTOV & SHAPIRO, 2004). Essa penetração se deve, basicamente, a dois mecanismos distintos: 1) aos altos gradientes de concentração de tensoativos promovidos pelo seu alto poder solubilizante de fármacos, sem, contudo, aumentar a afinidade do veículo pelo fármaco; 2) e ao potencial promotor de

penetração cutânea dos seus constituintes individuais (KREILGAARD, 2002).

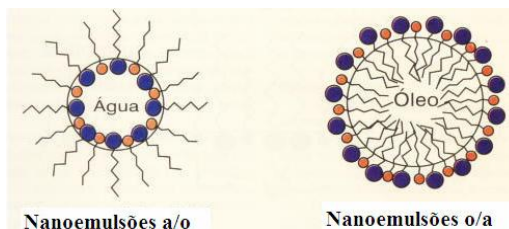


Figura 1: Representação esquemática da organização estrutural das nanoemulsões. (FORMARIZ, 2005).

As nanoemulsões são superiores às soluções micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, por isso, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos (FORMARIZ, 2004). A nanoestrutura desses sistemas pode ser influenciada por interações moleculares de forma significativa, portanto pode ocorrer o aumento da eficácia terapêutica de diversos fármacos, permitindo a redução da dose administrada, minimizando efeitos colaterais. Além disso, estes sistemas são capazes de compartimentalizar fármacos com dimensões nanométricas, as quais possuem propriedades físico-químicas peculiares e diferentes do meio dispersante e pode ocasionar uma mudança na permeabilidade das membranas biológicas (ABOOFAZELI *et al.*, 2000; CRUZ & UCKUM, 2001).

O benzoilmetronidazol ou benzoato de metronidazol (BZM) é um fármaco que pertence à classe terapêutica dos antibióticos e antiprotozoários. Fisicamente se apresenta como um pó cristalino branco a levemente amarelado e possui características lipofílicas que lhe conferem ampla utilização em formas farmacêuticas líquidas e semissólidas de aplicação vaginal. O interesse em incorporá-lo em um sistema nanoemulsionado pode ser explicado pela possibilidade de redução da dose terapêutica contida em uma nova forma farmacêutica inovadora que permita a administração tópica de doses menores desse fármaco, com o intuito de reduzir seus efeitos adversos sem interferir na dose necessária para se obter o mesmo efeito terapêutico das formas farmacêuticas convencionais.

Nesse contexto, nos propomos neste trabalho de dissertação de mestrado desenvolver uma forma farmacêutica nanoemulsionada do BZM inovadora para uso externo. Igualmente, como parte deste trabalho será avaliada a viabilidade de produção em escala industrial, destacando as técnicas de caracterização destes sistemas que devem ser aplicadas para o controle da qualidade do produto final.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral dessa pesquisa foi desenvolver e caracterizar uma forma farmacêutica tipo nanoemulsão para uso tópico para liberação do BZM após administração vaginal, elucidando as variáveis relevantes à formulação utilizando o processo de emulsificação espontânea.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Preparar e caracterizar nanoemulsões lipídicas em gel de hipromelose contendo BZM;
- ✓ Selecionar os óleos nos quais o fármaco apresenta maior solubilidade visando à preparação de nanoemulsões;
- ✓ Caracterizar as nanoemulsões contendo BZM quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta e morfologia;
- ✓ Desenvolver e validar uma metodologia analítica para doseamento do BZM nas nanoemulsões;
- ✓ Avaliar o perfil de liberação *in vitro* BZM utilizando células de difusão de *Franz*.
- ✓ Pontuar a viabilidade do desenvolvimento de nanoemulsões contendo BZM para aplicação industrial utilizando a técnica de emulsificação espontânea.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Administração vaginal de medicamentos

3.1.1 A mucosa vaginal

A mucosa vaginal é revestida por epitélio pavimentoso estratificado em cinco camadas com cerca de 150 a 200 μ m de espessura, rico em glicogênio e uma camada de tecido conjuntivo subjacente. Podem estar presentes grânulos de querato-hialina nas células epiteliais, mas em condições normais não ocorre queratinização (BOLDRINI, 2009). As camadas do epitélio da profundidade para a superfície são: camada germinativa ou basal, camada parabasal, camada intermediária e camada superficial, conforme Figura 2:

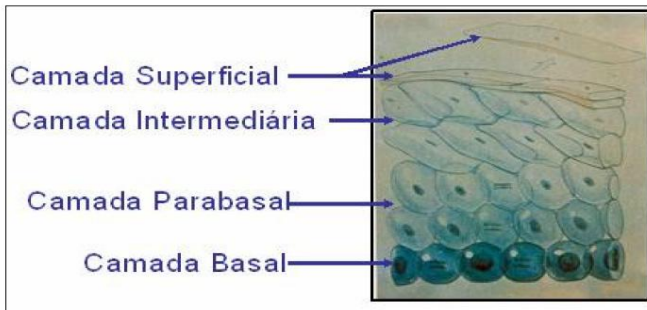


Figura 2: Representação esquemática do epitélio pluriestratificado pavimentoso não queratinizado da vagina na mulher em idade reprodutiva. (BOLDRINI, 2009).

O conteúdo vaginal sofre modificações fisiológicas dependendo da idade (pré-puberal, reprodutiva e pós-menopausa), de fatores hormonais (contracepção hormonal, alterações cíclicas hormonais e gravidez), fatores psicológicos (excitação sexual, estado emocional) e ainda de fatores locais (menstruação, pós-parto, tumores, sêmen e hábitos pessoais e de higiene) (ESCHENBACH *et al.*, 2000).

A vagina tem elementos estruturais que mantêm seu próprio ecossistema, o qual é dinâmico. A composição e a densidade populacional dos microorganismos podem variar de mulher para mulher

e numa mesma mulher, em diferentes condições fisiológicas (como pré-adolescência, menarca, fase do ciclo menstrual, gravidez, menopausa). Na infância, a flora vaginal provém das regiões anal e perianal e menos frequentemente da urinária, predominando espécies microbianas como anaeróbios, enterobactérias e difteróides (ESCHENBACH *et al.*, 2000; CLARKE *et al.*, 2002).

O pH normal da vagina situa-se entre 3,5 e 4,5 em mulheres na menacme¹, não grávidas e em não lactantes. Aquelas na pós-menopausa e outras condições de hipoestrogenismo e meninas pré-púberes têm o pH vaginal elevado (4,7 ou mais). Alguns fatores podem elevá-lo, como muco cervical, sêmen, sangue menstrual, alterações hormonais diversas - como gravidez e menopausa - doenças sexualmente transmissíveis e crescimento excessivo de outros microorganismos da flora vaginal como resultado do uso de duchas internas e antibióticos (MIJAC *et al.*, 2006).

A presença de estrogênio influencia a composição da microflora vaginal por estimular a deposição de glicogênio no epitélio vaginal. O glicogênio se transforma em glicose e, em seguida, se converte em ácido láctico pelo metabolismo celular na mulher em idade reprodutiva. Na menopausa a redução do estrogênio e, conseqüentemente, da deposição de glicogênio no epitélio vaginal causa alteração da flora e do pH vaginal, favorecendo a invasão da cavidade vaginal por patógenos (RODRIGUES, 2006).

3.1.2 Infecções vaginais

Sintomas vaginais são muito comuns na população geral e é uma das razões mais frequentes das consultas ginecológicas. Ao longo da vida, quase 75% das mulheres apresentarão pelo menos um episódio de infecção do trato genital inferior e 40 a 50% duas ou mais ocorrências. Vaginite é um termo geral e inespecífico que se refere à inflamação da vagina e pode ser definida como um espectro de condições que causam variados sintomas vulvovaginais. Como a superfície epitelial vaginal é variavelmente úmida, as manifestações clínicas das afecções vaginais são diversas. A vaginite é descrita como uma condição não debilitante,

1 Período máximo da atividade menstrual; período de vida da mulher caracterizado por atividade menstrual (Dicionário Aurélio).

autolimitada e que pode ser efetivamente tratada com antibióticos. A vaginite pode ter consequências importantes em termos de desconforto e dor, absenteísmo na escola ou trabalho, reflexos sociais e emocionais negativos e ainda problemas sexuais e reprodutivos. O conjunto formado por vaginose bacteriana, candidíase e tricomoníase é responsável por mais de 90% das infecções e infestações vaginais (MCCATHIE *et al.*, 2006; PEIXOTO, 2007).

O metronidazol é o protótipo dos antimicrobianos da classe dos nitroimidazólicos. Foi sintetizado a partir da azomicina na década de 1950 e introduzido inicialmente para o tratamento da tricomoníase, sendo posteriormente utilizado para tratamento de infecções por outros protozoários e bactérias anaeróbias (HAGER, 1992). O metronidazol é um dos mais efetivos antibióticos para o tratamento de infecções anaeróbicas por agente único ou mistas por agentes anaeróbicos e aeróbicos e é formalmente usado em ginecologia e obstetrícia para o tratamento de infecções parasitárias, como a vaginite causada por *T. vaginalis* e outras infecções, como vaginose bacteriana e infecções pélvicas mistas aeróbicas/ anaeróbicas. Apesar da frequente utilização de outros nitroimidazólicos, o metronidazol permanece o antimicrobiano de escolha para infecções anaeróbicas e por protozoários (LAMP *et al.*, 1999).

3.2 Benzoilmetronidazol

Derivado do metronidazol, o benzoato de metronidazol, ou benzoilmetronidazol (benzoato de 2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-etanol) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2003; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005) (Figura 3) é um fármaco de escolha para o tratamento da tricomoníase e para o tratamento da amebíase sintomática. Também é considerado tratamento alternativo para giardíase, infecções bacterianas aeróbicas e anaeróbicas graves e vaginites causadas por *Gardnerella vaginalis*. Vem sendo usado para o tratamento de colite pseudomembranosa e no tratamento da doença de Crohn (NICHOLS, 2004).

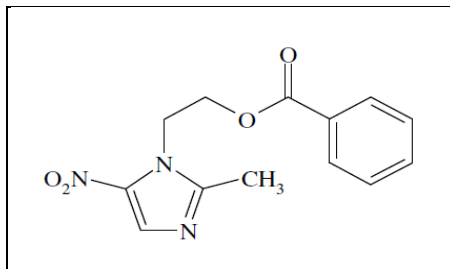


Figura 3: Estrutura química do Benzoilmtronidazol (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005).

O BZM apresenta um espectro de atividade antimicrobiana que abrange exclusivamente microrganismos anaeróbios, incluindo: (i) espécies habitualmente sensíveis, como *Peptostreptococcus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium sp*, *Bacteroides sp*, *Bacteroides fragilis*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonella*; (ii) espécies com sensibilidade variável, como *Bifidobacterium*, *Eubacterium*; e (iii) espécies habitualmente resistentes, como *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Mobiluncus*. Além disso, apresenta atividade antiparasitária contra *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* e *Giardia intestinalis* (BRASIL, 2010).

É um fármaco de custo relativamente baixo, altamente versátil e necessita de ativação pela redução grupo nitro por microrganismos suscetíveis. O grupo nitro reduzido se comporta como acceptor de elétrons para proteínas transportadoras de elétrons. As formas reduzidas produzem lesões bioquímicas às bactérias e protozoários, tais como a perda da estrutura helicoidal do DNA, ruptura do cordão e consequentemente inibição da síntese de ácido nucléico, o que leva a morte da célula dos protozoários e bactérias (BRUNTON *et al.*, 2005).

Após administração por via vaginal, a passagem sistêmica é pequena. A meia-vida plasmática é de 8 a 10 horas e a ligação às proteínas plasmáticas é baixa, inferior a 20%. A distribuição é rápida e importante nos pulmões, rins, fígado, bile, líquido, pele, saliva e secreções vaginais. Atravessa a barreira placentária e é excretado através do leite materno. Seu metabolismo é principalmente hepático: são formados dois metabólitos óxidos ativos não conjugados (atividade de 5 a 30%). A excreção é principalmente urinária: o metronidazol e seus

metabólitos óxidos, excretados através da urina, representam aproximadamente 35 a 65% da dose absorvida. Entre as principais reações adversas que podem ocorrer no nível de local de aplicação podem ser: dermatite de contato, dor, irritação, reação de Stevens-Johnson², leucocitose, prurido vulvovaginal e perineal, secura da vagina ou vulva, além de dores uterinas e febre (FLAGYL GINECOLÓGICO, 2010; COLPISTATIN, 2010).

Atualmente, os medicamentos de referência em comercialização para uso vaginal são o Flagyl ginecológico na forma de gel e o Colpistatin na forma de creme vaginal. A forma farmacêutica gel vaginal tem como polímero hidrofílico formador de gel a carboximetilcelulose sódica de média viscosidade, enquanto o creme vaginal é composto de uma emulsão óleo em água (O/A) estabilizada por tensoativo não iônico. Nessas formas farmacêuticas a posologia recomendada para uso vaginal é de 500mg para o fármaco isolado e 250mg para o fármaco em associação com outros princípios ativos. (KOROLKOVAS, 2008; FLAGYL GINECOLÓGICO, 2010; COLPISTATIN, 2010).

O BZM se apresenta na forma de pó cristalino ou flocos, de tonalidade que pode variar de branco a branco-amarelado (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005). Segundo a classificação de solubilidade descrita na FARMACOPEIA BRASILEIRA (2003), o BZM é praticamente insolúvel em água (0,12 mg/mL a 25°C) enquanto o metronidazol base é pouco solúvel (10,5 mg/mL a 25°C). Quanto à solubilidade nos solventes orgânicos, o BZM é pouco solúvel em etanol (20 mg/mL a 25°C), solúvel em metanol (50 mg/mL a 25°C) e muito solúvel em acetona (256 mg/mL a 25°C) (BEMPONG *et al.*, 2005; VU *et al.*, 2008). Esse princípio ativo apresenta estabilidade à temperatura ambiente e às condições normais do ar, mas escurece quando exposto de forma prolongada à luz. Ambientes mais alcalinos favorecem a

² A síndrome de Stevens-Johnson é caracterizada por reações mucocutâneas potencialmente fatais que resultam de hipersensibilidade a fatores precipitantes variados, como infecções por vírus, fungos, bactérias, enfermidades do tecido conjuntivo, neoplasias malignas, vacinas e múltiplos medicamentos (FALCÃO *et al.*, 2008).

degradação do BZM, principalmente quando o pH apresenta valores superiores a 8 (TRISSEL, 2000).

Os produtos de degradação do BZM citados na EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2005) são o ácido benzóico, o metronidazol e o 2-metil-5-nitroimidazol (Figura 4). Esses compostos químicos provavelmente são formados devido à reação de hidrólise no carbono do éster da molécula do BZM que pode acontecer por influência da luz e da umidade.

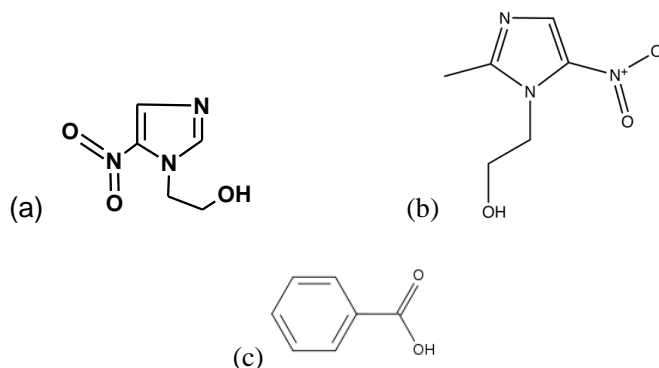


Figura 4: Estrutura química do (a) 2-metil-5-nitroimidazol , (b) metronidazol e (c) ácido benzóico (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005).

3.3 Nanomedicina & Nanotecnologia farmacêutica

A nanotecnologia compreende o desenvolvimento de dispositivos em escala nanométrica, usualmente entre algumas dezenas a algumas centenas de nanômetros. O seu emprego na medicina tem crescido muito nos últimos anos. Enquanto o termo nanomedicina é definido como o emprego de estruturas submicrométricas para o tratamento, diagnóstico, monitoramento de sistemas biológicos, a nanotecnologia farmacêutica envolve a aplicação da nanociência em farmácia, em especial com o uso de sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados.

Aproximadamente 40% dos fármacos candidatos a novos medicamentos apresentam características biofarmacêuticas reduzidas, como baixa solubilidade aquosa, baixa capacidade de atravessar as

barreiras biológicas e/ou baixa estabilidade nos fluidos biológicos, o que acaba se traduzindo por uma baixa biodisponibilidade e baixa eficácia terapêutica do fármaco. Nestes casos, a nanotecnologia possui um papel importante no desenvolvimento de formulações. Sistemas de liberação nanoestruturados apresentam inúmeras vantagens para a administração de fármacos, incluindo a capacidade de proteger as moléculas ativas contra degradação em meio fisiológico, liberar controladamente a substância ativa no sítio de ação, além de permitir a administração de fármacos hidrofóbicos em sistemas dispersos aquosos. As propriedades biofarmacêuticas das substâncias são significativamente melhoradas com o uso de carreadores nanoestruturados, levando a importantes alterações nos processos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de fármacos, permitindo ainda a redução da dose e dos efeitos adversos dos mesmos (CARLUCCI & BREGNI, 2009). Os custos e o tempo para o desenvolvimento de um novo medicamento podem ser significativamente reduzidos, visto que tal estratégia visa o aproveitamento terapêutico de moléculas cuja estrutura, propriedades físico-químicas e/ou farmacológicas foram previamente estabelecidas. Exemplos de sistemas de liberação nanoestruturados incluem as nanopartículas poliméricas, nanopartículas sólidas lipídicas, lipossomas, nanoemulsões, micelas e dendrímeros (Figura 5) (DEVALAPALLY, CHAKILAM, AMIJI, 2007).

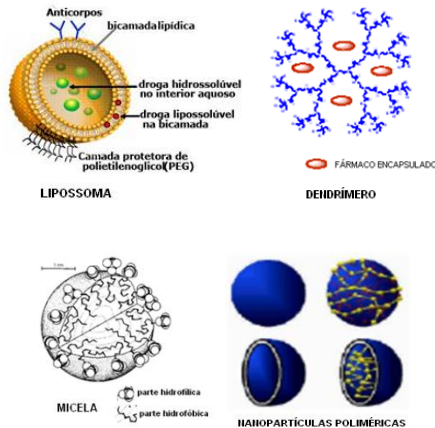


Figura 5: Ilustração de alguns sistemas de liberação nanoestruturados (DURAN, MARCATO, TEIXEIRA, 2008).

A avaliação do perfil de liberação do fármaco a partir dos sistemas nanoestruturados é uma etapa muito importante para desenvolvimento tecnológico dos mesmos. A liberação do fármaco pode ocorrer por fenômenos de difusão e/ou desorção do fármaco, que pode ocorrer concomitantemente aos processos de degradação e/ou erosão da partícula. Geralmente, a liberação inicial rápida é atribuída à fração do fármaco que está adsorvido ou fracamente ligado na imensa área superficial das nanoestruturas (SOPPIMATH *et al.*, 2001 apud RODRIGUES *et al.*,1995).

3.4 Nanoemulsões

As nanoemulsões, também referidas na literatura como miniemulsões, emulsões ultrafinas, microemulsões instáveis, submicroemulsões, são uma classe de emulsões que podem apresentar aparência translúcida quando o tamanho de glóbulo é inferior a 200 nm ou leitosa quando o tamanho está entre 200 - 1000 nm (Figura 6) (CAPEK, 2004; PEY *et al.*, 2006; FERNANDEZ *et al.*, 2004; SHAH *et al.*, 2010).



Figura 6: Fotografia de uma nanoemulsão (à esquerda) e de uma macroemulsão (à direita) (SHAH *et al.*, 2010).

Devido à baixa tensão interfacial, normalmente menor que $1,0 \times 10^{-6}$ N/m, estes sistemas são capazes de dissolver um elevado número de substâncias (SCHWUGER & SCHOMÄCKER, 1995). Estes sistemas são capazes de compartimentalizar fármacos, com dimensões nanométricas, as quais possuem propriedades físico-químicas peculiares e diferentes do meio dispersante, melhorando a solubilização de

diversos fármacos e aumentando o potencial de absorção (CRUZ & UCKUN, 2001). Usualmente comportam-se como fluidos newtonianos, sua viscosidade é comparada à da água, até mesmo em elevadas concentrações de gotículas, muito provavelmente devido à coalescência reversível das mesmas (SILVA, 2008). As nanoemulsões são superiores às soluções micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, por isso, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos (FORMARIZ, 2004).

As nanoemulsões possuem diversas vantagens em relação aos veículos tradicionais, como as relatadas a seguir:

- São capazes de veicular fármacos lipofílicos em um sistema disperso aquoso e seu tamanho reduzido proporciona uma elevada superfície de contato com as membranas biológicas, favorecendo a absorção;
- Possuem maior área superficial e energia livre com relação às macroemulsões, características que conferem com um efetivo sistema de transporte (SHAH *et al.*, 2010);
- O diminuto tamanho dos glóbulos, associado ao movimento browniano característico, diminui a atuação da força da gravidade evitando processos de instabilidade como sedimentação e cremagem (TADROS *et al.*, 2004; CAPEK 2004; SHAH *et al.*, 2010);
- Podem ser formulados em várias formas farmacêuticas, tais como espumas, cremes e sprays (TADROS *et al.*, 2004; SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, L'ALLORET, 2004; SHAH *et al.*, 2010);
- São atóxicas, inócuas e podem ser facilmente aplicadas e espalhadas pela pele e mucosas (SHAH *et al.*, 2010);
- Podem ser diluídas com água sem que ocorra alteração na distribuição e tamanho dos glóbulos (MORALES *et al.*, 2003).

Diferentes das microemulsões que são sistemas termodinamicamente estáveis, as nanoemulsões são sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por um longo período de tempo. A inerente estabilidade das nanoemulsões está diretamente relacionada ao processo de preparo que confere estabilização estérica, quando se emprega tensoativos não-iônicos e/ou polímeros; e ao diminuto tamanho

dos glóbulos, cujo movimento browniano diminui a atuação da força da gravidade, prevenindo assim fenômenos de instabilidade (TADROS *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004).

A granulometria do sistema também previne o fenômeno da coalescência, pois esses glóbulos não são facilmente deformáveis. A grande espessura do filme interfacial, relativo ao tamanho do glóbulo, previne que a diminuição natural deste filme seja suficiente para causar o rompimento do glóbulo (SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET, ALLORET, 2001; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004).

3.4.1 Composição das nanoemulsões

3.4.1.1 Óleos

O principal critério de seleção e concentração da fase oleosa a ser empregada é determinada pela solubilidade do fármaco a ser veiculado. Desse modo, os óleos de natureza polar (triglicérides, principalmente) permitem a dissolução de maiores concentrações de drogas lipossolúveis. Assim, entre os principais óleos estudados, destacamos o miristato de isopropila, o óleo de soja e o Myglyol® 812 (triésteres de glicerol dos ácidos cáprico e caprílico). O grau de pureza destes óleos deve ser elevado, no sentido de prevenir a ocorrência de irritação que pode ser provocada pelos contaminantes presentes em óleos com baixa pureza (CUNHA JÚNIOR *et al.*, 2003).

Óleos de origem vegetal ou semi-sintética, constituídos principalmente de triglicerídeos de cadeia média (TCM) e longa (TCL), têm sido extensivamente empregados. TCL provenientes de óleos vegetais, como o de soja, foram empregados isoladamente no preparo de nanoemulsões contendo a pilocarpina na sua forma básica, cloridrato ou pró-fármaco. Misturas de óleo de soja e ácido oléico (até 50%) foram testadas como núcleo de nanoemulsões contendo δ -8-tetrahydrocannabinol e piroxicam, a fim de aumentar a solubilidade destes fármacos e a estabilidade do sistema desenvolvido. Os TCM são cerca de 100 vezes mais miscíveis em água do que os análogos de cadeia longa e são assim capazes de dissolver elevados teores de fármacos lipossolúveis (FRONZA, CAMPOS, TEIXEIRA, 2004).

Conforme descrito por ALMEIDA e colaboradores (2009), o emprego dos óleos vegetais de semente de uva e de amêndoas

apresentou resultados positivos para a obtenção de nanocápsulas e nanoemulsões de benzofenona-3, inclusive em testes de estabilidade acelerada.

3.4.1.2 *Tensoativos*

São substâncias caracterizadas pela presença de uma região polar e outra apolar em suas estruturas moleculares. Podem formar emulsões do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), as quais são definidas, principalmente, pelo equilíbrio apresentado entre a parte polar e a apolar do emulsionante empregado, denominado tecnicamente de Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL). Existem quatro principais categorias para os tensoativos, dependendo do grau de ionização em solução aquosa: aniônico, catiônico, não-iônico e anfótero (Figura 7) (BILLANY, 2005).

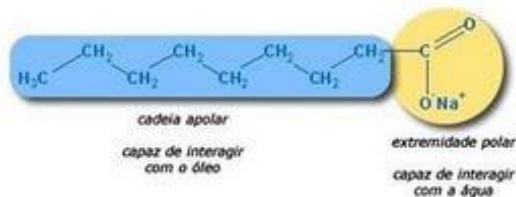


Figura 7: Estrutura química de um tensoativo aniônico.

As lecitinas (Figura 8) são tensoativos de origem natural amplamente empregado no desenvolvimento de nanoemulsões, devido principalmente à sua biocompatibilidade. Além disso, apresentam alta afinidade com as membranas celulares, fator importante para o incremento na absorção de fármacos (FRONZA, CAMPOS, TEIXEIRA, 2004; HOELLER, SPERGER, VALENTA, 2009). Entretanto, na utilização dessas substâncias é necessário observar o grau de pureza por elas apresentado, pois suas propriedades físicas e emulsionantes dependem da composição e da concentração dos fosfolípides e dos ácidos graxos presentes em cada amostra (CUNHA JÚNIOR *et al.*, 2003).

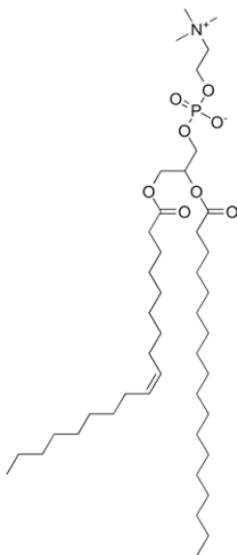


Figura 8: Estrutura química da Lecitina (MERTINS, 2008).

Classificados como tensoativos de natureza anfótera, as lecitinas são misturas complexas de fosfolipídeos extraídos da gema de ovo ou da soja, cujo maior componente é a fosfatidilcolina. Devido à elevada lipofilicidade, as lecitinas não têm capacidade de formar nanoemulsões com baixa tensão interfacial, sendo assim é aconselhado o emprego de cotensoativos para promover a estabilização da nanoemulsão (PARK *et al.*, 1999). Assim, a combinação de lecitinas com tensoativos sintéticos (cotensoativos), como o polissorbato, Miranol MHT® 29 e principalmente o poloxâmero 188 tem sido descrita na preparação de nanoemulsões (FRONZA, CAMPOS, TEIXEIRA, 2004).

Os coemulsionantes são responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial necessária para a formação e estabilidade termodinâmica das nanoemulsões, além de promoverem fluidificação do filme interfacial formado pelo emulsionante, o que impede a elevação significativa da viscosidade do sistema obtido. Os principais coemulsionantes utilizados são alcoóis e glicóis de baixa massa molecular e que apresentam uma cadeia carbônica entre dois e dez

carbonos (CUNHA JÚNIOR *et al.*, 2003). A mistura de tensoativo com um cotensoativo é mais eficiente em reduzir a tensão interfacial entre óleo-água, proporcionando a redução máxima do tamanho das gotículas da fase interna (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Os tensoativos não-iônicos mostram vantagens particulares devido a suas baixas toxicidade e irritabilidade, sendo alguns, conseqüentemente, utilizados em preparações orais e parenterais. Possuem também maior grau de compatibilidade com diversas substâncias, quando comparados aos tensoativos catiônicos e aniônicos e são menos sensíveis às alterações de pH ou à adição de eletrólitos. A maioria deles apresenta como partes principais na sua estrutura um ácido ou álcool graxo, cuja cadeia de 12 a 18 átomos de carbono confere as características hidrofóbicas e um álcool e/ou um grupamento óxido de etileno que constitui a parte hidrofílica da molécula (BILLANY, 2005).

Entre os tensoativos de natureza não-iônica, destacam-se o derivado glicol denominado polietilenoglicol 660-12-hidroxiestearato (Solutol HS 15) e o Polissorbato 80 (Tween 80). Quimicamente o Solutol HS 15 consiste de cadeias de mono e diésteres de poliglicóis do ácido 12-hidroxiestearico, como parte lipofílica, e em torno de 30% de polietilenoglicol livre como parte hidrofílica (Figura 9). (THAYSEN, 1999).

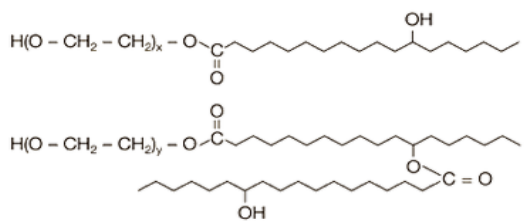


Figura 9: Estrutura química do Solutol HS 15 (THAYSEN, 1999).

Os polissorbatos são derivados polietilenoglicóis dos ésteres de sorbitano e como exemplo típico tem-se o monooleato de polioxi-etileno-20-sorbitano (Tween 80) que contém 20 grupamentos oxietileno por molécula (Figura 10). (BILLANY, 2005).

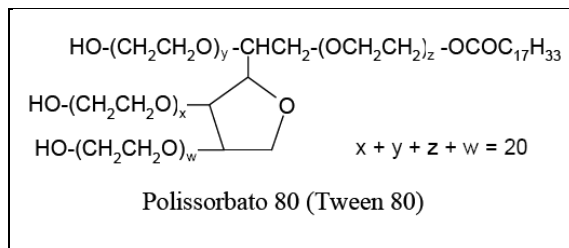


Figura 10: Estrutura química do Polissorbato 80 (MARTINI, 2005).

3.4.1.3 Demais adjuvantes

Para composição da fase aquosa pode ser necessária a adição de conservantes para garantir a estabilidade microbiológica da formulação. Os conservantes mais utilizados para o preparo de nanoemulsões podem ser o álcool benzílico, o clorobutanol e os parabens (nipagin, nipasol). Esses conservantes apresentam a vantagem de serem substâncias químicas não-iônicas, característica que impede a desestabilização do sistema nanoemulsionado.

3.4.2 Preparação e formação das nanoemulsões

A preparação das nanoemulsões envolve basicamente a emulsificação de uma fase oleosa em uma fase aquosa, estabilizada por um sistema surfactante. Entretanto, vários métodos podem ser utilizados em sua obtenção, os quais têm sido classificados em métodos de alta energia e de baixa energia. Os métodos de alta energia envolvem a introdução de energia ao sistema, a qual é realizada pelo emprego de homogeneizadores de alta velocidade, homogeneizadores de alta pressão e homogeneizadores ultrassônicos. Entretanto, para obter emulsões com gotas de tamanho submicrométrico, uma grande quantidade de energia mecânica é necessária, o que torna este tipo de método desvantajoso para aplicação industrial. Métodos de baixa energia fazem uso de transições de fase que tomam lugar durante o processo de emulsificação como resultado de uma alteração na curvatura espontânea do surfactante, seja por uma alteração da temperatura, no caso do método da temperatura de transição de fases, como pela alteração da composição do sistema, no método do ponto de inversão da emulsão

(PEY *et al.*, 2006; SOLÈ *et al.*, 2006). Também descrito como método de baixa energia, a emulsificação espontânea ocorre após mistura de um solvente orgânico hidromiscível contendo um óleo em uma fase aquosa, sendo o sistema frequentemente estabilizado pelo uso de surfactantes (SOLANS *et al.*, 2005). O método de preparo das nanoemulsões possui grande influência sobre as propriedades físico-químicas das mesmas, as quais, por sua vez, têm consequência direta sobre a instabilidade termodinâmica de tais preparações (PEY *et al.*, 2006; ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

3.4.2.1 Métodos que utilizam alta energia de emulsificação

Métodos de alta energia envolvem o emprego de homogeneizadores, em que unicamente uma pequena quantidade da energia produzida é utilizada no processo de emulsificação. Nesse tipo de método, as fases aquosa e oleosa são aquecidas separadamente (a aproximadamente 70° C) e misturadas para formação de uma emulsão micrométrica. Após a formação de uma emulsão primária, o tamanho da gota é progressivamente reduzido a tamanhos submicrométricos com auxílio de homogeneizadores (ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008). A formação das nanoemulsões é baseada na geração de energia mecânica através de alta tensão de cisalhamento, cujo processo consiste na formação, deformação e ruptura das gotículas macrométricas iniciais, seguido da adsorção do tensoativo na interface das gotículas (FERNANDEZ *et al.*, 2004; TADROS *et al.*, 2004). A formação das gotículas nanométricas pelos métodos de alta energia de emulsificação é governada por parâmetros importantes como quantidade de energia fornecida ao sistema, quantidade de tensoativo e a natureza dos componentes (ANTON, BENOIT, SAULNIER, 2008).

Os principais equipamentos utilizados na preparação das nanoemulsões são os homogeneizadores de alta velocidade, homogeneizadores ultrassônicos e homogeneizadores de alta pressão (ANTON, BENOIT, SAULNIER, 2008). Homogeneizadores de alta velocidade são aqueles do tipo roto-estator (Ultraturrax®), onde um eixo externo cisalha, por impacto, as partículas de uma dispersão por meio de uma hélice que gira em alta rotação em um eixo interno (Figura 11). Esse tipo de homogeneizador produz um fluxo turbulento que provoca a ruptura das gotículas; o menor tamanho de gota que pode ser obtido depende da geometria da hélice e do recipiente onde a mistura é feita, e

do número de passagens da emulsão na zona de mistura (OUZINEB *et al.*, 2006).

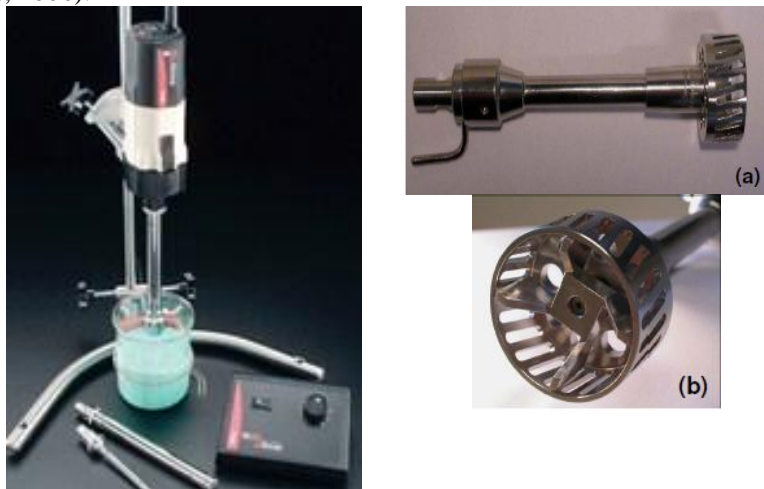


Figura 11: Homogeneizador de alta velocidade do tipo rotor estator (Turbotest, Rayneri). (a) haste do misturador e (b) hélice do misturador (OUZINEB *et al.*, 2006).

O homogeneizador ultrassônico (Figura 12) produz ondas de comprimento de onda na ordem de 10 nm, que causam a ruptura das gotas da emulsão por cavitação. Cavitação é a formação e o colapso de milhões de bolhas minúsculas dentro de um líquido. Ela é produzida pela alternância de ondas sonoras de pressões altas e baixas geradas pelo ultra-som. Estas ondas sonoras de alta frequência são produzidas por um gerador de ultra-som e, convertidas por um transdutor em ondas mecânicas no interior do líquido. Durante a fase de baixa pressão, as bolhas crescem, em tamanho microscópico, até que atinjam a fase de pressão alta, na qual elas são comprimidas e implodem. As cavidades formadas no interior de um líquido são maiores do que aquelas formadas em sua superfície (HIELSCHER, 2005).

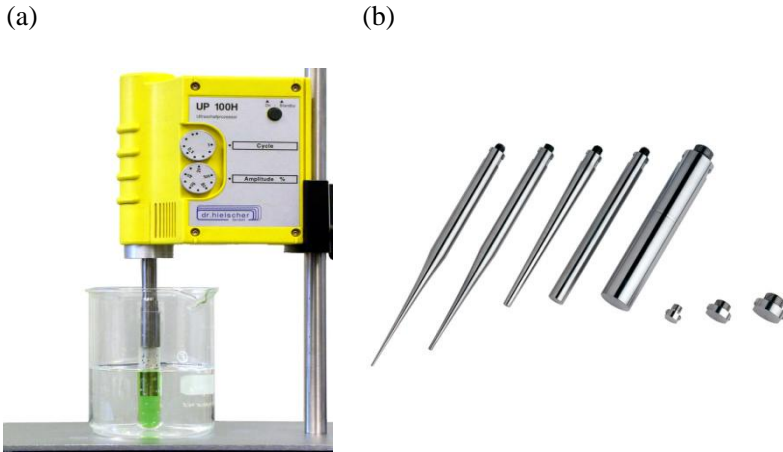


Figura 12: Homogeneizador ultrassônico. (a) Processador mostrando agitação em banho de água para dissipar calor produzido pelo ultrassom (HIELSCHER, 2005). (b) Sondas de ultrassom apresentando diferentes geometrias (Sonopuls, Bandelin Eletronic).

Em geral, a formação de cavidades ultra-sônicas em um líquido pode causar: a dispersão temporária de agregados moleculares; a iniciação de várias reações químicas, visto que pode gerar radicais livres na solução; e a aceleração de reações químicas, por facilitar a mistura dos reagentes. Este fenômeno também pode ser utilizado para melhorar a difusão de partículas dispersas, auxiliando na produção de emulsões macroscópicas bem concentradas ou de dispersões uniformes em escala nanométrica. Nesse método, unicamente a região do líquido próximo à sonda é afetada pelas ondas ultrassônicas e as gotas presentes na mistura a ser tratada não necessariamente recebem o mesmo nível de energia. Isso pode ser eventualmente contornado pelo uso de agitação magnética da emulsão ao mesmo tempo em que a mistura é sonicada (OUZINEB *et al.*, 2006). A intensidade de sonicção é um parâmetro que tem grande influência no processo, visto que com o aumento, o tamanho das gotículas diminui. Essa diminuição é limitada, entretanto a um platô, onde o tamanho dessas gotas permanece constante. Há também o efeito térmico, resultante da energia dissipada na forma de calor que provoca o aumento da temperatura da dispersão a ser nanoemulsionada, limitando

o emprego dessa técnica a materiais que não sejam termolábeis (ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

Embora conveniente e de custo reduzido, esse método apresenta várias desvantagens, incluindo o excessivo aquecimento da amostra, a ocorrência de ampla distribuição do tamanho de gotícula e a baixa reprodutibilidade do tamanho de gota dos produtos obtidos (ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

Nos homogeneizadores de alta pressão (Figura 13a), a dispersão a ser tratada é submetida à pressão usando uma bomba e forçada a passar em alta velocidade através de uma abertura entre uma válvula de ajuste (móvel) e o suporte da válvula (fixo) (Figura 13b). A homogeneização ocorre principalmente devido às forças de cisalhamento, mas existe também a contribuição das forças causadas pelo impacto e cavitação. À medida que o número de passagens do líquido através do homogeneizador aumenta, o tamanho da gota da emulsão diminui. O aumento da pressão de homogeneização, assim como da temperatura, também leva à redução do tamanho da gotícula. Entretanto, uma alta pressão conduz a um gasto grande de energia, sendo mais vantajosa a realização de mais ciclos de homogeneização a uma pressão moderada. Homogeneizadores de alta pressão são disponíveis em diferentes tamanhos para preparação de nanoemulsões em escala laboratorial e industrial.

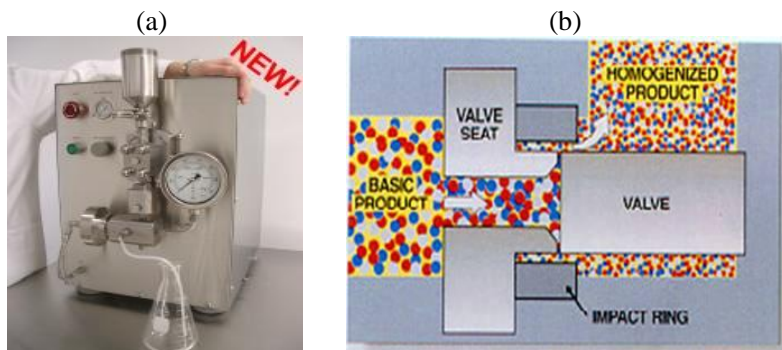


Figura 13: Homogeneizador de alta pressão. (a) equipamento Emulsiflex C-3 (Avestin) com capacidade de 3L/hora, (b) Esquema da válvula de passagem de da emulsão.

A microfluidização é uma tecnologia de mistura patenteada, a qual emprega um equipamento denominado microfluidizador (Figura 14). Este equipamento usa uma bomba de 500 a 20000 psi que força a passagem do produto através da câmara de interação/choque, a qual consiste em um sistema de microcanais. Esse sistema divide a mistura em dois fluxos que, ao serem recombinados, produzem impacto, cisalhamento e cavitação, e conseqüentemente, a redução da gota da emulsão. A eficiência de emulsificação por esse método é determinada pelo desenho dos microcanais dentro da câmara de interação, pela pressão liberada e pelo tempo de processamento (ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

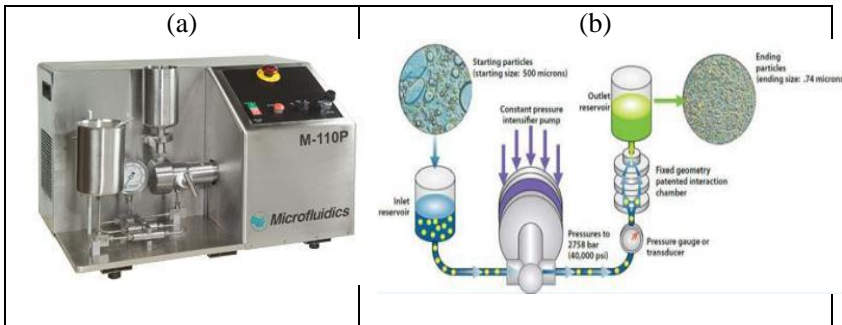


Figura 14: (a) Microfluidizador® (Microfluidics, UK), (b) Esquema de funcionamento da microfluidização.

3.4.2.2 Métodos que utilizam baixa energia de emulsificação

Alguns métodos de obtenção de nanoemulsões são baseados nas transições de fase que ocorrem durante o processo de emulsificação. Tais métodos são classificados como métodos de baixa energia ou de condensação (SOLÈ *et al.*, 2006; SOLANS *et al.*, 2005; SADURNÍ *et al.*, 2005).

O método da temperatura de inversão de fases (PIT, do inglês phase inversion temperature) é o mais amplamente empregado pela indústria. Esse método utiliza as propriedades dos tensoativos não iônicos polietoxilados, em especial a solubilidade, a qual é alterada por meio da mudança na temperatura do sistema. Os surfactantes polietoxilados tornam-se lipofílicos com o aumento da temperatura

devido à desidratação das cadeias de polioxietileno. Em baixas temperaturas (abaixo do PIT), a monocamada de surfactante forma fases micelares intumescidas O/A que podem coexistir com um excesso de fase oleosa. Acima do PIT, a curvatura espontânea torna-se negativa e micelas inversas intumescidas existem com um excesso de água. Em temperaturas intermediárias, ou temperatura EHL, a curvatura torna-se próxima a zero formando uma microemulsão bicontínua (D) contendo quantidades comparáveis de água e óleo com excesso de ambos. Assim, a formação de emulsões submicrométricas é realizada forçando uma transição da emulsão A/O em altas temperaturas para uma emulsão O/A em baixas temperaturas (inversão de fase transicional). Durante o resfriamento o sistema tensoativo passa por um ponto de curvatura zero e mínima tensão interfacial, o que predispõe a formação de gotículas finamente dispersas (ANTON, BENOIT, SAULNIER, 2008; FERNANDEZ *et al.*, 2004). A Figura 15 mostra um esquema de um possível mecanismo de formação de nanoemulsões pelo método PIT.

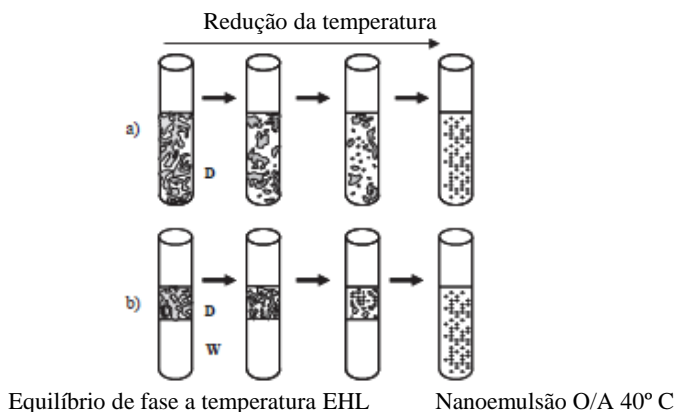


Figura 15: Representação esquemática do possível mecanismo de formação de nanoemulsões O/A pelo método PIT. A curvatura do surfactante é alterada pelo resfriamento e a fase bicontínua D é rompida, formando nanogotas. (a) microemulsão D está inicialmente em equilíbrio de fase; (b) duas fases, W + D, estão inicialmente em equilíbrio (SOLANS *et al.*, 2005).

A transição espontânea no raio da curvatura das moléculas de tensoativo também pode ser obtida alterando a fração volumétrica de uma das fases, no método conhecido como inversão das fases da emulsão (EPI, do inglês emulsion phase inversion). Pela sucessiva adição de água na fase oleosa, formam-se glóbulos de água nesta fase contínua (microemulsão bicontínua A/O). Aumentando o volume da fração de água ocorre uma mudança espontânea na curvatura das moléculas de tensoativo (inversão de fases catastrófica) causando inversão de emulsão A/O para O/A (SALAGER *et al*, 2004; SOLÈ *et al.*, 2006). Este método de emulsificação ocorre à temperatura constante, sem a necessidade de aquecimento da amostra a uma determinada temperatura. A inversão também pode ser induzida pela adição de substâncias à formulação que sejam capazes de alterar o ponto de transição de fases do sistema, seja um eletrólito, um surfactante, um álcool ou um óleo (SALAGER *et al*, 2004).

3.4.2.3 A técnica da emulsificação espontânea

O processo de emulsificação espontânea tem mostrado ocorrer ao adicionar uma solução de um solvente hidromiscível, contendo uma pequena concentração de óleo, na água, mesmo na ausência de surfactantes. Conhecido como efeito Ouzo, as gotículas de óleo são formadas com diâmetro dependente da razão entre o excesso de solvente e o óleo (SOLANS *et al.*, 2005). Entretanto, muitos estudos descrevem o uso desta técnica com a adição de surfactantes ao sistema. A metodologia descrita por BOUCHEMAL e colaboradores (2004) é constituída pelas seguintes etapas: o fármaco lipofílico é dissolvido em um solvente orgânico juntamente com o óleo e um tensoativo lipofílico. A fase dispersante é formada por água adicionada de um segundo tensoativo de natureza hidrofílica. Após, verte-se a fase orgânica sobre a aquosa mediante agitação moderada. Uma emulsão O/A é formada instantaneamente pela difusão do solvente orgânico na fase aquosa, e o solvente orgânico é retirado por destilação à pressão reduzida (Figura 16).



Figura 16: Esquema de preparação de nanoemulsões pela técnica de emulsificação espontânea.

É interessante notar que a característica principal dessa técnica resulta do estado de desequilíbrio de dois líquidos com propriedades físico-químicas diferentes quando são colocados em contato um com outro sob agitação. No entanto, esse tipo de emulsificação somente ocorre sob condições específicas, e nesse processo ocorre o aumento da entropia e, conseqüentemente, a redução da energia livre de Gibbs do sistema. A fonte de energia empregada é originada principalmente das turbulências interfaciais, que está intimamente ligado ao gradiente de tensão superficial induzido pela difusão do soluto entre as duas fases (ANTON, BENOIT, SAULNIER, 2008). Segundo ANTON & VANDAMME (2009), as nanoemulsões geradas por esse método são cineticamente estáveis durante meses. Para a formação das gotículas nanométricas no método de emulsificação espontânea, é necessário a existência de uma relação alta entre o solvente orgânico e o óleo empregado nessa fase antes da mistura com a fase aquosa. Conseqüentemente, a difusão do solvente orgânico é mais rápida e a turbulência gerada causa a formação das nanogotículas. Outros fatores que afetam a qualidade da nanoemulsão final incluem a viscosidade do óleo, o equilíbrio lipófilo-hidrófilo do tensoativo e a miscibilidade do solvente orgânico na água (ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

A emulsificação espontânea é uma excelente alternativa para o preparo de nanoemulsões pela simplicidade do método, pela possibilidade de preparação de pequenos volumes da formulação e principalmente pela provável possibilidade de aplicação industrial, tendo em vista que os equipamentos e processos envolvidos se assemelham com os processos atuais de preparo de macroemulsões.

Outra vantagem desta técnica é que a preparação das nanoemulsões é realizada sem necessidade de aquecimento das fases, o que torna interessante para fármacos termolábeis e para o processo produtivo que além de evitar a perda de tempo nas etapas de aquecimento/resfriamento, dispensa o emprego de equipamentos mais complexos.

3.4.2.4 Transposição para escala industrial (Scale up)

Transposição de escala ou *Scale up* pode ser definida como a partida e operação bem sucedidas de uma unidade de produção industrial, cujos procedimentos de operação e desenho estejam “em parte”, baseados em experimentação e demonstrações realizadas em menores escalas. Para haver transposição de escala, deve haver integração dos processos e transferência de tecnologia. Esse estágio de desenvolvimento é crucial, porque muitas limitações nos processos que não são aparentes em pequena escala se tornam significantes em larga escala e, conseqüentemente, falhas graves acontecem quando da tentativa para reprodução industrial. Na prática, a transição da escala laboratorial para a industrial não é direta. O produto deve ser preparado em escalas intermediárias, ou seja, maior que a escala laboratorial e menor que a escala industrial. Basicamente, a ideia central é simular o mais próximo possível a produção industrial em equipamentos de bancada e otimizar os parâmetros operacionais, para minimizar o surgimento de novos problemas (GALINDO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2005; BABY *et al.*, 2008).

Como descrito anteriormente, a obtenção de nanoemulsões pode ser realizada mediante o emprego de métodos de alta ou de baixa energia. Devido às reais vantagens dos métodos que utilizam baixa energia de emulsificação em termos de rendimento de formulação, a possibilidade do uso dessa técnica para obtenção de nanoemulsões em escala industrial tem sido de grande interesse por pesquisadores de diversas áreas (ANTON & VANDAMME, 2009). Entretanto, alguns trabalhos indicam que métodos de baixa energia são desvantajosos por requererem grandes quantidades de surfactantes, remoção e recuperação do solvente orgânico. Portanto, a maioria dos métodos usados na fabricação de nanoemulsões na atualidade é baseada em processos mecânicos, sendo relacionados, portanto, aos métodos de preparação de alta energia. Por exemplo, o uso de moinhos coloidais permite

transformar emulsões grosseiras em emulsões finas apresentando estreita faixa de tamanho de partícula (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009). JAFARI e colaboradores (2007) também destacam a microfluidização como processo para obtenção de nanoemulsões apresentando reduzido tamanho de gotícula e estreita faixa granulométrica em nível industrial. Por outro lado, apesar de os métodos de alta energia levarem à obtenção de nanoemulsões com propriedades desejáveis, eles não são aceitáveis para fármacos termolábeis, uma vez que é preciso o aquecimento para que ocorra o processo de emulsificação (DATE *et al.*, 2010). A emulsificação espontânea, nesse caso, tem sido considerada uma técnica alternativa, mas apresenta como desvantagem a necessidade de remoção do solvente orgânico. Nesse caso, para a obtenção de nanoemulsões, além de misturadores mecânicos, seriam necessários evaporadores que operem em grande escala, o que dificulta a utilização desse método em processos industriais (ALMEIDA, TEIXEIRA e KOESTER, 2008).

Um dos mais importantes processos envolvidos na transferência de escala de preparações líquidas é a mistura. Nos sistemas dispersos, como as nanoemulsões, as dificuldades na transposição de escala são evidentes, devido aos múltiplos e diferentes fenômenos envolvidos nesse sistema, tais como: coalescência, dispersão e manutenção das partículas em suspensão. Nos sistemas emulsionados, a dispersão das gotículas ocorre com mais facilidade em agitação tipo fluxo turbulento, conforme ocorre em reatores de pequeno volume, porém a coalescência das gotículas é mais provável ocorrer em sistemas de agitação tipo fluxo laminar, em reatores de grande volume (BLOCK, 2005).

Os principais parâmetros que devem ser monitorados durante a transferência de escala para uma formulação tipo nanoemulsão obtida pela técnica de emulsificação espontânea, podem ser representados na Figura 17:

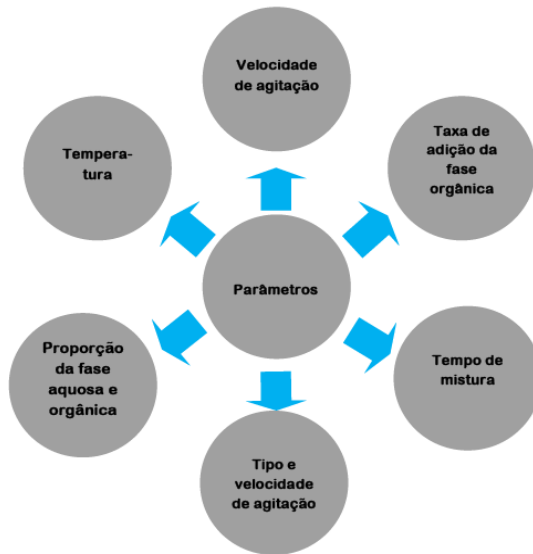


Figura 17: Principais parâmetros envolvidos na transposição de escala de nanoemulsões obtida pela técnica de emulsificação espontânea.

3.4.3 Caracterização das nanoemulsões

A caracterização de um sistema nanoemulsionado pode ser feita por diversos métodos, mas para a elucidação da sua nanoestrutura devem-se levar em consideração os resultados de mais de um método. As nanoemulsões podem ser caracterizadas segundo o tamanho e a distribuição do tamanho das gotas da fase dispersa, uma das mais importantes características físicas de uma nanoemulsão (LIEDTKE *et al.*, 2000). Entre as técnicas mais difundidas tem-se a microscopia de luz polarizada para verificar a isotropia do sistema, o espalhamento de luz para medir o diâmetro da gotícula ou fase dispersa, métodos espectroscópicos, como ressonância magnética nuclear, para determinar a estrutura interna, e outros métodos mais tradicionais, como densidade, viscosidade, índice de refração e condutividade elétrica são importantes para determinar o tipo de nanoemulsão e caracterizá-la fisicamente (PORRAS *et al.*, 2004; SADURNÍ *et al.*, 2005; MASON *et al.*, 2006).

3.4.3.1 *Tamanho das gotículas da fase interna*

Várias técnicas podem ser utilizadas para determinação do tamanho de partícula e sua distribuição. Entretanto, os mais empregados para caracterização das nanoemulsões são espalhamento de luz dinâmico e difração a laser. O espalhamento de luz dinâmico, também referido como espectroscopia de correlação fotônica (PCS, do inglês photon correlation spectroscopy) é um método bem estabelecido para medida do tamanho de moléculas e partículas na região do nanômetro e mesmo, para tamanhos menor que 1nm. Partículas, emulsões e moléculas em suspensão sofrem movimento browniano, o qual é induzido pelo bombardeamento de moléculas do solvente que se encontram em movimento devido à energia térmica. Quando as partículas ou moléculas são iluminadas com laser, a intensidade da luz espalhada flutua numa velocidade que depende do tamanho das mesmas; quanto menor for o tamanho, mais rapidamente elas se movem. O tamanho da partícula (raio r) pode então ser determinado usando a relação de Stokes-Einsten abaixo,

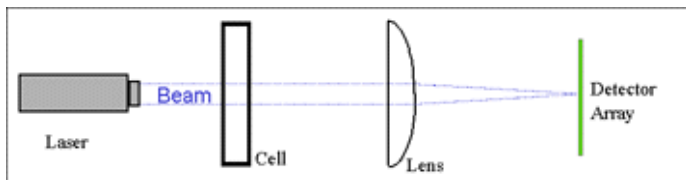
$$r = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

onde, k é a constante de Boltzmann; T é a temperatura em K, η é a viscosidade do solvente; e D é o coeficiente de difusão (JOSHI, BHATTACHARYYA, WAZED ALI, 2008).

A difração a laser é uma técnica de análise de tamanho de partículas muito popular devido a sua facilidade de operação, rapidez de análise e ampla faixa de tamanhos. É atualmente a técnica mais popular para caracterizar distribuições de tamanho de partículas dispersas em meio líquido ou em forma de pó seco. Baseia-se no princípio da interação de um feixe de luz com partículas em um meio fluido. Quando um feixe de luz monocromático e colimado de gás He-Ne atinge uma quantidade de partículas, parte desta luz é submetida a um espalhamento, parte é absorvida e parte é transmitida. No espalhamento, a luz pode ser difratada, refratada e refletida. Neste método, um conjunto de lentes, detectores fotoelétricos e um microprocessador irão captar a intensidade da energia espalhada e transformá-la em distribuição volumétrica das partículas, assumindo-se, a princípio, que as partículas têm formato esférico (FLORÊNCIO & SELMO, 2006). Quanto menor o tamanho da partícula, maior o ângulo de difração de um

feixe luminoso que atravessa uma população de partículas. Sem nenhuma partícula na célula de medição, toda a luz do laser é coletada no detector central. Quando a luz do laser é difracionada pelas partículas durante a medição, não é mais detectada intensidade de luz no detector central. Esta medição é a “obscuração” ocasionada pelas partículas e que será utilizada para determinar o controle do carregamento da amostra. (Figura 18). Através de transformações matemáticas complexas (transformada de Fourier inversa), calcula-se uma estatística de distribuição de tamanho dessa população de partículas. Para partículas maiores do que 1mm, o ângulo de difração é extremamente pequeno, sendo crítico o alinhamento e resolução da óptica (INSTRUTÉCNICA, 2011; MICRONAL, 2011).

a)



b)

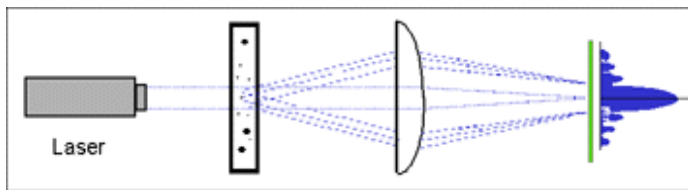


Figura 18: Diagrama de um analisador granulométrico por difração a laser. a) Nenhuma partícula na célula de medição. b) Com partículas da amostra na célula de medição (MICRONAL, 2011).

Se o tamanho das partículas é significativamente maior que a longitude de onda da luz incidente, pode-se utilizar a difração Fraunhofer para a avaliação da distribuição do tamanho das partículas, entretanto, se o tamanho das partículas é da mesma ordem que a longitude de onda da luz incidente, a dispersão resultante pode ser analisada pela teoria de Mie, tendo-se que considerar o índice de

refração e a absorção das partículas para a interpretação dos dados. Por exemplo, para diâmetros de $5\mu\text{m}$ a $1.000\mu\text{m}$ não é necessário conhecer as propriedades ópticas da amostra nem do meio. Nesse caso aplica-se a equação de Fraunhöffer que é uma simplificação da equação de Mie, válida para partículas bastante maiores do que o comprimento de onda da luz utilizada (600 a 800nm). Abaixo de $5\mu\text{m}$, é necessário considerar o índice de refração e de extinção das partículas e usar a equação de Mie para se obter resultados quantitativos confiáveis (PAPINI, 2003).

O tamanho de gotícula também constitui um dos parâmetros importantes na avaliação da estabilidade física da formulação, uma vez que os fenômenos como floculação e coalescência podem ser monitorados pela evolução do diâmetro médio bem como pela distribuição deste (BILLANY, 2005; FRONZA, CAMPOS, TEIXEIRA, 2004). Dentre os fatores que influenciam o diâmetro das gotículas de óleo estão às técnicas de preparação, a composição da formulação, método e condições de produção (tempo, temperatura, pressão). A incorporação de fármacos pode influenciar o diâmetro e a distribuição das gotículas (MARCATO, 2009). Na aplicação da técnica de emulsificação espontânea, os fatores responsáveis pela alteração nos diâmetros de gotícula podem ser a velocidade de migração do solvente orgânico na fase aquosa, a concentração da fase oleosa e o volume de cada uma das fases (KELMANN, 2006).

3.4.3.2 Potencial zeta

Partículas dispersas em um meio líquido podem ser carregadas devido à adsorção de íons provenientes da solução ou à ionização de grupamentos, tais como carboxila (COOH), que se encontram situados na superfície das partículas. A presença de carga leva a um aumento na concentração de contra-íons próximo à superfície, formando assim a dupla camada elétrica. Essa dupla camada elétrica é constituída de uma região interna, que inclui íons fortemente ligados à superfície, e uma região externa, onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico. Dessa forma, o potencial nessa região decai com o aumento da distância da superfície até, a uma distância suficientemente grande, atingir o potencial da solução, convencionado como potencial zero. O potencial zeta é a medida do potencial elétrico localizado no plano de cisalhamento da dupla camada até o interior do líquido. Em outras palavras, o potencial

zeta é a diferença de potencial entre o meio dispersante e a camada estacionária do líquido ligada à partícula dispersa (Figura 19).

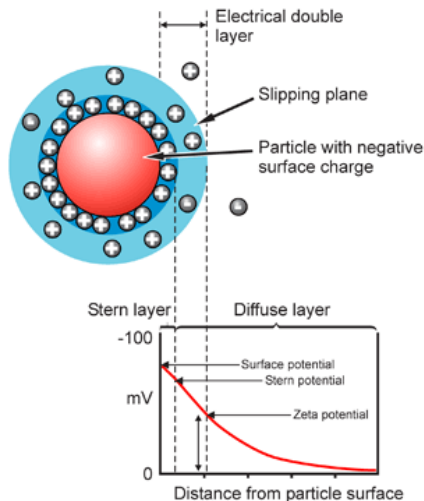


Figura 19: Representação esquemática do potencial zeta (http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm).

A determinação do potencial zeta é geralmente realizada através de técnicas eletroforéticas específicas. Quando um campo elétrico é aplicado, partículas carregadas são atraídas para o eletrodo de carga oposta. A velocidade com que a partícula se move é referida como mobilidade eletroforética e depende de fatores como força do gradiente de voltagem, da constante dielétrica, da viscosidade do meio e do potencial zeta. Para cálculo do potencial zeta, a equação de Henry é aplicada, sendo

$$U_E = \frac{2\epsilon z f(ka)}{3\eta}$$

Onde, z é o potencial zeta, U_E a mobilidade eletroforética, ϵ a constante dielétrica, η a viscosidade e $f(ka)$ a função de Henry. Visto que a determinação do potencial zeta é geralmente feita em meio aquoso com uma concentração moderada de eletrólitos, $f(Ka)$, neste caso, é 1,5 e é referido como a aproximação de Smoluchowski.

O potencial zeta é um fator crítico na caracterização de nanoemulsões, uma vez que reflete a composição da interface do sistema, em relação aos tensoativos formadores do filme interfacial ou em relação à presença de moléculas com carga, localizadas na interface. Além disso, é importante para a avaliação da estabilidade físico-química das emulsões. Se o potencial for relativamente elevado em módulo (maior de 25 mV) as forças repulsivas do sistema superam as forças de London que atraem as gotículas entre si, caracterizando um sistema defloculado (ROLAND *et al.*, 2003). Partículas com potencial zeta maior que ± 30 mV são requeridas para uma excelente estabilização eletrostática. A diminuição desse potencial e, conseqüentemente, na repulsão eletrostática, facilita a agregação das partículas, sendo por isto utilizado como indicativo da estabilidade de uma dispersão (MARCATO, 2009). Entretanto, esta regra não pode ser utilizada em sistemas com estabilizadores estéricos, pois a adsorção destes estabilizadores pode diminuir o potencial zeta.

A utilização de tensoativos aniônicos determina que quanto mais negativo o potencial zeta se apresenta, maior a rede de cargas das gotículas e por conseqüência, mais estável é a formulação. Valores inferiores a -30 mV sugerem alto grau de estabilidade física. As lecitinas, exemplos tensoativos amplamente empregados em nanoemulsões, têm como componentes majoritários os fosfolipídios que levam à formação de formulações com potencial zeta de elevado valor absoluto, entre -40 e -50 mV. Contudo, o potencial zeta de nanoemulsões estabilizadas por fosfolipídeos pode ser significativamente reduzido em pH ácido, podendo comprometer assim a estabilidade física do sistema. Com a adição de cotensoativos de caráter anfotérico, a influência do pH no potencial zeta das formulações pode ser minimizada (KELMANN, 2006; FRONZA, CAMPOS, TEIXEIRA, 2004).

3.4.3.3 Microscopia Eletrônica

Na microscopia eletrônica a radiação empregada é a de feixe de elétrons, sendo ele refratado por meio de lentes eletrônicas. O microscópio eletrônico produz aumentos úteis de 200.000 a 400.000 vezes, sendo seu poder resolvente cerca de 100 vezes maior que o do microscópio de luz. A melhoria do poder resolvente do microscópio eletrônico está diretamente relacionada ao curto comprimento de onda

apresentado pelos raios eletrônicos utilizados para ampliar a amostra e a uma maior abertura numérica obtida em função da diminuição da distância focal (GALLETI, 2003).

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) é comumente chamado de microscópio eletrônico direto pelo fato da imagem da amostra ser formada simultaneamente à passagem do feixe de luz através dele. A parte essencial do microscópio eletrônico de transmissão é uma coluna vertical a qual é percorrida por um feixe de elétrons. Nesse tipo de microscópio, forma-se uma imagem bidimensional do interior desta sobre uma tela, pela passagem de um feixe de elétrons através de cortes extremamente finos da amostra. A imagem é formada diretamente a partir da impressão do feixe de elétrons na tela de observação, após a passagem pela amostra. Os elétrons quando são emitidos são absorvidos pelos átomos de ar. Por isso, um tubo inteiro, entre a fonte de elétrons e o detector, é mantido sob um grande vácuo. Na parte superior da coluna existe uma fonte de elétrons, o canhão eletrônico. No canhão eletrônico existe um gerador de elétrons que é frequentemente um filamento de tungstênio. A voltagem aplicada entre o filamento e o ânodo provoca a aceleração dos elétrons. Para além do canhão eletrônico, a coluna é constituída por uma ou mais lentes condensadoras, uma lente objetiva, uma ou mais lentes intermediárias, uma lente projetora, um porta-objetos em platina móvel que é controlado do exterior, um écran (por vezes dois) e uma câmara fotográfica (Figura 20). As imagens ampliadas pelas lentes projetoras são lançadas para um anteparo fluorescente, uma chapa fotográfica ou um monitor de TV (MARCHI, 2005).

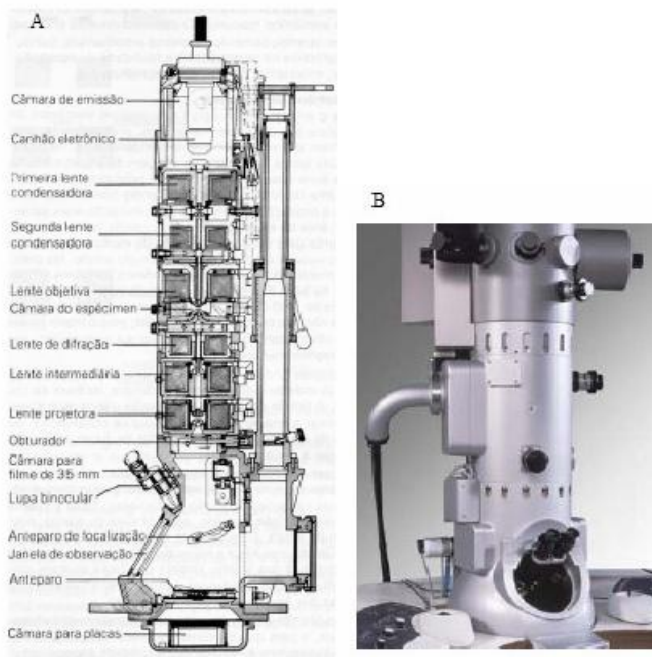


Figura 20: Aspecto da coluna do microscópio eletrônico de transmissão (MET). (A): Secção da coluna (Philips, EM 200); (B): Aspecto exterior (Leo, Libra 120) (citado por MARCHI, 2005).

A Microscopia de Força Atômica (MFA) tem sido uma ferramenta muito utilizada na caracterização de nanossistemas. A MFA fornece informações com alta resolução em três dimensões em escala nanométrica sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície a nível atômico. A MFA tem como princípio básico a força de interação entre a sonda utilizada e a amostra, fornecendo importantes informações tais como organização estrutural e distribuição de diâmetro. Nesse microscópio é efetuada a varredura da superfície da amostra utilizando uma sonda sensível à força (sensor de força), que consiste numa ponta de dimensões atômicas integrada num braço em movimento (Figura 21). À medida que a ponta se aproxima da superfície, os átomos da ponta interagem com os átomos e as moléculas da superfície do material, causando a deflexão do braço do MFA. Esta deflexão do braço de MFA

é medida através da mudança de direção (angular) de um feixe laser emitido por um diodo de estado sólido e refletido pelo braço de MFA, sendo o feixe laser refletido captado por um fotodetector de fendas. A sonda de MFA segue os contornos da superfície. Durante a deslocação da ponta pela superfície o computador analisa, em cada posição na superfície, a força de interação entre a ponta de MFA e a amostra e traça o diagrama das alturas, construindo a topografia da amostra. À medida que a sonda se aproxima da amostra, forças atrativas de Van der Waals passam a atuar, aumentando com a aproximação da sonda até que a separação seja de ordem interatômica. Nesse ponto, surgem forças eletrostáticas repulsivas sugerindo contato físico entre a sonda e a superfície da amostra. A interação real entre sonda e amostra tem caráter mais complexo; porém, as características básicas da interação são as mesmas: atração à longa distância e repulsão em distâncias menores (PAQUIM & BRETT, 2004; LARA, 2008).

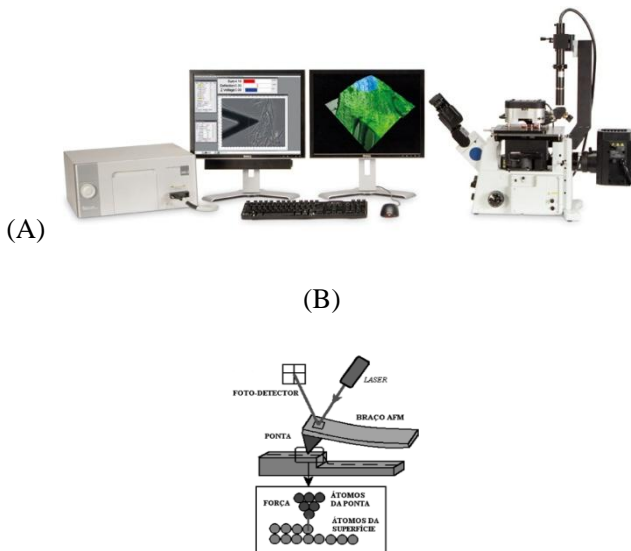


Figura 21: (A) Aspecto externo do microscópio de força atômica (MFA) e acessórios (MFP-3D-BIO, Asylum Research); (B) Esquema do princípio de funcionamento do MFA (PAQUIM & BRETT, 2004).

3.4.3.4 Estudo de liberação *in vitro*

A formulação tópica é um sistema complexo e a dinâmica de liberação da substância ativa de seu veículo tem sido objeto de investigação por muitos anos. O sistema de células de Franz é um método de liberação *in vitro* simples, reprodutível, geralmente aplicado para todas as formas farmacêuticas de uso tópico. Foi desenvolvido para medir a liberação *in vitro* e é recomendado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) GUIDANCE FOR INDUSTRY (SUPAC-SS, 1997).

A liberação *in vitro* é um dos métodos padrão que podem ser usados para caracterizar uma forma farmacêutica semissólida para uso tópico como cremes, géis e pomadas. Alterações importantes nas características da formulação de um produto farmacêutico ou nas propriedades termodinâmicas do fármaco contido na formulação podem mostrar uma alteração significativa na liberação do fármaco, já que a liberação *in vitro* de um fármaco é uma propriedade da formulação que o contém (SUPAC-SS, 1997).

O modelo utilizando a célula de difusão ou de Franz, esquematizada na Figura 22, consiste de dois compartimentos, um contendo o fármaco (compartimento doador) e outro contendo uma solução onde o fármaco é solúvel (compartimento receptor), separados por uma membrana (sintética ou natural) e dispostos verticalmente. A formulação é colocada na parte acima da membrana, no compartimento doador. O compartimento inferior possui uma saída lateral para coleta do meio receptor, em tempos adequados, suficientes para determinação da taxa de liberação do fármaco da formulação (DIEMBECK *et al.*, 1999).



Figura 22: Célula de difusão de Franz (SILVA *et al.*, 2010).

A membrana artificial serve como um suporte separando a formulação do meio receptor e não deve ser velocidade limitante nos processos de liberação do fármaco. As membranas artificiais podem ser constituídas de acetato de celulose, nitrato de celulose e polissulfona (HAIGH & SMITH, 1994) as quais não oferecem resistência à passagem do fármaco do compartimento doador para o compartimento receptor, possibilitando, desta forma, a quantificação do fármaco neste último, em função da partição entre o veículo e o meio receptor.

A seleção de um meio receptor apropriado é um fator crítico para o sucesso do experimento de liberação de fármacos. A composição do meio receptor deve demonstrar ser capaz de manter a *sink condition*, apresentar-se como solução tampão com pH fisiológico para fármacos solúveis em água ou ainda meio hidroalcoólico para fármacos lipofílicos. Quando a concentração do fármaco dissolvida no meio de liberação é menor que 10% da sua concentração de saturação, diz-se que o sistema está operando sob *sink condition*. As amostras coletadas devem apresentar no mínimo cinco tempos de coletas diferentes durante todo o período para determinação do fluxo da liberação (PRAÇA, 2010).

A quantidade de fármaco nas alíquotas removidas da fase receptora pode ser analisada por CLAE ou outro método analítico. Uma curva da quantidade de fármaco por unidade de área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus tempo (min) resulta numa reta, cuja inclinação representa a taxa de liberação. Esta medida de taxa de liberação é específica para cada formulação e é usada para monitorar a qualidade do produto (SUPAC-S, 1997).

3.4.4 Estabilidade das nanoemulsões

Nanoemulsões são mais estáveis que as macroemulsões por diferentes razões. A gota de tamanho reduzido, além de sofrer menor ação da gravidade, apresenta movimento Browniano que confere estabilidade à nanoemulsão frente à sedimentação ou cremagem. O fenômeno de coalescência também é reduzido, visto que o tamanho diminuto das gotículas previne a sua deformação. Nas nanoemulsões, a principal causa de instabilidade é a chamada maturação de Ostwald. Este processo ocorre em nanoemulsões polidispersas devido à diferença de solubilidade entre os diversos tamanhos de glóbulos, que ocasiona a migração dos pequenos para o interior dos grandes glóbulos.

Teoricamente, a maturação de Ostwald leva à condensação de todas as gotículas em uma única gota ou separação de fases. Entretanto, isso não ocorre na prática, desde que a velocidade de crescimento do tamanho da gota diminua com o aumento do tamanho do glóbulo (TADROS *et al.*, 2004). A redução do processo de maturação de Ostwald pode ser obtida pela adição de uma pequena quantidade de um segundo óleo apresentando baixa solubilidade na fase aquosa, bem como a adição de um segundo surfactante com o mesmo comprimento de cadeia alquila e maior grau de etoxilação do que o surfactante principal, no caso de sistemas estabilizados com surfactantes não iônicos etoxilados (SOLANS *et al.*, 2005).

A manutenção da estabilidade de um sistema nanoestruturado é imprescindível em todas as etapas, desde sua produção e armazenamento, até a liberação do fármaco. Dentre os fatores ambientais que podem afetar a estabilidade das nanoemulsões estão a temperatura, luz e oxigênio. Esses fatores podem ocasionar reações químicas e físicas, como alterações no tamanho e distribuição de tamanho das partículas, formação de precipitados, oxidação e hidrólise de componentes do sistema. O estudo da estabilidade deve incluir a caracterização do produto final e a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento da formulação contendo as nanoestruturas. Além dos aspectos de tamanho de gota e distribuição granulométrica mencionados acima, a avaliação do aspecto macroscópico, composição quali-quantitativa, potencial zeta, pH, taxa e forma de associação do fármaco, e cinética de liberação são importantes para atestar a qualidade do produto final (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- Álcool benzílico (Valdequímica, Brasil);
- Benzoilmetronidazol (Sintofarm, Itália);
- Hidroxipropilmetilcelulose (Hipromelose, Methocel® E15, Brasil);
- Lecitina hidrogenada (Phospholipon 90H PHOSPHOLIPID GmbH, Alemanha);
- Oleato de etila (Distriol Comércio de Insumos LTDA, Brasil);
- Óleo de algodão (Distriol Comércio de Insumos LTDA, Brasil);
- Óleo de amêndoas (Distriol Comércio de Insumos LTDA, Brasil);
- Óleo de amendoim (Distriol Comércio de Insumos LTDA, Brasil);
- Óleo de côco (Distriol Comércio de Insumos LTDA, Brasil);
- Óleo de gergelim (Distriol Comércio de Insumos LTDA, Brasil);
- Óleo de mamona (Distriol Comércio de Insumos LTDA, Brasil);
- Óleo de oliva (Distriol Comércio de Insumos LTDA, Brasil);
- Óleo de soja (Distriol Comércio de Insumos LTDA, Brasil);
- Polietilenoglicol 660-12-hidroxiestearato (Solutol HS 15 BASF, Alemanha);
- Polisorbato 80 (Tween 80, Brenntag Química, Brasil);
- Triglicerídeos de cadeia média (MCT, Lipoid GmbH, Alemanha);

4.1.2 Reagentes e solventes

- Acetona PA (Vetec, Brasil);
- Etanol PA (Vetec, Brasil);
- Metanol grau CLAE (J.T. Baker, Estados Unidos);

- Padrão secundário de Benzoilmetronidazol (Mallinckrodt Chemical Works, Estados Unidos) gentilmente fornecido pelo laboratório farmacêutico Prati, Donaduzzi;
- Padrão secundário de Metronidazol base (Mallinckrodt Chemical Works, Estados Unidos) gentilmente fornecido pelo laboratório farmacêutico Prati, Donaduzzi;
- Padrão secundário de ácido benzóico (Mallinckrodt Chemical Works, Estados Unidos) gentilmente fornecido pelo laboratório farmacêutico Prati, Donaduzzi;

4.1.3 Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos (Vortex AP 56, Brasil);
- Agitador magnético TE-085 (Fisatom, Brasil);
- Balança analítica (Mettler Toledo - AG 204, Brasil);
- Balança Analítica (Ohaus Adventurer, Brasil);
- Balança analítica AB204 (Mettler Toledo, Brasil);
- Banho termostatzado (Thermo Haake B3, Estados Unidos);
- Bomba de vácuo VAC® V-500 (Fisatom, Brasil);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência série LC-20 AT com Sistema de Bombeamento modelo LC-20 AT, Sistema de Mistura modelo LPGE KIT, Degaseificador DGU-20 A5, Detector UV SPD-M20A, Auto Injetor SIL-20A, Forno para Colunas CTO-10AS VP e Sistema de Controle, Registro e Tratamento de Dados CBM-20 (Shimadzu, Japão).
- Evaporador rotatório R-114 (Fisatom, Brasil);
- Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido);
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011 (Jeol Ltda, Japão);
- Phmetro digital PG 1800 (Gehaka, Brasil);
- Viscosímetro rotacional do tipo Brookfield modelo LVDV-III-Ultra (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, EUA);
- Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido);

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da solubilidade do BZM em óleos

Para determinar a solubilidade do BZM nos óleos selecionados para a preparação das nanoemulsões, um excesso desse fármaco foi adicionado em 5 mL de cada um dos óleos. As misturas formadas foram mantidas sob agitação magnética a 800 rpm por 24 horas, na temperatura de 25 °C. Após este período, as amostras foram filtradas através de papel filtro quantitativo de 8 µm (Millipore, EUA). Uma alíquota de cada amostra foi então retirada, diluída em metanol e analisada quanto ao teor de BZM por CLAE, conforme condições descritas em 4.3.5. Os óleos testados foram os seguintes: óleo de oliva, oleato de etila, óleo de mamona, óleo de algodão, óleo de amendoim, óleo de amêndoas, óleo de côco, óleo de gergelim e óleo de soja. Os resultados foram expressos em (µg/mL) e representam a média de três experimentos independentes para cada óleo testado.

4.2.2 Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea, conforme descrito por BOUCHEMAL e colaboradores (2004). Resumidamente, em um cálice foram adicionados 1,0 mL de uma solução de BZM 10 mg/mL, 10,0 mL de uma solução de fosfatidilcolina de soja hidrogenada 2,5 mg/mL (Phospholipon 90H®), ambas em acetona; 250 µL de óleo de oliva e o volume final foi completado com o mesmo solvente até 20 mL. Esta solução foi adicionada em 60 mL de uma solução aquosa contendo Solutol HS15® 1% (m/V) (Formulação SOL) ou uma mistura de Solutol HS15® 0,4% (m/V) e Tween 80 0,5% (m/V) (Formulação SOL+TW), além de álcool benzílico 0,2% (m/V) como conservante, com auxílio de uma pipeta pasteur, sob agitação magnética. A dispersão coloidal formada foi submetida à evaporação sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico e concentração até volume de 10 mL. A dispersão coloidal foi então filtrada através de papel filtro quantitativo 8 µm e armazenada a 4° C para posterior análise. As formulações foram preparadas em triplicata e, quando necessário, preparações sem fármaco (placebo) foram obtidas nas mesmas condições. A composição das formulações testadas encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Composição da fase oleosa das nanoemulsões contendo BZM.

FASE	COMPONENTES	Formulação	Formulação
		SOL	SOL+TW
ORGÂNICA	BZM ¹ (mg)	10	10
	Óleo de oliva (µL)	250	250
	Lecitina de soja ² (mg)	25	25
	Acetona (mL) q.s.p	20	20
AQUOSA	Solutol HS 15 (mg)	600	240
	Tween 80 (mg)	-	300
	Álcool benzílico (mg)	12	12
	Água (mL) q.s.p	60	60

¹Solução de BZM 10 mg/mL; ²Solução de lecitina de soja 2,5 mg/mL.

4.2.3 Preparação do gel de hipromelose contendo as nanoemulsões de BZM

Para obtenção dos géis contendo as nanoemulsões, 2,4 g de hipromelose (Methocel® E15) foram adicionados aos poucos a 60 mL das formulações SOL e SOL+TW. As formulações foram mantidas sob agitação magnética a 500 rpm em temperatura ambiente ($25 \pm 0,50^\circ\text{C}$), até a formação de um gel homogêneo. Géis contendo nanoemulsões de BZM e placebos foram obtidos em triplicata e armazenados para posterior análise.

4.3 Caracterização das nanoemulsões

4.3.1 Determinação do diâmetro de gotícula

A granulometria das partículas e o índice de polidispersão foram medidos em uma suspensão aquosa por difração de luz laser utilizando um Analisador de Partículas Malvern Mastersizer 2000 (0.02 µm a 2000 µm). Esse equipamento mede a granulometria das partículas usando o princípio da difração laser. O método de difração empregado foi o Mie considerando índice de refração das nanoemulsões de 1,35. As amostras foram colocadas no fluido do módulo onde foram distribuídas através de

uma célula a velocidade constante. Um feixe de luz laser brilha através da célula onde é difratada pelas partículas no interior da amostra. A luz é dispersa e recolhida por um conjunto de detectores. O comportamento da variação de distribuição granulométrica das amostras analisadas nos dois meios de dispersão foi obtido pelos parâmetros D90%, D50% e D10%, equivalente ao diâmetro teórico acima do qual há 90%, 50% e 10%, respectivamente, de volume acumulado com partículas de diâmetro abaixo do valor detectado pelo equipamento. Os valores D90%, D50% e D10% são fornecidos pelo programa computacional utilizado no equipamento Mastersizer podendo ser conferidos na curva de distribuição granulométrica de cada amostra.

O índice de polidispersão ou amplitude relativa (SPAN), calculado pelo equipamento, reflete o perfil de homogeneidade no tamanho das partículas. Amostras que apresentaram índice de polidispersão inferior a 0,3 são consideradas monodispersas. A equação abaixo é utilizada para o cálculo do índice de polidispersão de tamanho de uma amostra, segundo a literatura (ZILI, SOUAD, FESSI, 2005).

$$\text{Polidispersão ou SPAN} = \frac{D(0.9) - D(0.1)}{D(0.5)}$$

$D(0.9)$ = diâmetro de gota tal que 90% do volume do líquido é constituído de gotas menores que esse valor

$D(0.5)$ = diâmetro de gota tal que 50% do volume do líquido é constituído de gotas menores que esse valor

$D(0.1)$ = diâmetro de gota tal que 10% do volume do líquido é constituído de gotas menores que esse valor

Os valores obtidos foram apresentados como a média \pm desvio padrão de três diferentes análises de cada formulação de nanoestruturas.

4.3.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das nanoemulsões foi determinado por anemometria laser Doppler usando um Zetasizer Nano Series. As medidas foram realizadas a 25° C após diluição apropriada das nanoemulsões em água. As amostras foram colocadas em células eletroforéticas, onde um potencial de 150 mV foi estabelecido. O potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética

média usando a aproximação de Smoluchowski. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.3 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado em pHmetro digital PG 1800, previamente calibrado com soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente sem prévia diluição das amostras. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.4 Determinação da viscosidade

A caracterização reológica dos géis foi realizada em viscosímetro rotacional Brookfield modelo LVDV-III-Ultra com dispositivo para pequenas amostras (Small Simple Adapter) e sensor de cisalhamento n°18 (ULA) à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). As amostras dos hidrogéis contendo nanoemulsões de BZM e hidrogéis brancos foram mantidas a temperatura ambiente e submetidas a velocidades de rotação de 60 RPM, respeitando os limites de torque (entre 10 e 100%). Os valores de viscosidade, em função do gradiente de cisalhamento, foram avaliados e comparados. Os valores de viscosidade relatados neste trabalho referem-se a valores médios, obtidos por triplicata de leitura do equipamento na velocidade de rotação especificada.

4.3.5 Avaliação da morfologia das nanoemulsões contendo BZM

As características morfológicas das nanoemulsões SOL e SOL+TW contendo BZM foram avaliadas através de fotomicrografias, onde foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão empregando a técnica de coloração negativa com ácido fosfotungstíco a 1% .

4.3.6 Determinação do teor de BZM nas nanoemulsões

4.3.6.1 Condições instrumentais e analíticas

O teor de BZM nas nanoemulsões foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência através de um sistema Shimadzu série LC-20 AT. O comprimento de onda do detector foi previamente selecionado mediante realização de espectro de varredura do fármaco e fixado em 310 nm. Os experimentos foram conduzidos em fase reversa usando uma coluna Kromasil C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm; Akzo Nobel, EUA) e volume de injeção de 20 µL. A fase móvel foi constituída de uma mistura de metanol:água (50:50, v/v) e foi eluída em modo isocrático em um fluxo de 1 mL/min. A área do pico foi analisada automaticamente usando-se o programa LCSolution software.

4.3.6.2 Validação da metodologia analítica

Os parâmetros de validação selecionados para a quantificação de BZM presente nas formulações através de CLAE seguiram as normas de validação dos procedimentos analíticos e de metodologias do ICH (2005), bem como as especificações estabelecidas do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contida na RE n° 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Os parâmetros empregados para validação do método de CLAE foram: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez.

4.3.6.2.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada por meio da análise das preparações de nanoemulsões isentas de BZM, comparativamente às formulações que continham BZM em 310 nm e seus produtos de degradação. Para tanto, uma alíquota de cada nanoemulsão (500 µL) foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL e dissolvida em metanol. As amostras foram injetadas conforme condições cromatográficas descritas em 4.3.5.1.

4.3.6.2.2 Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método, soluções padrões de BZM foram preparadas nas concentrações de 10; 20; 40; 60; 80; 100 e 120 µg/mL. A partir destas soluções, três curvas de calibração foram obtidas em dias diferentes, cada uma delas contendo sete pontos diferentes. Curvas de concentração de BZM em função da área do pico foram construídas e a linearidade do método na faixa de concentração testada foi avaliada pela análise da regressão linear.

4.3.6.2.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados matematicamente a partir da inclinação (S) e do desvio padrão do intercepto (DP), obtidos a partir das curvas de calibração. O limite de detecção foi expresso como $LD = (3,3 \times DP)/S$ e o limite de quantificação como $LQ = (10 \times DP)/S$ (BRASIL, 2003).

4.3.6.2.4 Precisão intradia e interdia

A precisão intradia (repetibilidade) foi avaliada pela determinação de seis amostras de nanoemulsões contendo 100 µg/mL de BZM, no mesmo dia, nas mesmas condições experimentais. A precisão interdia (precisão intermediária) foi avaliada por meio da análise das amostras em três dias diferentes. A precisão foi expressa como percentagem do desvio padrão relativo (DPR%).

4.3.6.2.5 Exatidão

A exatidão ou recuperação do método foi realizada após determinação da concentração de BZM nas nanoemulsões brancas previamente contaminadas com concentrações conhecidas do padrão em três diferentes níveis (baixo, médio e alto), correspondendo a concentrações finais de 80,0; 100,0 e 120,0 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata e a exatidão foi expressa como percentagem de BZM recuperado (R%).

4.3.6.2.6 Robustez

A robustez do método foi verificada pela análise do teor de fármaco nas nanoemulsões após pequenas variações nas condições experimentais: fluxo, (0,9 e 1,1 mL/min), coluna cromatográfica (fabricantes Phenomenex Luna e Kromazil Akzo Nobel) e composição da fase móvel (metanol:água; 45:55 e 55:45).

4.3.6.3 *Determinação do teor de BZM nas nanoemulsões*

A concentração total de BZM nas formulações foi determinada após completa dissolução das mesmas em metanol. Para isso, 250 µL de cada uma das formulações foram transferidos para balão volumétrico de 5,0 mL e o volume foi completado com metanol. As amostras foram injetadas no cromatógrafo em triplicata e as áreas médias dos picos referentes ao BZM foram comparadas com aquelas obtidas após análise de soluções padrão de concentração conhecida, analisada nas mesmas condições. O teor de BZM nas nanoemulsões foi expresso como mg de BZM por mL de nanoemulsão.

4.3.6.4 *Análise estatística*

Para os experimentos analíticos, os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente através da comparação das médias dos resultados obtidos (teste t de student) e do teste de hipóteses sobre igualdade de variâncias (Distribuição F de Snedecor).

4.3.7 *Estudo de liberação in vitro*

O estudo de liberação do BZM a partir das formulações nanoemulsionadas e na forma de gel, assim como da formulação comercial contendo o fármaco, foi realizado em células de difusão do tipo Franz com área difusional de 1,76 cm² e volume de compartimento receptor de 7 mL. Foram utilizadas membranas de acetato de celulose (0,2 µm de abertura de poro, Sigma-Aldrich D9527, EUA), previamente hidratadas em água destilada a 100°C durante cinco minutos, por três vezes. As membranas de acetato de celulose foram então colocadas nas células de difusão, de modo a separar o compartimento doador do

compartimento receptor. O compartimento receptor foi preenchido com etanol:água 60:40 (v/v), tomando o cuidado de evitar a presença de bolhas de ar abaixo da membrana. A solubilidade do BZM nessa solução foi previamente avaliada com o objetivo de assegurar condições *sink*. Antes do ensaio, o meio receptor foi mantido termostatizado a $37 \pm 0,5$ °C, sob agitação magnética a 100 rpm durante 30 minutos, a fim de estabelecer o equilíbrio entre a membrana e a solução receptora. Após este período, 500 µL das formulações foram aplicados diretamente sobre a membrana no compartimento doador e o sistema foi fechado por disco de teflon. Alíquotas de 1,0 mL da solução receptora foram retiradas após 30, 60, 90, 120 e 150 minutos da aplicação e submetidas à análise por CLAE, conforme descrito em 4.3.5.3. O volume da solução receptora foi repostado a cada amostragem para manutenção das condições *sink* do sistema. A partir dos resultados, curvas de quantidade de BZM permeado por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus tempo (h) foram construídas e o fluxo (J_{ss}) ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) foi então determinado graficamente (SUPAC-SS, 1997). Os resultados foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA – teste de Tukey), considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da solubilidade do benzoilmetronidazol em diferentes óleos

Uma importante etapa no desenvolvimento de nanoemulsões consiste na seleção do componente oleoso, o qual deve apresentar o potencial máximo de solubilização do fármaco, auxiliando, assim, no alcance do máximo de concentração na preparação. A primeira etapa do trabalho consistiu, portanto, na determinação da solubilidade do BZM em vários óleos candidatos a serem utilizados na composição das nanoemulsões. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Solubilidade do BZM em diferentes tipos de óleos.

Tipos de óleo	Concentração média de BZM (µg/mL)
Oleato de etila	317,32 ± 6,07
Óleo de mamona	699,01 ± 9,47
Óleo de oliva	2476,08 ± 43,64
Óleo de algodão	303,42 ± 7,89
Óleo de amendoim	230,78 ± 5,58
Óleo de amêndoas	231,91 ± 8,78
Triglicerídeos de cadeia média	748,86 ± 16,81
Óleo de côco	1212,85 ± 35,73
Óleo de gergelim	746,55 ± 15,15
Óleo de soja	756,78 ± 18,51

A Tabela 2 indica que a maior concentração do BZM foi alcançada com a utilização de óleo de oliva, seguido do óleo de côco e triglicerídeos de cadeia média. Como pode ser observada, a solubilidade do BZM no óleo de oliva foi 11 vezes maior que no óleo de amendoim, o óleo em que o fármaco exibiu a menor solubilidade. Esse resultado pode estar relacionado com a composição química dos óleos empregados, a qual difere quanto à presença de ácidos graxos majoritários (ARAÚJO *et al.*, 2011). O óleo de oliva é constituído principalmente ácido oléico (75%), além de ácido linoléico, ácido esteárico e ácido palmítico em menor proporção (FRANGE & GARCIA, 2009, FONSECA, 2010). Esse óleo foi escolhido como excipiente das nanoemulsões, pois foi o que possuiu maior capacidade de solubilização do BZM dentre todos os outros óleos testados. Sendo assim, utilizando o óleo de oliva é possível incorporar doses maiores do BZM nas nanoemulsões.

5.2 Preparação e caracterização físico-química das nanoemulsões

Nesta etapa do trabalho foram preparadas e caracterizadas nanoemulsões brancas e contendo BZM através do procedimento de emulsificação espontânea empregando-se condições previamente descritas por BOUCHEMAL e colaboradores (2004). Nessa técnica, os constituintes da fase oleosa da formulação são previamente solubilizados em acetona e a solução resultante é adicionada a uma fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico. O solvente orgânico, miscível em água, difunde-se rapidamente na fase aquosa, gerando uma turbulência interfacial (efeito Maragoni) que leva à obtenção de gotas de tamanho reduzido (TADROS *et al.*, 2004). As nanoemulsões são formadas espontaneamente e, após, submetidas à evaporação sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico e concentração até volume desejado.

Com base nos estudos de solubilidade anteriores, o óleo de oliva foi selecionado como componente oleoso das nanoemulsões. Dois sistemas surfactantes foram testados, o estearato de polietilenoglicol 660 (Solutol HS 15; SOL) e uma mistura de estearato de polietilenoglicol 600 e polissorbato 80 (Tween 80; TW), sendo as nanoemulsões resultantes denominadas como SOL e SOL+TW, respectivamente. As nanoemulsões isentas de BZM (brancas)

apresentaram aspecto translúcido a leitoso, característico das dispersões coloidais. Após 24 horas de armazenamento à temperatura de 25°C, tanto as formulações SOL e SOL+TW como as suas respectivas brancas, mantiveram as suas características macroscópicas iniciais, e ausência de cremação ou separação de fases.

Diversos parâmetros podem influenciar as características físico-químicas das nanoemulsões obtidas, entre eles, as condições de emulsificação empregadas e a composição quali e quantitativa das formulações (BOUCHEMAL *et al.*, 2004). As características físico-químicas das nanoemulsões brancas e contendo BZM estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Características físico-químicas das nanoemulsões

Formulação		Diâmetro (médio) ^a (nm)	SPAN ^a	Potencial Zeta ^a (mV)	pH ^a
SOL	Branca	743 ± 5,51	1,13 ± 0,01	-8,89 ± 2,96	6,50 ± 0,26
	BZM	90 ± 2,08	0,95 ± 0,02	-13,67 ± 2,40	6,41 ± 0,32
SOL+TW	Branca	645 ± 10,26	0,38 ± 0,01	-14,67 ± 2,53	6,31 ± 0,44
	BZM	630 ± 2,00	0,36 ± 0,01	-9,81 ± 0,32	6,00 ± 0,12

^a Média ± desvio padrão (n=3)

Conforme observado na Tabela 3, as nanoemulsões apresentaram diâmetro de gotícula compreendido entre cerca de 90 e 740 nm, de acordo com a formulação testada. As nanoemulsões preparadas com a associação Solutol e Tween brancas e contendo BZM, mostraram-se monodispersas, com tamanho médio de cerca de 600 nm. Por outro lado, o uso de Solutol HS 15 1% levou a obtenção de sistemas mais polidispersos, como pode ser visto pelos elevados valores de SPAN, provavelmente devido à formação de diferentes nanoestruturas. A redução do tamanho da gota foi observada quando as nanoemulsões foram preparadas com Solutol 1% na presença do fármaco. Estudos anteriores têm demonstrado que o Solutol 1% leva a formação de emulsões submicrométricas de tamanho reduzido (DORA *et al.*, 2011), entretanto o efeito da presença de BZM verificado nesse estudo, sobre o tamanho da gota da emulsão, resta a ser investigado.

O potencial zeta é um parâmetro das dispersões coloidais que é empregado como indicativo de estabilidade. Muitos autores têm estabelecido que as nanoemulsões atingem o máximo de estabilidade quando o potencial zeta é maior que 30 mV em módulo. Entretanto, um

efeito de estabilização estérica também tem sido observado em dispersões coloidais estabilizadas com surfactantes não iônicos (CAPÉK, 2004). As nanoemulsões são metaestáveis, ou seja, estáveis por longo período de tempo, cuja estrutura depende do processo de preparo e da estabilização estérica quando se emprega tensoativos não-iônicos e/ou polímeros na preparação. Isso acontece devido ao pequeno tamanho de glóbulo, que proporciona grande redução da força de gravidade sobre os mesmos, e ainda superada pelo movimento Browniano (TADROS *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004).

Conforme pode ser visto na Tabela 3, as análises de potencial zeta indicaram a presença de gotículas de carga negativa, decorrentes da presença de lecitina na interface das nanoemulsões. Entretanto, esses valores demonstraram ser relativamente baixos, em especial quando somente o Solutol foi empregado como surfactante da formulação. Esse efeito pode estar associado à presença das cadeias de polietilenoglicol na interface das gotículas que mascara as cargas negativas da lecitina, mas ao mesmo tempo produz estabilização estérica, impedindo a coalescência das mesmas.

O valor de pH é um parâmetro de monitoramento da estabilidade em nanoemulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas ou crescimento bacteriano, que podem comprometer a qualidade do produto final. No caso de emulsões formuladas com óleos vegetais, a diminuição no valor do pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que geram ácidos graxos livres. Os ácidos graxos livres reduzem o valor de pH das formulações, sendo empregados como indicadores de estabilidade frente a diferentes condições de armazenamento (TADROS *et al.*, 2004). O pH das nanoemulsões variou entre 6,0 e 6,5 (Tabela 3) e apesar das diferenças terem sido verificadas com o uso de diferentes sistemas surfactantes e com a adição do fármaco, essas diferenças não parecem ser significativas.

As fotomicrografias obtidas a partir das nanoemulsões SOL e SOL+TW contendo BZM são mostradas na Figura 23. A Figura mostra que ambas as nanoemulsões exibem estruturas de formato predominantemente esférico, de tamanho nanométrico, compatível com as medidas por granulometria a laser. As fotomicrografias claramente revelam regiões de densidade diferentes, ou seja, um núcleo escuro e um revestimento, provavelmente constituído pelas moléculas do Solutol que se encontram adsorvidas à superfície das gotas. Esse revestimento

aparece mais evidente naquelas formulações em que somente esse tensoativo foi utilizado na preparação (Figura 23a).

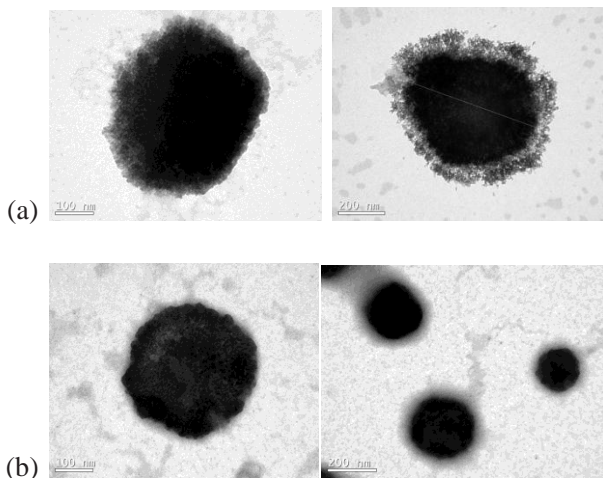


Figura 23: Fotomicrografias obtidas por MET a partir das nanoemulsões contendo BZM (a) SOL e (b) SOL+TW

5.3 Determinação do teor de BZM nas nanoemulsões por CLAE

5.3.1 Seleção das condições de análise

A capacidade das nanoemulsões em incorporar o BZM foi avaliada, usando para isso o parâmetro de teor de fármaco nas preparações. Para tal, um método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado, de modo que ele gere informações confiáveis das amostras. Alguns trabalhos relatam o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a quantificação do BZM, utilizando CLAE com detecção no ultravioleta. Esse tipo de detecção apresenta, como vantagens, uma sensibilidade adequada e possibilidade de análise de uma grande variedade de substâncias (BEMPONG *et al.*, 2005; VU *et al.*, 2008; MISHAL & SOBER, 2005). Assim, a seleção do comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção do BZM foi realizada em uma primeira etapa. Para tanto, espectros de varredura de soluções das

nanoemulsões contendo BZM em metanol:água (50:50, v/v) foram obtidos entre 200 e 400 nm. A Figura 24 apresenta o espectro de absorção UV/VIS de uma solução padrão de BZM e da nanoemulsão

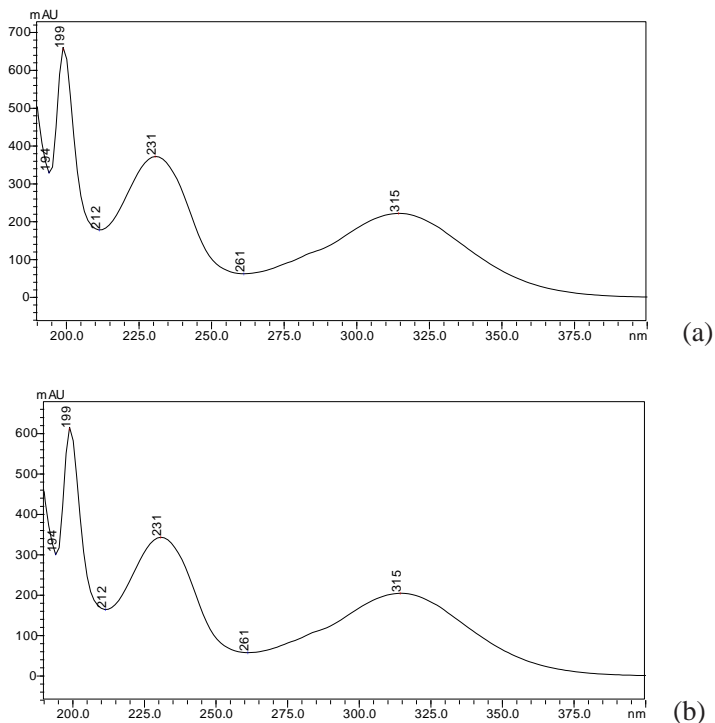


Figura 24: Espectro de absorção da (a) solução padrão de BZM em metanol:água (50:50, v/v) (0,1mg/mL) e (b) da nanoemulsão.

Como pode ser observado na Figura 24, os comprimentos de onda referentes aos máximos de absorção do BZM foram 230 e 315 nm. A fim de evitar interferências do solvente usado na diluição das amostras na quantificação do fármaco, o comprimento de onda selecionado para as análises do BZM por CLAE foi 315 nm. O melhor desempenho cromatográfico foi alcançado quando a mistura de metanol:água 50:50 (v/v) foi empregada como eluente, com fluxo de 1,0

mL/min. Nessas condições, o tempo de retenção do benzoilmetronidazol foi de 9 minutos.

5.3.2 Validação da metodologia analítica

5.3.2.1 *Especificidade*

A especificidade de um método indica sua capacidade em avaliar sem equívoco o analito de interesse, mesmo em presença de outras substâncias como impurezas, produtos de degradação e adjuvantes. A especificidade do método pode ser comprovada, por exemplo, mediante a comparação de cromatogramas do analito na ausência e na presença da mistura de adjuvantes que podem interferir na análise, bem como através de cromatogramas obtidos com a mistura de adjuvantes empregados (ICH, 2005). Neste estudo, a especificidade do método foi avaliada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos após análise por CLAE das nanoemulsões contendo BZM preparadas usando a mistura de Solutol HS 15 e Tween 80 como surfactante e das nanoemulsões brancas obtidas nas mesmas condições e dos respectivos produtos de degradação do BZM: ácido benzóico, metronidazol (Figura 25). A formulação SOL+TW foi escolhida para esse estudo de validação em virtude da presença de mais um composto (Tween 80) que poderia interferir na quantificação do fármaco. A pesquisa de produtos de degradação do BZM possibilitou avaliar a especificidade do método em dosar somente o BZM no comprimento de onda determinado.

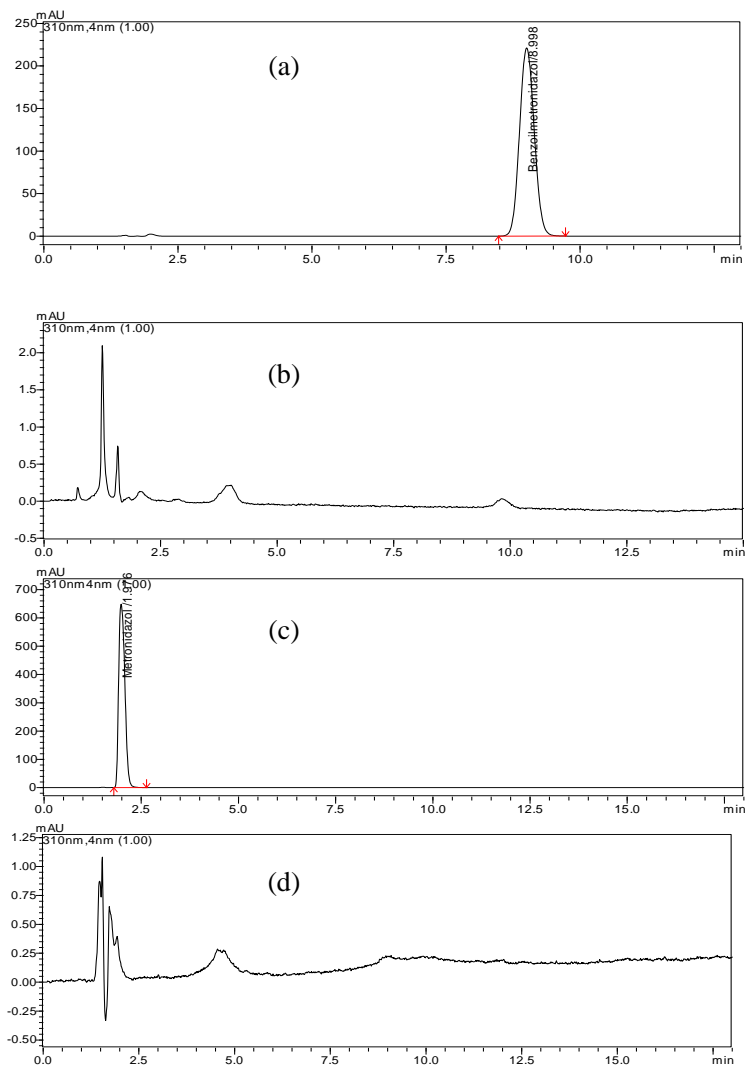


Figura 25: Cromatogramas obtidos após análise por CLAE das (a) nanoemulsões contendo BZM, (b) nanoemulsões brancas, (c) metronidazol base e (d) ácido benzóico.

Com base nos cromatogramas apresentados na Figuras 25 observa-se que não há interferência dos adjuvantes das formulações e

dos produtos de degradação para a quantificação do BZM, indicando que o método é específico a que se destina.

5.3.2.2 *Linearidade*

A linearidade pode ser definida como a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise dentro de uma determinada variação. Representa a habilidade do método de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração da substância na amostra, dentro de um intervalo especificado. Esta avaliação é realizada por meio da elaboração de uma curva padrão e da análise da regressão linear. A linearidade do método foi avaliada após injeção de soluções padrões de BZM em concentrações variando entre 10 e 120 $\mu\text{g/mL}$. A curva de calibração do BZM e os resultados obtidos após análise da regressão encontram-se demonstrados na Figura 26 e Tabela 4, respectivamente. Os valores médios calculados para o coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9985$) indicaram a linearidade da curva de calibração.

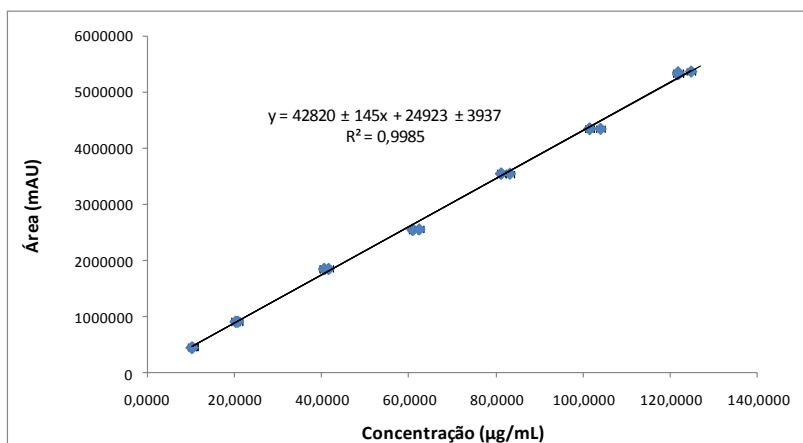


Figura 26: Curva de calibração do BZM obtida após análise das soluções padrões do fármaco por CLAE.

Tabela 4: Resumo dos resultados obtidos após análise da regressão linear dos dados da curva de calibração do BZM.

Parâmetro	Resultado
Faixa de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	10 - 120
Equação da reta	$y = 42820 \pm 145x + 24923 \pm 3937$
R^2	0,9985
LD ($\mu\text{g/mL}$)	1,75
LQ ($\mu\text{g/mL}$)	5,82

O limite de detecção pode ser definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, enquanto que o limite de quantificação representa a menor concentração da substância analisada que pode ser determinada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Neste contexto, a determinação dos limites de detecção e quantificação foi realizada com base no desvio padrão da resposta e inclinação da curva de calibração (Tabela 4). Os valores de LD e LQ calculados indicaram que o método é sensível para quantificação do benzoilmetronidazol nas nanoemulsões.

5.3.2.3 *Precisão*

A precisão do método é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão pode ser avaliada pelo grau de reprodutibilidade, precisão intermediária ou repetibilidade de um método analítico. A primeira é avaliada através de resultados obtidos de uma amostra analisada em diferentes laboratórios. A precisão intermediária (precisão inter-corrída) expressa o efeito de variações dentro do laboratório devido a eventos diferentes como diferentes dias, analistas e equipamentos. A repetibilidade (precisão intra-corrída), por sua vez, é medida em função dos valores encontrados através de várias reproduções do método, nas mesmas condições em um curto intervalo de tempo (ICH, 2005). Os resultados estão na avaliação da precisão do método são apresentados na Tabela 5 e 6.

Tabela 5. Valores obtidos na avaliação da precisão intra-corrida (repetibilidade) do método de CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Dia 1 Área do pico (mAU) ^a	Dia 2 Área do pico (mAU) ^a	DPR (%) (intra- corrida)
100	4156109 \pm 32255	4241377 \pm 33913	0,78 – 0,80
100	4242768 \pm 33220	4348828 \pm 32127	0,74 – 0,78
100	4182125 \pm 14867	4247396 \pm 24804	0,36 – 0,58
100	4244253 \pm 12378	4367292 \pm 10912	0,25 – 0,29
100	4355246 \pm 28654	4247168 \pm 22558	0,53 – 0,66
100	4164493 \pm 22522	4345480 \pm 19932	0,46 – 0,54

^a Média \pm desvio padrão (n=3)

Tabela 6. Valores obtidos na avaliação da precisão inter-corrída (precisão intermediária) do método de CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Dia 1 Área do pico (mAU) ^a	Dia 2 Área do pico (mAU) ^a	DPR (%) (inter- corrída)
100	4156109 \pm 32255	4241377 \pm 33913	1,15
100	4242768 \pm 33220	4348828 \pm 32127	1,33
100	4182125 \pm 14867	4247396 \pm 24804	0,78
100	4244253 \pm 12378	4367292 \pm 10912	1,38
100	4355246 \pm 28654	4247168 \pm 22558	1,67
100	4164493 \pm 22522	4345480 \pm 19932	2,17

^a Média \pm desvio padrão (n=3)

Considerando-se que os DPR determinados indicaram valores inferiores a 5 % nos experimentos de precisão intra-corrída e inter-corrída, respectivamente, pode-se concluir que a metodologia desenvolvida para a quantificação do BZM apresenta repetibilidade e precisão intermediária dentro dos limites especificados nos códigos oficiais (ICH, 2005; BRASIL, 2003). Quando comparadas as áreas médias dos dias 1 e 2 através do teste “t” de student, verificou-se que não existe diferença significativa entre as médias dos dias ($p=0,0826$), ao nível 5% de significância. Verificou-se também a igualdade das variâncias dos dias 1 e 2 através da distribuição F de Snedecor ($p=0,6415$), ao nível 5% de significância.

5.3.2.4 Exatidão

A exatidão de um método corresponde à proximidade entre os resultados obtidos por um determinado método e o valor verdadeiro. A exatidão pode ser avaliada através de amostras contendo quantidades conhecidas da substância de referência podendo ser expressa como porcentagem de recuperação (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A avaliação da exatidão do método foi realizada por meio da avaliação da recuperação do BZM após contaminação da formulação SOL+TW com uma solução padrão do fármaco em três níveis diferentes. Os resultados de recuperação estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de recuperação do benzoilmetronidazol após contaminação da nanoemulsão branca SOL+TW.

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL) ^a	Recuperação (%)	DPR (%)
	80	80,6 ± 1,91	99,79	2,37
Nanoemulsão branca	100	100,5 ± 2,65	99,50	2,64
	120	120,2 ± 3,60	99,19	3,00

^a Média ± desvio padrão (n=3)

A Tabela 7 apresenta resultados obtidos na avaliação da exatidão do método. Os valores de recuperação obtidos variaram entre 99,19 e 99,79%, satisfazendo os critérios de aceitação do estudo. Assim, os resultados obtidos demonstraram que o método é exato, de acordo com o preconizado (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

5.3.2.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio da alteração do fluxo da fase móvel, da utilização de diferentes colunas cromatográficas e pela alteração da proporção metanol/água da fase móvel. A Tabela 8 apresenta os valores de concentração de BZM encontrados, quando as nanoemulsões foram expostas a diferentes condições de análise.

Tabela 8: Parâmetros analíticos e valores experimentais obtidos na avaliação da robustez para a nanoemulsão de BZM.

Parâmetro analítico	Nanoemulsão com BZM	
		DPR (%)
Coluna cromatográfica	Teor experimental ($\mu\text{g/mL}$) ^a	
Kromazil Akzo Nobel	$96,43 \pm 1,57$	1,63
Phenomenex Luna	$95,86 \pm 1,75$	1,82
Fluxo da fase móvel 0,9mL/min	$96,20 \pm 0,22$	0,22
1,1mL/min	$95,76 \pm 0,07$	0,08
Concentração da fase móvel (metanol:água)		
45:55	$96,15 \pm 0,88$	0,91
55:45	$96,54 \pm 0,05$	0,05

^a Média \pm desvio padrão (n=3)

Conforme observado na Tabela 8, o método manteve-se robusto, indicando confiabilidade dos resultados. Isto pode ser observado pela determinação do teor de ativo entre 90 e 110% na formulação nanoemulsionada de BZM (BRASIL, 2003).

Pode-se afirmar pelos resultados obtidos que o método proposto para a validação da metodologia analítica nas nanoemulsões de BZM demonstrou ser econômico, sensível, preciso, reprodutível, robusto e linear na faixa de trabalho selecionada.

5.3.3 Determinação do teor de BZM nas nanoemulsões

Após a etapa de validação da metodologia analítica, o método foi aplicado para a determinação do teor do BZM nas formulações desenvolvidas. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Determinação do teor de BZM nas formulações SOL e SOL+TW.

Formulação	Teor (mg/mL) ^a	Teor (%) ^a
SOL	0,943 ± 2,23	94,34 ± 2,23
SOL+TW	0,969 ± 1,14	96,89 ± 1,14

^a Média ± desvio padrão (n=3)

Com base nos resultados apresentados na tabela acima, observa-se teores de BZM nas nanoemulsões superiores a 0,94mg/mL, sem diferenças significativas entre as formulações ($p=0,1373$) e também houve igualdade das variâncias ($p=0,6415$), ao nível 5% de significância em ambos os testes. Esses valores são próximos à concentração teórica de BZM (1mg/mL), a qual foi estimada a partir quantidade de fármaco inicialmente adicionada às formulações. A solubilidade do BZM em água a pH 6,8 foi relatada ser de 0,2 mg/mL (BEMPONG *et al.*, 2005). Considerando esse valor, pode-se constatar que a associação desse fármaco às nanoemulsões lipídicas levou a um aumento na concentração em cerca de 5 vezes em relação a sua solubilidade aquosa, podendo esse valor ser maior, uma vez que formulações com maiores quantidades iniciais de fármaco não foram testadas.

5.4 Preparação e caracterização do gel de hipromelose contendo as nanoemulsões

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), conhecida como hipromelose, é um éter propilenoglicólico da metilcelulose cuja estrutura é apresentada na Figura 27. A hipromelose é um polímero hidrofílico de baixa toxicidade, que apresenta elevada capacidade de intumescência e gelificação, as quais são vantajosamente utilizadas para modular a liberação de fármacos. As propriedades mucoadesivas da hipromelose permitem desenvolver formas farmacêuticas bioadesivas, evitando variações na quantidade absorvida de fármacos (DOW, 2005).

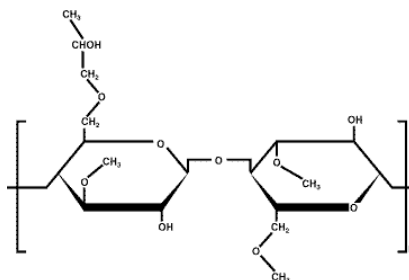


Figura 27: Estrutura química do monômero da HPMC (DOW, 2005).

Assim, objetivando obter preparações de viscosidade adequada, a hipromelose foi incorporada nas nanoemulsões brancas e contendo BZM, na concentração de 4%. Em todas as formulações não foram observadas diferenças quanto aos aspectos macroscópicos, ou seja, em todas as formulações as nanoemulsões se apresentaram na forma de um gel límpido, inodoro, homogêneo, com consistência e de fácil espalhabilidade. A Tabela 10 apresenta os valores de pH e viscosidade dos hidrogéis contendo as nanoemulsões brancas e com BZM.

Tabela 10: Valores de pH e viscosidade dos hidrogéis contendo as nanoemulsões SOL e SOL+TW brancas e com BZM.

Formulação		pH ^a	Viscosidade (cP) ^a
SOL	brancas	7,10 ± 0,18	76,43 ± 0,91
	BZM	6,98 ± 0,07	76,53 ± 1,43
SOL + TW	brancas	6,93 ± 0,09	74,30 ± 1,80
	BZM	6,95 ± 0,12	76,87 ± 1,25

^a Média ± desvio padrão (n=3)

Os valores de pH das formulações SOL e SOL+TW brancas e contendo BZM permaneceram próximos da neutralidade após incorporação da hipromelose. Esses valores de pH são compatíveis para a aplicação das formulações na mucosa vaginal (MIJAC *et al.*, 2006).

A presença das nanoemulsões contendo BZM não conduziu a alterações nos valores de viscosidade do gel. Os resultados indicaram

que as dispersões coloidais lipídicas obtidas neste estudo podem potencialmente ser exploradas como carreadores para administração tópica do BZM, atuando como um reservatório de fármaco após aplicação do gel sobre a mucosa vaginal.

5.5 Estudo de liberação *in vitro*

A utilização dos ensaios de liberação de fármacos *in vitro* tem assumido importância crescente, uma vez que constitui uma das metodologias de suporte ao desenvolvimento galênico, além de permitir o controle da produção e do produto acabado e validar alterações efetuadas no produto, após comercialização, bem como modificações introduzidas durante os processos de aumento de escala de produção. Os estudos de liberação são igualmente de fundamental importância para determinação do comportamento do fármaco em relação ao veículo e ao sistema no qual se encontra incorporado, permitindo verificar, inclusive, a existência de interação entre o ativo e os componentes da formulação (SUPAC-SS, 1997).

O perfil de liberação *in vitro* do BZM a partir dos géis contendo as nanoemulsões SOL e SOL+TW foi avaliado em células de difusão tipo Franz, empregando membranas sintéticas de acetato de celulose. Tais membranas têm sido recomendadas pela FDA para estudos de liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas semissólidas, por atender às exigências de não reagir com a formulação ou o meio receptor, serem permeáveis ao fármaco e não serem determinantes da taxa de liberação (SUPAC-SS, 1997). É conhecido que a seleção do meio receptor é crucial nesses estudos, uma vez que a liberação do fármaco está condicionada à solubilidade do mesmo no meio. Assim, é necessário garantir a manutenção de condições *sink* durante todo o estudo. Nesse estudo, uma mistura de etanol:água (60:40, v/v) foi selecionada como meio receptor. A solubilidade do BZM nessa solução foi superior a 2 mg mL^{-1} . A liberação do BZM a partir dos hidrogéis foi comparada àquela proporcionada pela preparação comercial de benzoilmetronidazol, em creme de uso vaginal, mas com a aplicação da mesma quantidade de fármaco na membrana para as três formulações. Considerando que a quantidade aplicada de BZM no compartimento doador foi de $500 \text{ } \mu\text{g}$, a concentração máxima de fármaco após 100% liberação seria cerca de $72 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, ou cerca de 3,55% em relação à solubilidade estimada e, portanto, condições perfeitamente *sink* foram

alcançadas. Os perfis de liberação do BZM a partir das formulações estão ilustrados na Figura 28. Os parâmetros de liberação, calculados após análise da regressão linear da porção ascendente dos perfis de liberação são mostrados na Tabela 11.

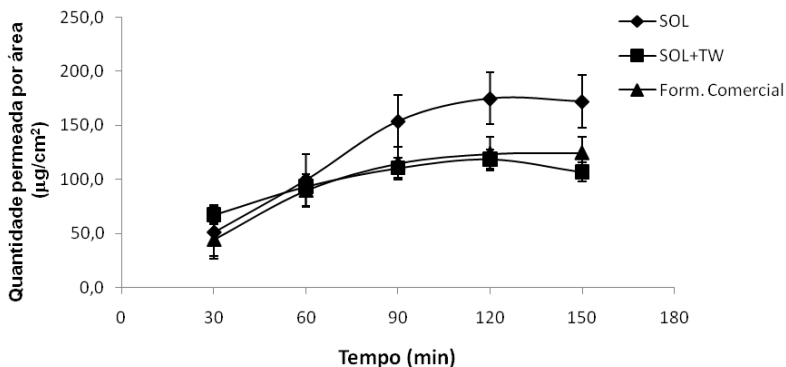


Figura 28: Perfil de liberação do BZM a partir dos hidrogéis contendo as nanoemulsões e da formulação comercial.

Tabela 11: Parâmetros de liberação obtidos após análise da regressão linear da porção ascendente dos perfis de liberação

	J ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) ^a	R ²	Kp ($\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$)
SOL	1,419 ± 0,27	0,9714	2,84 x 10 ⁻³
SOL +TW	0,523 ± 0,16	0,9474	1,05 x 10 ⁻³
Form. Comercial	0,878 ± 0,12	0,9120	1,76 x 10 ⁻³

^a Média ± desvio padrão (n=3)

Como pode ser observado na Figura 28, a liberação do BZM a partir do hidrogel contendo a nanoemulsão SOL+TW e da formulação comercial mostraram ser similares, entretanto, a liberação foi maior quando o hidrogel contendo a nanoemulsão SOL foi testado. Tanto os valores de Fluxo (J) como de coeficiente de permeabilidade aumentaram na seguinte ordem: SOL > Form. Comercial > SOL+TW. O coeficiente de permeabilidade do BZM a partir da nanoemulsão SOL foi 2,35 e 1,52 maior que aqueles obtidos para a nanoemulsão SOL+TW e para a

formulação comercial, respectivamente. O teste estatístico ANOVA (teste de Tukey) foi realizado para comparação dos fluxos obtidos. Foi detectada diferença estatística entre os hidrogéis SOL e SOL+TW e a formulação comercial ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) ($p = 0,0021$, $p = 0,0179$, respectivamente) mas não houve diferença estatística entre o hidrogel SOL+TW e a formulação comercial ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) ($p = 0,1432$)

De um modo geral, formas farmacêuticas semi-sólidas são formulações complexas, e suas propriedades físico-químicas, de liberação e de penetração dependem de vários fatores, entre os quais a granulometria das partículas dispersas, a tensão interfacial entre as fases, do coeficiente de partição do fármaco entre as fases e das características reológicas do produto (SUPAC-SS, 1997). No entanto, os valores de fluxo obtidos para liberação de BZM a partir da nanoemulsões e da formulação comercial através de membrana sintética de acetato de celulose permitem algumas conclusões úteis na avaliação dessas formulações. A formulação SOL possui diâmetro de gotícula bem inferior em relação às demais, fato que favoreceu uma taxa maior de liberação devido ao aumento da superfície de contato dessa forma farmacêutica. Quanto à formulação comercial, a maior taxa de liberação do BZM em relação à nanoemulsão SOL+TW pode ser atribuída às diferenças na composição da formulação, cujos componentes podem ter atuado como promotores na difusão do BZM através da membrana, facilitando sua liberação.

6 CONCLUSÕES

- No estudo de solubilidade do fármaco em diferentes óleos, o óleo de oliva demonstrou maior capacidade de solubilizar o BZM, sendo selecionado para a preparação das nanoemulsões.
- A preparação das nanoemulsões contendo benzoilmetronidazol pelo método de emulsificação espontânea demonstrou-se viável e de simples execução. Os dois sistemas surfactantes empregados, SOL e SOL + TW permitiram a obtenção de dispersões coloidais com aspecto translúcido à leitoso e tamanho de gotícula nanométrico. O menor tamanho de gota foi obtido quando somente o Solutol HS 15 foi empregado como surfactante da fase aquosa.
- As formulações estudadas (SOL e SOL+TW) apresentaram potencial zeta negativo, provavelmente devido à presença da lecitina na interface das gotículas. Esses valores foram considerados baixos, devido ao mascaramento das cargas negativas da lecitina, proporcionado pela presença do surfactante não iônico na superfície das gotículas. Entretanto, um efeito de estabilização estérica possivelmente ocorreu, evitando a coalescência das gotas da emulsão.
- A metodologia de CLAE para quantificação do benzoilmetronidazol nas nanoemulsões mostrou ser específica, linear, precisa, exata e robusta. O teor de fármaco nas nanoemulsões foi de 0,943 e 0,969 mg/mL, para as nanoemulsões SOL e SOL+TW, respectivamente. A incorporação do fármaco inicialmente adicionado foi próxima a 100%. Um aumento de cerca de 5 vezes na concentração do BZM foi obtida após nanoencapsulação, em relação a sua solubilidade em água.
- Estudos de liberação *in vitro*, usando células de difusão tipo Franz e membranas sintéticas de acetato de celulose como modelo de membrana, evidenciaram a mais rápida liberação do

fármaco quando a formulação SOL foi testada, seguido da formulação comercial e da formulação SOL+TW. Esse comportamento pode ser atribuído ao menor diâmetro de gotícula da nanoemulsão.

- O conjunto dos resultados obtidos demonstrou que a composição da formulação afeta não somente as propriedades físico-químicas das nanoemulsões, mas igualmente o perfil de liberação *in vitro* do fármaco. O tamanho reduzido da gota e o elevado grau de dispersibilidade da preparação permitem o aumento da superfície de contato dessa nova forma farmacêutica e o aumento da difusão do fármaco. Esses resultados preliminares realizados *in vitro* indicam que seria possível haver melhoria da biodisponibilidade do BZM através da utilização da nanoemulsão SOL na forma de hidrogel.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, J. S.; JEZUR, L.; FONTANA, M. C.; PAESE, K.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R. C. R. Oil-Based Nanoparticles Containing Alternative Vegetable Oils (Grape Seed Oil and Almond Kernel Oil): Preparation and Characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, p.165-72, 2009.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, E. F.; KOESTER, L. S. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, p.780-788, 2008.

ANTON, N.; BENOIT, JP.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.

ANTON, N.; BENOIT, JP.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates — A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p.185–199, 2008.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p.142–147, 2009.

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

ASLANI, P.; KENNEDY, R. A. Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. **Journal of Controlled Release**, v. 42, p. 75-82, 1996.

BABY, A. R.; SANTORO, D. M.; VELASCO, M. V. R.; SERRA, C. H. R. Emulsified systems based on glyceryl monostearate and potassium cetylphosphate: Scale-up and characterization of physical properties. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 361, p.99–103, 2008.

BARTHOLOMEU, V. S.; MOURA, M. J.; PETERLINI, M. A. S.; PEDREIRA, M. L. G. Uso do alginato de cálcio e triglicérides de cadeia média em lesão ulcerativa na região da artéria radial direita de um recém nascido – relato de experiência. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 13, p. 119-121, 2000.

BEMPONG, D. K.; MANNING, R. G.; MIRZA, T.; BHATTACHARYYA, L. A stability-indicating HPLC assay for metronidazole benzoate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 776–780, 2005.

BILLANY, G. Suspensões e Emulsões. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.23, p. 353-356.

BLOCK, L. H. Scale up of liquid and semisolid manufacturing processes. **Pharmaceutical Technology: Scaling up manufacturing**, S26-S33, 2005.

BLOUZ, L.; CHARCOSSET, C.; SFARB, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 124–131, 2006.

BOLDRINI, N. A. T. A abordagem da Neoplasia Intraepitelial Vaginal. A importância do exame da vagina. **Associação Brasileira de Genitoscopia**, 2009. Disponível em: <http://www.abgrj.org.br/sys/images/stories/pdf/neideboldrini_ex_vagina_tixiv_ago09.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2010.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; FESSI, H.; CHEVALIER, Y.; BONNET, I.; PERRIER, E. Simultaneous emulsification and interfacial polycondensation for the preparation of colloidal suspensions of

nanocapsules. **Materials Science and Engineering**, C 26, p.472 – 480, 2006.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada n. 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. In: Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Bulário Eletrônico. Bula do medicamento novo Flagyl (Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda). 2010. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/default.asp>>. Acesso em: 2 jul. 2010.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman & Gilman: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, p. 825, 2005.

CALIXTO, J. B. O desenvolvimento de medicamentos no Brasil. **Portal Inovação**, 2008. Disponível em: <<http://www.protec.org.br/noticias.asp?cod=2363>>. Acesso em: 20 jul. 2010.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA, JR.J.M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008. Suplemento 1.

CARLUCCI, A. M.; BREGNI, C. Productos Nanotecnológicos de Aplicación en Farmacoterapia. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 03, p.470-477, 2009.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.107, p. 125–155, 2004.

CLARKE, J.G.; PEIPERT, J. F.; HILLIER, S. L.; HEBER, W.; BOARDMAN, L.; MOENCH, T. R.; MAYER, K. Microflora changes with the use of a vaginal microbicide. **Sexually Transmitted Diseases**, v.29, p.288-93, 2002.

COLPISTATIN: benzoilmetronidazol, nistatina e cloreto de benzalcônio. São Paulo: Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., 2010. Bula de remédio.

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

CUNHA JÚNIOR, A. S. C.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p.385-391, 2003.

DATE, A., DESAI, N., DIXIT, R., NAGARSENKER, M. Self-nanoemulsifying Drug Delivery Systems: Formulation Insights, Applications and Advances. **Nanomedicine**, v. 5, p.1595-1616, 2010.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 2547–2565, 2007.

DIEMBECK, W.; BECK, H.; BENECH-KIEFFER, F.; COURTELLEMONT, P.; DUPUIS, J.; LOVELL, W.; PAYE, M.; SPENGLER, J.; STEILING, W. Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 191-205, 1999.

DORA, C. L.; SILVA, L. F. C.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A. S.; LEMOS-SENNA, E. Formulation Study of Quercetin-Loaded Lipid-Based Nanocarriers Obtained by Hot Solvent Diffusion Method. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p. 289-96, 2011.

DOW CHEMICAL COMPANY. Methocel Cellulose Ethers. 2005. Disponível em: <

http://www.dow.com/PublishedLiterature/dh_0050/0901b80380050865.pdf?filepath=amerchol/pdfs/noreg/324-00180.pdf&fromPage=GetDoc. Acesso em: 16 jan. 2011.

DURAN, N.; MARCATO, P. D.; TEIXEIRA, Z. Avanços da Nanotecnologia Farmacêutica 1-2. Instituto de Química – UNICAMP, 2008. Notas de Aula. Disponível em: <www.nanobiotec.iqm.unicamp.br>. Acesso em: 22 jan. 2011.

EMULSIFLEX C-3 AVESTIN. Disponível em: <<http://www.avestin.com/English/c3page.html>>. Acesso em: 14 mar. 2011.

ESCHENBACH, D.A.; THWIN, S. S.; PATTON, D. L.; HOOTON, T. M.; STAPLETON, A. E.; AGNEW, K.; WINTER, C.; MEIER, A.; STAMM, W. E. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, p.901-907, 2000.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 5.ed. Strasbourg: Council of Europe, v. 1, p.2038-2039, 2005.

FALCÃO, P.G.C.B.; SANTOS, T.S.; AVELAR, R.L.; ANTUNES, A.A.; PITA NETO, I.C.; DOURADO, E. Síndrome de Stevens-Johnson associada ao uso de antimicrobiano. **RGO**, v. 56, n.3, p. 337-340, 2008.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 4.ed. São Paulo: Andrei, 2003.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHMLE, A. Nano-emulsions formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.

FLAGYL GINECOLÓGICO: metronidazol. São Paulo: Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, 2010. Bula de remédio.

FLORÊNCIO, R. V. S.; SELMO, S. M. S. Estudo comparativo de granulometria a laser para fins da reciclagem de resíduos de construção e demolição. **17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, p.2161-2172, 2006.

FONSECA, S. G. C. Cremes e géis. Farmacotécnica II. 2010. Disponível em: <http://www.farmacotecnica.ufc.br/arquivos/33.Cremes_Geis.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2011.

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

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

FRANGE, R.C.C.; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, p.263-271, 2009.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 558-66, 2004.

FUNDUEANU, G.; ESPOSITO, E.; MIHAI, D.; CARPOV, A. DESBRIERES, J.; RINAUDO, M.; NASTRUZI, C. Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 170, p.11–21, 1998.

GALLETI, S. R. **Introdução a microscopia eletrônica.** Instituto Biológico, São Paulo, v.65, n.1/2, p.33-35, jan./dez., 2003.

GALINDO-RODRÍGUEZ, S. A.; PUEL, F.; BRIANÇON, S.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p.357–367, 2005.

GARTI, N. Double emulsions: scope, limitations and new achievements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123-124, p. 233-246, 1997.

HAGER, W.D.; RAPP, R.P. Metronidazole. **Obstetrics & Gynecology Clinics of North America**, v.19, p.497-510, 1992.

HIELSHER, T. Ultrasonic production of nano-size dispersions and Emulsions. In: PROCEEDINGS OF EUROPEAN NANOSYSTEMS CONFERENCE ENS'05, Paris, France, december, 2005. 14-16 p.

HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 311-330, 1994.

HOELLER, S.; SPERGER, A.; VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, p.181-186, 2009.

ICH Steering Committee (2005) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva, Switzerland.

INSTRUTÉCNICA. Instrumentação para pesquisa e indústria. Disponível em: <
<http://www.instrutec.com.br/v2/produtos/particulas/Difracao.html>>.
Acesso em: 17 mar. 2011.

JAFARI, S. M.; HE, Y. BHANDARI, B. Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. **European Food Research and Technology**, v. 225, p.733-741, 2007.

JAIN, N. K. Pharmaceutical Nanotechnology. Dept. of Pharmaceutical Science, Dr. Hari Singh Gour University – Sagar, p.01-19, 2007.

JOSHI, M.; BHATTACHARYYA, A.; WAZED ALI, S. Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles. **Indian Journal of Fibre & Textile Research**, v. 33, p.304-317, 2008.

KALIL, J. Da pesquisa fundamental à pesquisa clínica: como dominar as rotas tecnológicas, criando medicamentos e gerando patentes. In: Rafael Guerra, **Buscando uma política de medicamentos para o Brasil**. São Paulo: Febráfarma, p. 22, 2007.

KELMANN, R. G. **Desenvolvimento de forma farmacêutica nanoemulsionada para administração intravenosa de carbamazepina**. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 2008/2009 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.77-98, 2002.

LAKSHMI, S. N.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v.32, p. 762-798, 2007.

LAMP, K.C.; FREEMAN, C.D.; KLUTMAN, N.E.; LACY, MK. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. **Clinical Pharmacokinetics**, v.36, p.353-73, 1999.

MARTINI, E. **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química**. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

PAPINI, C. J. **Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula**. Dissertação (Mestrado) - Área de Tecnologia Nuclear - Materiais, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2003.

LARA, V. C. D. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ácido retinóico para tratamento tópico da acne**. Dissertação (Mestrado) -

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

LEGRAND, P.; LESIEUR, S.; BOCHOT, A.; GREF, R.; RAATJES, W.; BARRATT, G.; VAUTHIER, C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 33–43, 2007.

LERTSUTTHIWONG, P.; NOOMUN, K.; JONGAROONNGAMSANG, N.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 209–214, 2008.

LIEDTKE, S.; WISSING, S.; MULLER, R.H.; MADER, K. Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, p.183–185, 2000.

LIMAYEM, B. I.; CHARCOSSET, C.; SFAR S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v.325, p. 124-131, 2006.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VI (2), p.01-37, 2009.

MARCHI, E. C. S. **Revisão de microscopia**. Disciplina DBI Anatomia vegetal, Universidade Federal de Lavras, Ministério da Educação e do Desporto
Departamento de Agricultura, Lavras, 2005.

MARQUES, I.; LOPES, C. M.; SOUTO, E. B. Novos sistemas terapêuticos nanotecnológicos. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v. 06, p.60-68, 2009.

MASON, T.G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical

properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p.R635–R666, 2006.

MCCATHIE, R. Vaginal discharge: common causes and management. **Current Obstetrics & Gynaecology**, v. 16, p. 211-217, 2006.

MERISKO-LIVERSIDGE, E. M.; LIVERSIDGE, G. G. Drug Nanoparticles: Formulating Poorly Water-Soluble Compounds. **Toxicologic Pathology**, v.36, p.43-48, 2008.

MERTINS, O.; SEBEN, M.; SCHNEIDER, P. H.; POHLMANN, A. R.; SILVEIRA, N.P. Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de ¹H e de ³¹P. **Química Nova**, v.31, p.1856-1859, 2008.

MICROFLUIDIZER® MICROFLUIDICS, UK. Disponível em: <<http://www.microfluidicscorp.com>>. Acesso em: 14 mar. 2011.

MICRONAL. Caracterização de tamanho de partículas a laser e o novo método de dispersão de pó seco. Disponível em: <<http://www.micronal.com.br/artigostecnicos/tamanhodeparticulas.htm>>. Acesso em: 20 mar. 2011.

MISHAL, A.; SOBER, D. Stability indicating reversed-phase liquid chromatographic determination of metronidazole benzoate and diloxanide furoate as bulk drug and in suspension dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, p.819–823, 2005.

MIJAC, V.D. DUKIC, S. V.; OPAVSKI, N. Z.; DUKIC, M. K.; RANIN, L. T. Hydrogen peroxide producing lactobacilli in women with vaginal infections. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.129, p.69-76, 2006.

MOEBUS, K. M.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Alginate–poloxamer microparticles for controlled drug delivery to mucosal tissue. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p.42–53, 2009.

MOINARD-CHÉCOT, D.; CHEVALIER, Y.; BRIANÇON, S.; BENEY, L.; FESSI, H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 317, p. 458–468, 2008.

MORA-HUERTAS, C. E; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.385, p. 113-142, 2010.

MORALES, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; GARCIA-CELMA, M. J.; SOLANS, Y.C. A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nanoemulsion formation. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 19, p.7196-7200, 2003.

NAIRA, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress In Polymer Science**, v. 32, p.762–798, 2007.

NICHOLS, W. K. Antiinfecciosos. In: GENNARO, A. R., Ed. Remington: **A ciência e a prática da farmácia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.87, p.1612-1613, 2004.

OUZINEB, K.; LORD, C.; LESAUZE, N.; GRAILLAT, C.; TANGUY, P. A.; MCKENNA, T. Homogenisation devices for the production of miniemulsions. **Chemical Engineering Science**, v.61, p. 2994–3000, 2006.

PAPINI, C. J. **Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula**. Dissertação (Mestrado) - Área de Tecnologia Nuclear - Materiais, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2003.

PAQUIM, A. M. C.; BRETT, A. M. O. Microscopia de Força Atômica de moléculas de DNA adsorvidas na superfície de HOPG. **Sociedade Portuguesa de Química**, v.94, p.58-68, 2004.

PARK, K.; LEE, M.; HWANG, K.; KIM, C. Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v.183, n.2, p.145-154, 1999.

PEIXOTO, F. C. **Avaliação da eficácia e tolerabilidade do uso de óvulos vaginais contendo metronidazol e nitrato de miconazol no tratamento de vaginites.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

PEY, C. M.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, p. 144 -150, 2006.

PRAÇA, F. S. G. **Liberção e permeação in vitro de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

PORRAS, M. C., SOLANS, C.; GONZÁLEZ, C.; MARTÍNEZ, A.; GUINART, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Studies of formation of W/O nanoemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 249, p.115–118, 2004.

POTENCIAL ZETA, ILUSTRAÇÃO. Disponível em: <
http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm
>. Acesso em: 15 mar. 2011.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; FESSI, H.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 143, p. 133-141, 1996.

RADTCHENKO, I.L.; SUKHORUKOV, G. B.; MOHWALD, H. Incorporation of macromolecules into polyelectrolyte micro and nanocapsules via surface controlled precipitation on colloidal particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 202, p. 127–133, 2002.

RODRIGUES, E. T. **Avaliação do efeito da isoflavona sobre o epitélio cérvico-vaginal e sintomas da menopausa**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

SADURNÍ, N.; SOLANS, C.; AZEMAR, N.; GARCÍA-CELMA, M. J. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 438-445, 2005.

SALAGER, J. L.; FORGIARINI A.; MARQUÉZ L.; PEÑA A.; PIZZINO A.; RODRIGUEZ M. P.; GONZÁLEZ M. R. Using emulsion inversion in industrial process. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 259, p. 108-109, 2004.

SCHAFFAZICK S. R.; GUTERRES S. S. Caracterização e estabilidade físicoquímica de sistemas poliméricos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p.726-737, 2003.

SCHWUGER, M.J.; SCHOMÄCKER, R. Microemulsions in Technical Processes. **Chemical Review**, v. 95, n. 4, p.849-864, 1995.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A Pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 01, p. 24-32, 2010.

SILVA, M.; COCENZA, D. S.; DE MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, v. 33, p.1868-1873, 2010.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R., DAMASCENO, B.P.G.L., MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações

transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p.125-131, 2010.

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

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

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 102 – 110, 2005.

SOLÉ, I.; MAESTRO, A.; PEY, C. M.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. Nano-emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, p. 138 -143, 2006.

SONNEVILLE-ABRUN, O.; SIMONNET, J. T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.108-109, p.145-149, 2004.

SONOPULS, BANDELIN ELETRONIC. Disponível em: <<http://www.bandelin.com/english/sonopuls.html>>. Acesso em: 14 mar. 2011.

SOPPIMATHA, K. S.; AMINABHAVIA, T. M.; KULKARNIA, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 01–20, 2001.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

THAYSEN, G. Applications of Solutol HS 15. In: BASF Aktiengesellschaft, Fine Chemicals, Product Development Pharma, 67056 Ludwigshafen, Germany. Disponível em: <http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/Pharma/info/BASF/exact/solutol_hs_15>. Acesso em: 03 out. 2010.

TRISSEL, L. A. Trissel's - Stability of compounded formulations, 2 ed. Washington: American Pharmaceutical Association, p. 250-253, 2000.

GUIDANCE FOR INDUSTRY – Nonsterile Semisolid Dosage Forms – Scale-Up And Post Approval Changes: chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. Rockville: Center Of Drug Evaluation And Research, 1997. 26p.

VIDOTTI, C.C.F.; CASTRO, L.L.C. Fármacos novos e necessidades do Sistema Único de Saúde no Brasil. **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v. 10, n. 2, 2009, p. 7-11.

VILLAFUERTE-ROBLES, L. Nanotecnología Farmacéutica. **Revista Digital Razon y Palabra**, p. 01-20, [2008].

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v.26, p.1025-1058, 2009.

VU, N.T.; ALOUMANIS, V.; BEN, M. J.; KUPIEC, T. C.; PATTERSON, E. K.; RADKE, J.; ERICKSON, M. A.; SCHNEIDER, G. Stability of Metronidazole Benzoate in SyrSpend SF One-Step Suspension System. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v.12, n. 6, p.558-561, 2008.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, p.95-101, 2008.

ZILI, Z.; SOUAD, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 261-267, 2005.

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