

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**SISTEMAS MICROEMULSIONADOS COMO CARREADOR LIPÍDICO PARA
FÁRMACOS INSOLÚVEIS**

BOLÍVAR PONCIANO GOULART DE LIMA DAMASCENO

NATAL - RN

2010

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**SISTEMA MICROEMULSIONADO COMO CARREADOR LIPÍDICO PARA
FÁRMACOS INSOLÚVEIS**

BOLÍVAR PONCIANO GOULART DE LIMA DAMASCENO

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

NATAL - RN

2010

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Profa. Dra. Técia Maria de Oliveira Maranhão

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**SISTEMA MICROEMULSIONADO COMO CARREADOR LIPÍDICO PARA
FÁRMACOS INSOLÚVEIS**

Banca examinadora:

Presidente da banca:

Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito (UFRN)

Membros externos

Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard (UFMG)

Prof. Dr. Roberto José da Silva Badaró (UFBA)

Membros internos

Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa (UFRN)

Profa. Dra. Técia Maria de Oliveira Maranhão (UFRN)

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra ao meu pai, João Damasceno Neto, que sempre me mostrou que os estudos e a educação é a base para toda uma vida, despertando-me o desejo ao estudo e, conseqüentemente, ao ensino.

AGRADECIMENTOS

Ao professor doutor E. Sócrates Tabosa do Egito pela orientação científica, empenho, dedicação, amizade e competência profissional, qualidade estas demonstradas durante todo o nosso convívio.

Aos professores do curso de Farmácia da UFRN pela formação acadêmica durante o curso de graduação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCSa) da UFRN pela formação exercida durante o desenvolver deste doutorado.

À professora e colega de laboratório Ivonete Batista de Araújo pela ajuda constante e orientação acadêmica vivida durante os momentos de trabalho e lazer no Laboratório de Sistemas Dispersos (LaSiD).

Aos colegas professores, funcionários e alunos da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) pela parceria e compreensão na realização deste doutorado.

Aos meus colegas mestrandos e doutorandos Walteçá Louis Lima da Silveira, Miguel Adelino da Silva Filho, Lourena Mafra Veríssimo, Luciana Loffredo, Janus Pablo Fonseca de Macedo, Fábio Rocha Formiga, Amália Cíntia Meneses do Rego por todo o companheirismo e exemplo de espírito científico.

Aos meus colegas professores e doutores José Aleksandro da Silva, Elquio Eleamen Oliveira, Toshiyuki Nagashima Junior e Arnóbio Antônio da Silva Junior também pelo companheirismo e exemplo de espírito científico

A todos os alunos do LaSiD, em especial a Maria Clara de Araújo Silva, Laura da Fonseca Ferreira, Airanuédida Silva Soares, Fernanda do Couto Brasil, Larissa Bandeira Freire e Scheyla Daniela da Silva Siqueira pela ajuda constante durante o desenvolvimento deste doutorado.

Às funcionárias do PPGCSa, pela disponibilidade e colaboração.

A todos os professores do curso de Farmácia que abriram as portas dos seus laboratórios para a realização de algum experimento deste doutorado.

A todos os colegas de profissão que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

E todo o meu agradecimento à minha família composta pelos meus pais João Damasceno Neto e Lêda Maria de Lima Damasceno, irmãos, cunhados e sobrinho, Valentina Damasceno, Wladimir Damasceno, Ubiratan Damasceno, Felipe Cortez, Mônica Costa e Yuri Medeiros e, em especial, à minha esposa Liliane Rocha Nunes pelo amor, apoio e conforto durante todos os momentos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de microemulsão	5
Figura 2: Classificação de Winsor	6
Figura 3: Estruturas químicas das estatinas.....	8
Figura 4: Biossíntese do colesterol	10
Figura 5: Estrutura química da anfotericina B	11
Figura 6: Modelo estrutural do canal AmB-esterol de membrana	13

LISTA DE ABREVIATURAS

AmB	Anfotericina B
ABCD	Anfotericina B incorporada em dispersões coloidais
ABLCL	Anfotericina B incorporada em complexos lipídicos
AmB-ME	Anfotericina B incorporada na microemulsão
A/O	Água em óleo
DMSO	Dimetilsufóxido
EP	Efeitos pleiotrópicos
G	Energia livre de Gibbs
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A
K ⁺	Potássio
LASID	Laboratório de Sistemas Dispersos
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LFA-1	Função linfocitária 1
ME	Microemulsão
O/A	Óleo em água
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Potencial da constante de ionização
SIV	Sinvastatina
SIV-ME	Sinvastatina incorporada na microemulsão
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Lipoproteína de muito alta densidade

RESUMO

Inúmeros produtos farmacêuticos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos com a finalidade de incrementar o tratamento de doenças pelo aumento da eficácia de fármacos. Grande parte destes novos produtos está baseada nos novos sistemas transportadores de fármacos. Entre eles destacam-se as microemulsões, que foram primeiramente estudadas em 1943 por Hoar e Schulman. Microemulsão pode ser definida como um sistema termodinamicamente estável, isotrópico, translúcido e transparente de dois líquidos imiscíveis estabilizados por um filme de tensoativos localizados na interface óleo/água. O objetivo deste trabalho foi incorporar anfotericina B e sinvastatina em um sistema microemulsionado e analisar suas propriedades físico-químicas e suas ações terapêuticas após a incorporação destes fármacos ao sistema. Alguns resultados muito promissores foram alcançados como a redução da toxicidade e a permanência da eficácia da anfotericina B incorporada em uma microemulsão durante o estudo farmacotológico *in vitro*. Quanto à incorporação da sinvastatina na microemulsão, foi constatada uma melhora significativa no potencial antiinflamatório e antiinfecioso (efeitos pleiotrópicos da sinvastatina) em feridas tratadas com esse sistema. Portanto, podemos concluir que a incorporação desses fármacos em sistemas microemulsionados faz das microemulsões uma nova e promissora apresentação farmacêutica, habilitando-a a futuros ensaios com a finalidade de torná-los disponíveis no mercado farmacêutico.

DESCRITORES: anfotericina B, efeitos pleiotrópicos, farmacotoxicidade, microemulsão, novos sistemas transportadores de fármacos, sinvastatina.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 MICROEMULSÃO	4
2.2 SINVASTATINA	7
2.3 ANFOTERICINA B	10
3. ANEXAÇÃO DE ARTIGOS	15
3.1 AMPHOTERICIN B MICROEMULSION: A NEW APPROACH TO TARGETING FUNGAL CELLS	15
3.2 NANOSIZED CARRIER FOR SIMVASTATIN HIGHLIGHTS ITS PLEIOTROPIC EFFECTS	48
3.3 MICROEMULSÃO: UM PROMISSOR CARREADOR PARA MOLÉCULAS INSOLÚVEIS	68
4. COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES – VER COMENTÁRIOS NA TESE DAS MINHAS CORREÇÕES!!!	98
5. APÊNDICE	102
5.1 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS	102
5.1.1 SIMVASTATIN IMPROVES THE HEALING OF INFECTED SKIN WOUNDS OF RATS	102
5.1.2 USO DE DIAGRAMAS DE FASE PSEUDOTERNÁRIOS COMO FERRAMENTA DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES TRANSDÉRMICAS	110
5.1.3 PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND DEVELOPMENT OF A MICROEMULSION SYSTEM FOR TRANSDERMAL USE	116
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
7. ABSTRACT	130

1. INTRODUÇÃO

Recentes avanços na tecnologia farmacêutica têm produzido sofisticados sistemas transportadores de fármacos. Esta área de pesquisa está em plena expansão e a grande maioria dos trabalhos investiga uma melhora na liberação, biodistribuição e/ou dissolução dos fármacos ^(1, 2).

Na atualidade, os fármacos são veiculados em formas farmacêuticas ditas convencionais e geralmente não conseguem atingir concentrações apreciáveis no tecido alvo do organismo porque, entre o local de aplicação e o alvo onde deve exercer seu efeito farmacológico, interpõem-se uma série de barreiras biológicas, as quais expõem os tecidos normais do organismo aos efeitos potencialmente tóxicos do fármaco ⁽³⁾.

Nos últimos anos, o interesse na aplicação das microemulsões como sistemas de liberação de fármacos vem ganhando mais atenção por parte dos laboratórios industriais e dos pesquisadores acadêmicos. No campo farmacêutico, diversos estudos têm sido encontrados na literatura descrevendo o uso deste sistema nas mais variadas vias de administração. Entre elas podemos citar a oral, parenteral, ocular, tópica e intranasal ⁽⁴⁻⁶⁾.

Microemulsão (ME) é um sistema termodinamicamente estável e transparente formado a partir da mistura de dois líquidos imiscíveis (água e óleo) estabilizado por um filme interfacial de tensoativos ^(7, 8). Elas podem ser classificadas em três tipos: O/A, bicontínuas e A/O. Para o estudo das MEs é necessário conhecer como elas podem ser formadas. Há três teorias para a sua formação: a teoria da solubilização, a da tensão interfacial e a termodinâmica ⁽⁹⁾. A utilização de ME neste estudo visa formar um sistema que possa modificar a via de administração da sinvastatina (SIV) e também controlar a liberação da anfotericina B (AmB) na forma monomérica, com a finalidade de reduzir a sua toxicidade.

A SIV é uma estatina natural que tem como mecanismo de ação impedir a síntese do colesterol por inibição da HMG-CoA redutase. Com isso, contribuem para a regressão e redução dos eventos coronários agudos em pacientes que apresentam alguma doença coronária ou vascular periférica, para a

redução de quadros de isquemia do miocárdio e incidência de infarto, com consequente diminuição do índice de mortalidade total causado por doenças cardiovasculares ⁽¹⁰⁾. As estatinas são consideradas os fármacos do século XXI, por serem os fármacos mais prescritos no mundo atualmente ⁽¹¹⁾. Para se ter uma ideia, em 2002, a atorvastatina foi o fármaco mais vendido no mundo rendendo para o fabricante Pfizer cerca de US\$ 8 bilhões ⁽¹²⁾.

Além dos efeitos relacionados com a hipercolesterolemia, a SIV e outras estatinas apresentam os chamados efeitos pleiotrópicos, que são os efeitos independentes da redução do colesterol e estão relacionados à melhoria da função endotelial, diminuição do estresse oxidativo e a benéficos efeitos extra-hepáticos no sistema imune, sistema nervoso e ósseo ⁽¹³⁾. Em um prévio estudo, nosso grupo de pesquisa observou que a incorporação da SIV em uma ME promoveu uma significativa redução do processo inflamatório no tratamento de sepse abdominal e feridas superficiais infectadas em ratos Wistar ^(14, 15). Por isso, iniciamos um estudo mais detalhado no desenvolvimento de uma ME com a SIV incorporada na fase dispersa (SIV-ME).

A AmB é um fármaco já largamente estudado no nosso grupo de pesquisa. Ele é um antifúngico poliênico obtido da cultura de *Streptomyces nodosus*. A AmB foi descoberta por Gold e colaboradores nos anos 50, porém ela continua sendo o fármaco de escolha para o tratamento de muitas infecções fúngicas sistêmicas em pacientes imunocomprometidos ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Este fármaco é frequentemente utilizado na terapia empírica em pacientes neutropênicos com febre de origem desconhecida ^(19, 20). Porém, devido a grande quantidade de reações adversas, principalmente nefrotoxicidade, o seu uso clínico é bastante limitado ^(21, 22). Essa limitação desperta os pesquisadores a estudar a redução destes efeitos adversos e uma alternativa a estes efeitos é a incorporação da AmB em estruturas lipídicas como os lipossomas, emulsões, complexação com colesterol e mais recentemente em microemulsões ^(23, 24).

A toxicidade da AmB está relacionada ao seu estado conformacional. Na forma micelar (forma farmacêutica tradicional da AmB) ela pode apresentar-se na forma de monômeros, dímeros e agregados. A forma de agregado é a que tem uma maior afinidade para os esteróis das células humanas,

causando efeitos tóxicos ^(25, 26). A incorporação da AmB na ME é realizada com o intuito de incorporá-la apenas na forma de monômeros no interior das gotículas de ME. E, conseqüentemente, reduzir a toxicidade deste fármaco.

O objetivo geral deste trabalho foi a incorporação de anfotericina B e sinvastatina a um sistema microemulsionado e analisar suas propriedades físico-químicas e suas ações quando incorporadas a este sistema

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROEMULSÃO

Microemulsão (ME) é definida como um sistema termodinamicamente estável e isotropicamente translúcido de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água. Para a formação de uma ME é necessária a utilização de um a três tensoativos que irão reduzir a tensão interfacial entre o óleo e a água ^(7, 8). O tamanho da gotícula de ME é muito reduzido (10 nm), aproximadamente 100 vezes menor do que o tamanho médio das gotículas de emulsões ⁽²⁷⁻²⁹⁾. Por esta razão, MEs são relativamente translúcidas e o que explica a limpidez do sistema é o fato do diâmetro médio das gotículas ser menor do que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz incidente. Com isso, as mesmas não espalham a luz e o sistema se apresenta transparente ^(29, 30).

Para a formação de uma ME existem três teorias: a teoria da solubilização, a da tensão interfacial e a termodinâmica. A teoria da solubilização diz que uma ME se forma por um simples intumescimento de micelas no qual a água é solubilizada nas micelas reversas ou o óleo é solubilizado em micelas normais. A teoria da tensão interfacial (γ_i) diz que para a formação de uma ME é necessária uma γ_i muito baixa, com isso, a absorção do tensoativo na área interfacial causa uma pressão bidimensional (π) que diminui a pressão interfacial. Conseqüentemente, com o aumento da área interfacial, por um aumento de π , a γ_i se aproxima de zero, favorecendo a dispersão de uma fase na outra para a formação da ME (Equação 1). A teoria termodinâmica diz que a energia livre de Gibbs (G) deve se tornar negativa para a formação espontânea de uma ME termodinamicamente estável. Como a γ_i tem uma tendência para se aproximar de zero, a variação de energia livre também tende a zero e, com isso, o sistema fica termodinamicamente estável ($\Delta G \rightarrow 0$). Quando a γ_i for negativo, a ΔG será < 0 e a microemulsificação será espontânea (Equação 2) ⁽⁹⁾.

$$\gamma_i = (\gamma_{o/a})_a - \pi \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\Delta G = \gamma_i \times \Delta S \quad (\text{Eq. 2})$$

As MEs podem ser divididas em três tipos (Figura 1): (1) óleo em água (O/A), (2) água em óleo (A/O), e (3) bicontínuas ⁽⁹⁾. Quando reduzidas gotículas esféricas de óleo estão dispersas (fase oleosa interna ou descontínua) em uma fase externa aquosa (fase aquosa dispersante ou contínua) temos as MEs O/A. Inversamente, quando reduzidas gotículas esféricas de água estão dispersas (fase aquosa interna ou descontínua) em uma fase externa oleosa (fase oleosa dispersante ou contínua) temos as MEs A/O. As MEs bicontínuas estão entre estes dois tipos de MEs e sua formação pode ser observada quando se aumenta gradativamente, por titulação, o volume da fase interna dos sistemas; durante a migração O/A para A/O ou vice-versa; e quando o volume das duas fases está próximo ^(9, 31). Portanto, a terminologia O/A e A/O comumente utilizada para as emulsões, nem sempre é aplicada às MEs.



Figura 1: Tipos de microemulsões.

Winsor (1948) criou um método semiquantitativo de mensurar o equilíbrio entre as características hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo em um sistema particular (Razão de Winsor) ⁽³²⁾. Esta razão pode ser modificada pela variação na estrutura do tensoativo e da temperatura do sistema ou pela adição de cotensoativos. Deste modo, os sistemas podem ser classificados baseados na

quantidade de fases formadas em virtude da quantidade de óleo e/ou água em excesso em quatro tipos: Winsor I, II, III e IV (Figura 2).

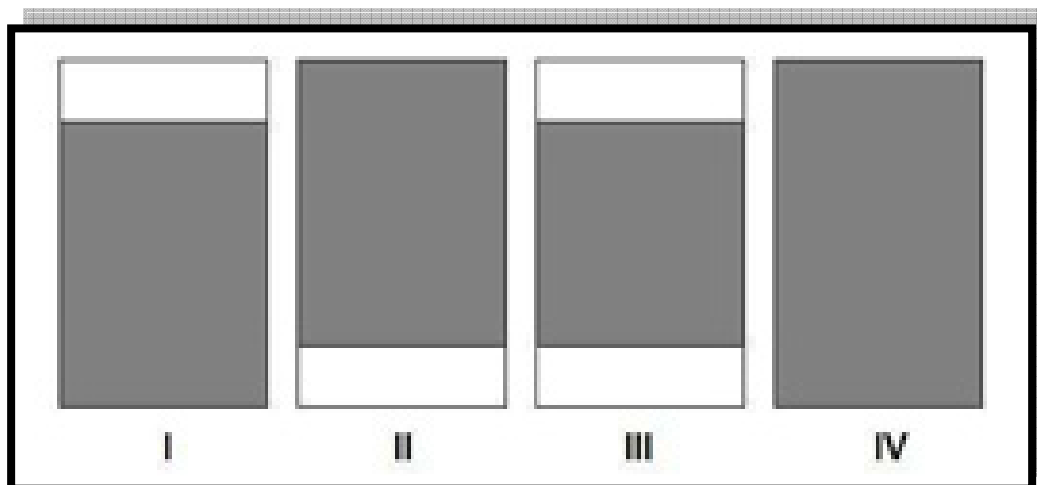


Figura 2: Classificação de Winsor.

Um sistema pode ser classificado em tipo Winsor I quando nem todo o óleo está em equilíbrio com o sistema microemulsionado, formando um sistema bifásico com um excesso de óleo na porção superior do sistema. O mesmo ocorre com a água no tipo Winsor II. Ela apresenta-se em excesso na porção inferior do sistema. O tipo Winsor III, tanto o óleo quanto a água estão em excesso, apresentando um sistema trifásico com excesso de óleo na porção superior e de água na inferior do sistema. O tipo Winsor IV ocorre quando todo o sistema está em equilíbrio e homogêneo (monofásico), não havendo excesso da fase oleosa e aquosa ⁽³²⁾.

A escolha dos tensoativos utilizados em MEs é um dos fatores primordiais no estudo do desenvolvimento destes sistemas para uso farmacêutico. É essencial que estes componentes sejam todos conhecidos e quimicamente puros. Lawrence (1996) diz que um composto farmacologicamente aceitável é descrito como um composto que já está em uso em alguma formulação farmacêutica e que seja isento de efeitos adversos e de toxicidade em humanos ⁽³³⁾. Os tensoativos utilizados em microemulsões farmacêuticas são os não-iônicos e os anfotéricos, pois eles apresentam baixa toxicidade às membranas e maior estabilidade ⁽³³⁾, baixa irritabilidade e promovem uma grande permeabilidade do fármaco pela pele ⁽⁸⁾. Os fosfolipídios constituem um grupo de lipídios com particular interesse na preparação de MEs devido ao seu

bicompartimento natural ⁽³⁴⁻³⁶⁾. Recentemente, diversos estudos têm usado lecitinas como tensoativos no preparo de MEs O/A. Adicionalmente, os álcoois de cadeia curta e as aminas, naturalmente empregadas como cotensoativos, não são mais utilizados. Como cotensoativos das formulações a base de lecitinas são utilizados os tensoativos não iônico, na tentativa de permitir a diluição das MEs, que é um pré-requisito para o uso farmacêutico ⁽³³⁾.

As MEs farmacêuticas apresentam uma grande variedade de vias de administração, entre elas podemos citar a oral, parenteral, ocular, tópica e intranasal ^(5, 6). Para a via oral, foi relatada uma melhora na biodisponibilidade da ciclosporina A, fármaco imunossupressor utilizado em doenças auto-imunes e em pacientes transplantados ⁽⁵⁾, e também da antraquinona, fármaco de baixa solubilidade em água, utilizado como laxante ⁽³⁷⁾. Com relação à via parenteral, alguns estudos utilizando a anfotericina B constataram uma redução da toxicidade deste fármaco quando incorporado em uma ME ^(23, 38, 39). Na via ocular, Fialho e Silva-Cunha (2004) constataram uma maior biodisponibilidade da dexametasona no humor aquoso quando incorporada em uma ME ⁽⁴⁰⁾. Para a via tópica, o uso de microemulsões permite, em razão da grande quantidade de tensoativos presentes em sua formulação, a interação com o extrato córneo onde a bicamada lipídica seria desestruturada e a permeabilidade dos fármacos facilitada ^(41, 42). Na via intranasal, o sumatriptano microemulsionado melhorou sua ação no combate a enxaqueca ⁽⁶⁾.

2.2 SINVASTATINA

A sinvastatina (SIV) pertence à classe de fármacos chamada de estatinas, que são os fármacos mais utilizados no tratamento de hiperlipidemias, com a intenção de reduzir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e os riscos de doença arterial coronariana. Hiperlipidemia é reconhecida como o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças nas artérias coronarianas e na progressão de lesões ateroscleróticas ^(10, 12).

As estatinas estão divididas, de acordo com a sua estrutura molecular, em dois grupos: tipo I e tipo II (Figura 3). As estatinas do tipo I (mevastatina, sinvastatina, lovastatina e pravastatina) foram originalmente isoladas a partir de certos fungos e representam a primeira geração destes

fármacos. As estatinas do tipo II (fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina e rosuvastatina) são completamente sintéticas e são caracterizadas pela presença de uma região hidrofóbica maior do que as do tipo I ^(11, 43). Quanto a sua função, elas diferem entre si em termos de potência, perfil farmacocinético, interação farmacológica e efeitos indesejados relacionados à miotoxicidade ⁽¹²⁾.

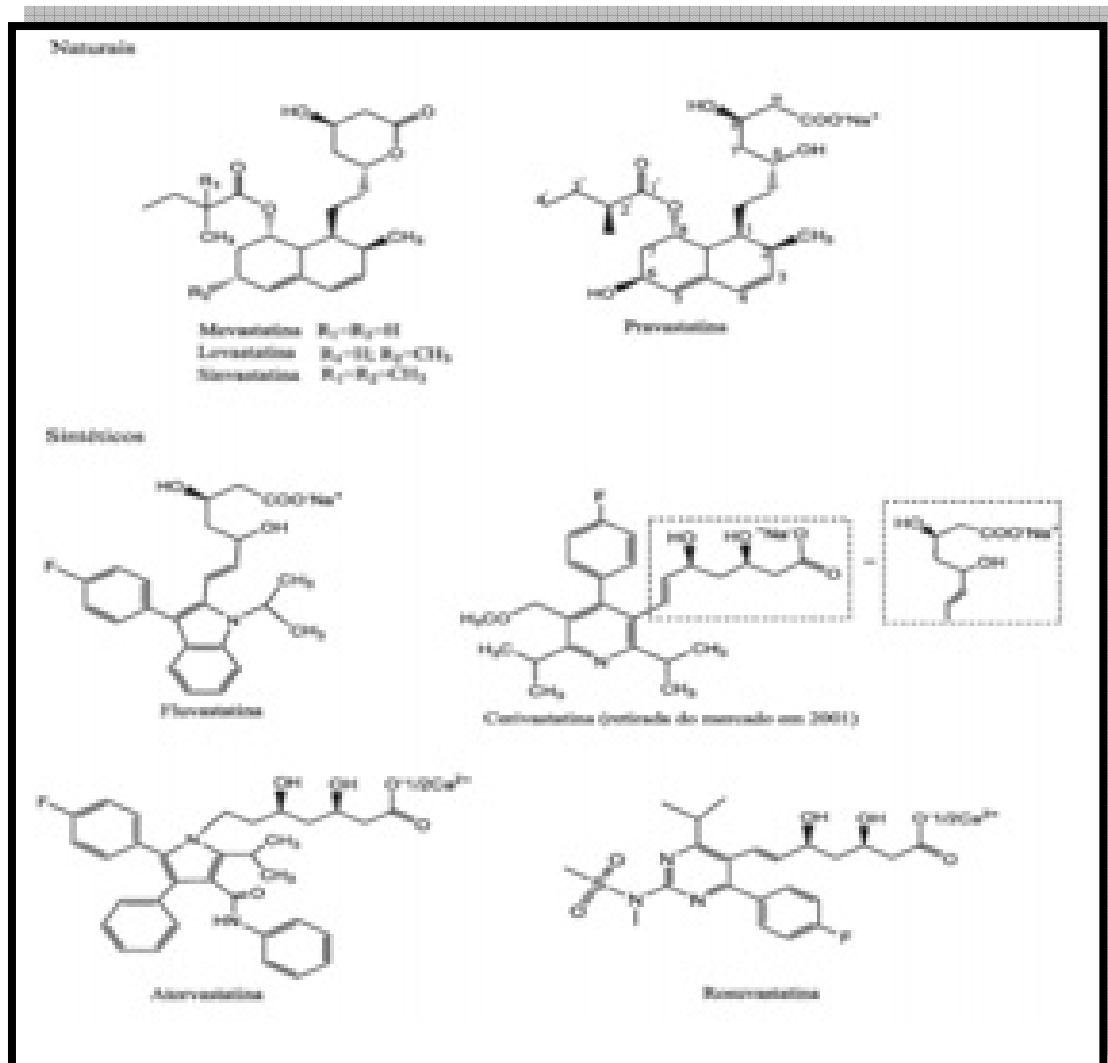


Figura 3: Estruturas químicas das estatinas (12).

A SIV ($C_{25}H_{38}O_5$ – massa molar 418,56 d) é um pó cristalino branco a esbranquiçado praticamente insolúvel em água com ponto de fusão de 135-138°C e esta propriedade impede o seu uso direto em um sistema de transporte de fármaco que tenha como base a água, pois a molécula não estará solúvel no seu interior (Kang ET AL, 2004). Ela é um pró-fármaco que apresenta em sua molécula um anel lactona que é transformado, após ingerido pelo paciente, em

sua forma biologicamente ativa (forma ácida aberta) ⁽⁴⁴⁾.

A SIV, como as outras estatinas, inibem a síntese do colesterol através da inibição da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) redutase. Esta enzima participa da primeira etapa (etapa determinante) da biossíntese do colesterol no organismo, transformando o HMG-CoA em ácido mevalônico (Figura 4) ^(12, 44).

Uma vantagem da SIV frente a algumas outras estatinas é que além da redução da concentração de colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL), elas promovem um aumento do colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL), maior diminuição da concentração de triglicerídeos séricos, de triglicerídeos ligados à lipoproteínas de muito alta densidade (VLDL) e do colesterol-VLDL ⁽¹²⁾. Com estas ações, a SIV apresenta atividade antiaterogênica (previne a progressão da placa aterosclerótica), relacionada à melhora da disfunção endotelial e vasomotora, diminuição da formação de trombos plaquetários e modulação na atividade fibrinolítica em pacientes hipercolesterolêmicos. Estes efeitos contribuem para a regressão e redução dos eventos coronários agudos em pacientes que apresentam alguma doença coronária ou vascular periférica, para a redução de quadros de isquemia do miocárdio e incidência de infarto, com conseqüente diminuição do índice de mortalidade total causado por doenças cardiovasculares ⁽¹⁰⁾.

Além destes efeitos na redução da diminuição do colesterol sérico, as estatinas exercem muitos outros, que são chamados de efeitos pleiotrópicos (EP). Estes efeitos envolvem a melhoria da função endotelial, aumentando a estabilidade das placas ateroscleróticas, diminuição do estresse oxidativo e da inflamação, e na inibição da resposta trombogênica. Além destes, as estatinas possuem benéficos efeitos extra-hepáticos no sistema imune, sistema nervoso central e ósseo ⁽¹³⁾. Apesar deste mecanismo ainda não estar esclarecido, acredita-se que muitos dos EP são mediados pela inibição de isoprenóides, os quais servem como ligantes lipídicos para moléculas sinalizadoras intracelulares, são formados durante a biossíntese do colesterol e atuam ativando a via inflamatória. Além disso, eles atuam sobre o sistema imune por no mínimo duas vias: (1) se ligando e bloqueando a função do antígeno-1 associado à função

linfocitária (LFA-1), que apresenta um fator crucial para a recirculação do linfócito, ativação das células T antigênicas específicas e migração transendotelial dos imunócitos; e (2) através da via de transdução do sinal da fosfatidilinositol-3'-cinase, um segundo mensageiro envolvido em uma grande variedade de funções das células T ⁽⁴⁵⁾.

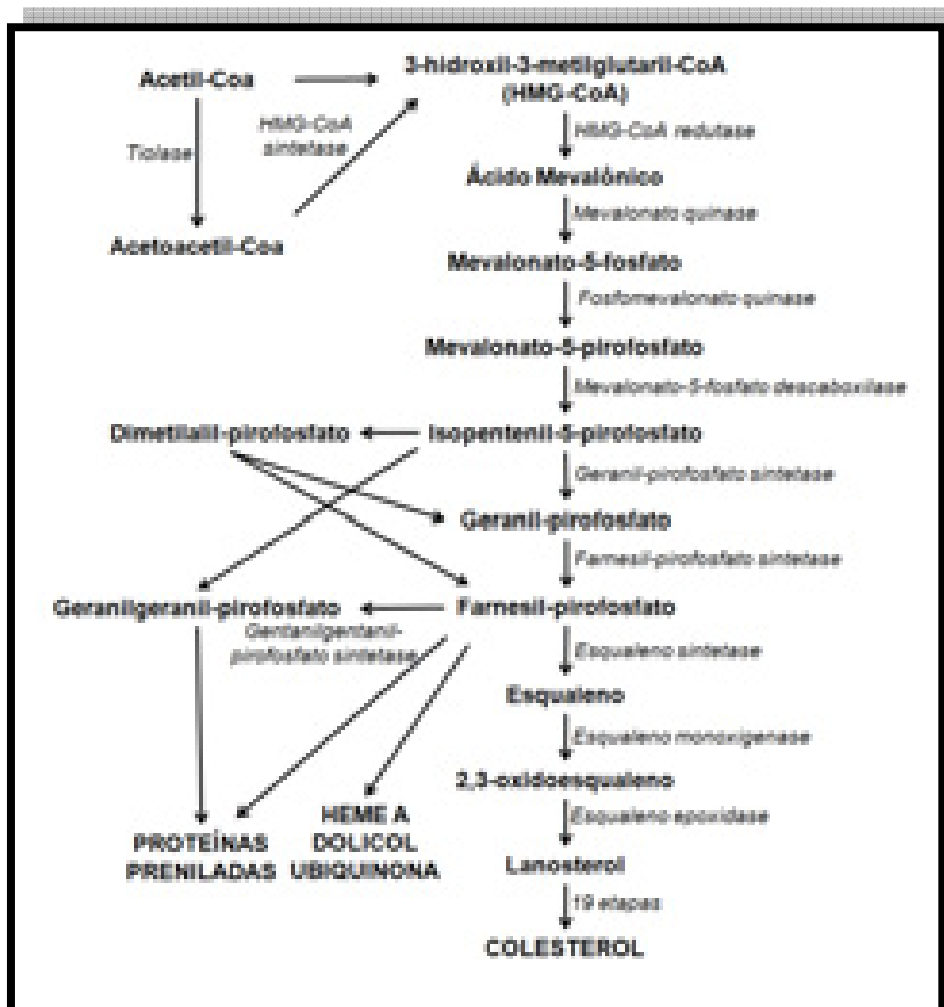


Figura 4: Biosíntese do colesterol.

2.3 ANFOTERICINA B

A anfotericina B (AmB) é um fármaco pertencente ao grupo dos antibióticos poliênicos de ação antifúngica obtida inicialmente a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* isoladas de amostras vegetais em decomposição no solo a margem do rio Orinoco na Venezuela em 1956 ^(18, 46). Desde lá a anfotericina B continua sendo o fármaco de escolha para o tratamento da maioria

formação de poros através das membranas lipídicas (Figura 6) ^(19, 53, 54). A AmB e o esterol formam um complexo (AmB-esterol) perpendicular ao plano da bicamada da membrana, com o ácido carboxílico formando ligações de hidrogênio com a porção hidrofílica do esterol da membrana com conseqüente formação de um poro iônico com as hidroxilas direcionadas para o centro do poro e, conseqüentemente, com a porção heptaeno voltada para a ligação com os esteróis ⁽¹⁹⁾. Sabe-se que o poro formado na verdade é um “meio poro”, pois se forma um poro na camada superior e outro na inferior da membrana e que eles são perfeitamente móveis dentro de cada metade da bicamada. Para formar um poro transmembranar os dois “meio poro” precisam se alinhar ⁽⁵⁵⁾. A formação destes poros iônicos causam uma despolarização e aumento da permeabilidade da membrana levando a uma liberação de cátions monovalentes como o potássio (K⁺) e pequenas moléculas inorgânicas do citoplasma, o que é responsável direta ou indiretamente pelo efeito letal à célula pela AmB ^(19, 53). Outro mecanismo de ação extremamente importante na ação lítica da AmB é o dano oxidativo produzido quando ela se liga aos esteróis da membrana. Provavelmente, a AmB provoca uma cadeia de reações oxidativas e estes metabólitos oxidados podem atuar como fatores de estimulação dos macrófagos, contribuindo para a ação antifúngica ⁽¹⁹⁾. Como os mecanismos de ação da AmB não são específicos, apesar de serem mais seletivos para as células fúngicas, este fármaco induz muitos efeitos tóxicos ^(19, 56).

A AmB apresenta um amplo espectro de ação agindo tanto fungos leveduriformes como *Candida*, *Malassezia*, *Saccharomyces* e *Trichosporon*, quanto filamentosos como *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides*, *Aspergillus*, *Scedosporium*, *Sporothrix*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Bipolaris*, *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Absidia*, *Apophysomyces*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Saksenaea*. Apesar de algumas cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *T. beigelli*, *Malassezia furfur*, *Scedosporium apiospermum* e *S. prolificans*, *Fusarium* spp. e *Sporothrix schenckii* apresentarem resistência à AmB, muitas delas são raramente vista clinicamente e, sobre tudo, o desenvolvimento de resistência à AmB não tem sido um fator significativo no tratamento de pacientes ⁽⁵⁷⁾. A resistência à AmB é causada por um decréscimo na quantidade

de ergosterol do fungo ou por uma mudança no alvo lipídico gerando uma redução na ligação da AmB ao esterol da membrana fúngica ⁽⁵⁷⁾.

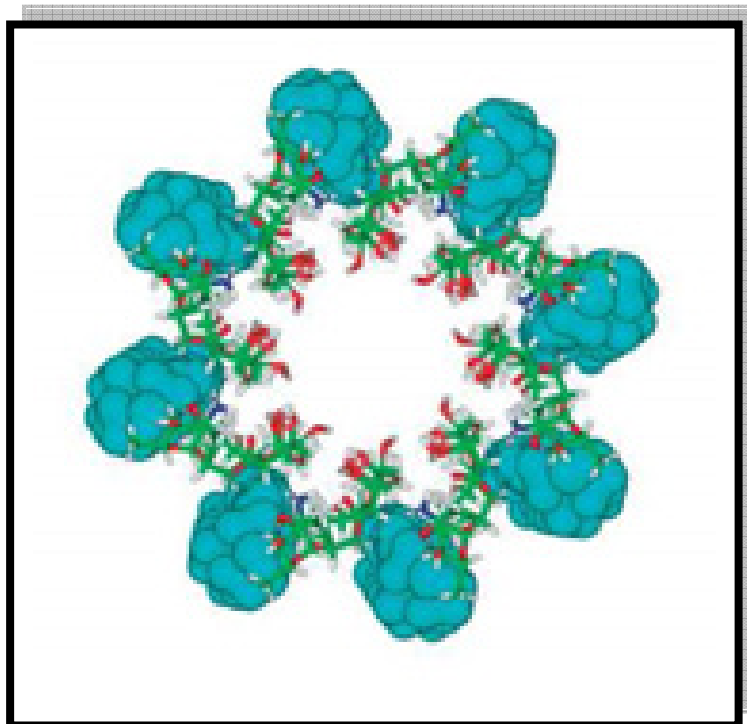


Figura 6: Modelo estrutural do canal AmB-esterol de membrana (54)

Esta complexa molécula apresenta dois tipos de toxicidade: (1) aguda (relacionada à infusão do fármaco) e (2) crônica (relacionada as doses repetidas). A toxicidade relacionada à infusão é caracterizada por febre, arrepios, calafrios, mal-estar, dor generalizada, vômito, náusea, dor de cabeça, hipóxia, hipotensão, hipertensão, hipotermia, arritmias cardíacas e infiltrado pulmonar. Estas reações são provavelmente associadas com a indução das citocinas pró-inflamatórias pela AmB e pela liberação de TNF- α dos macrófagos ⁽⁵⁸⁾. A toxicidade crônica é responsável pelo aparecimento de hipocalcemia, hipernatremia, diurese aumentada, hipomagnesemia, efeitos tóxicos sobre a medula óssea (anemia, leucopenia e trombocitopenia) e disfunção renal, provocada por uma elevada nefrotoxicidade, que é a principal reação adversa provocada pela AmB com taxa de incidência entre 49-65%. Esta reação é devido a um componente funcional relacionado à vasoconstrição renal, reduzindo o fluxo

sanguíneo normal e a taxa de filtração glomerular, e um resultado da interação direta entre a molécula e as células tubulares ^(58, 59).

A grande quantidade e taxa de reações adversas à AmB despertou vários estudos com o intuito de reduzi-las. Uma maneira eficaz na redução destas reações adversas é a sua incorporação em estruturas lipídicas, como lipossomas (AmBisome[®]), complexos lipídicos [ABLIC (Abelcet[®])], dispersões coloidais [ABCD (Amphotec[®] e Amphocil[®])] e microemulsões (AmB-ME) ^(58, 60-62).

3. ANEXAÇÃO DE ARTIGOS

3.1 AMPHOTERICIN B MICROEMULSION: A NEW APPROACH TO TARGETING FUNGAL CELLS

Submetido para publicação no periódico: Drug Delivery.

3.2 NANOSIZED CARRIER FOR SIMVASTATIN HIGHLIGHTS ITS PLEIOTROPIC EFFECTS

Submetido para publicação no periódico: Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.

3.3 MICROEMULSÃO: UM PROMISSOR CARREADOR PARA MOLÉCULAS INSOLÚVEIS

Aceito para publicação no periódico: Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.

4. COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES

O desenvolvimento de novos sistemas transportadores de fármacos tem aumentado nos últimos anos. Inúmeros destes produtos apresentam a finalidade de melhorar o tratamento de doenças, no que diz respeito ao aumento da eficácia e redução da toxicidade dos fármacos, facilitando a adesão do paciente ao tratamento.

O estudo destes produtos envolve a participação de profissionais atuantes em diversas áreas. Dentre eles podemos citar o farmacêutico, médico, químico, biofísico, biólogo e engenheiros comprovando a multidisciplinaridade dessa arte.

O interesse na aplicação das MEs como sistemas de liberação de fármacos vem ganhando mais atenção por parte dos laboratórios industriais e dos pesquisadores acadêmicos. No campo farmacêutico, diversos estudos têm sido encontrados na literatura descrevendo o uso deste sistema em praticamente todas as vias de administração.

Portanto, com o desenvolvimento deste trabalho procuramos produzir um sistema microemulsionado que pudesse ser utilizado para a incorporação de diversas moléculas insolúveis, pois uma das características deste sistema é justamente o aumento da solubilidade aparente de fármacos. Dentre as moléculas utilizadas para serem incorporadas nas MEs desenvolvidas no LASID (Laboratório de Sistemas Dispersos) podemos citar a AmB, a SIV, a rotenona e as vitaminas lipossolúveis D e E.

Inicialmente, este trabalho de doutorado tinha o objetivo de preparar e analisar formulações microemulsionadas contendo AmB, como também suas propriedades físico-químicas, farmacotoxicidade *in vitro* e eficácia *in vivo*. O desenvolvimento do sistema AmB-ME mostrou uma grande interação entre a molécula da AmB e as gotículas da ME como pode ser observado devido a grande capacidade de incorporação desta molécula que aproxima-se de 96%. Outro resultado promissor para este sistema é o fato da AmB está incorporada na forma monomérica na ME como foi comprovado pelo estudo espectrofotométrico. Esta característica de incorporação favorece a uma redução da toxicidade desta

molécula, principalmente a nefrotoxicidade, que é a principal causa da suspensão do tratamento com a AmB. A redução da toxicidade foi comprovada no estudo *in vitro* de toxicidade utilizando hemácias humanas. Na concentração de 5 mg/L houve uma proteção bastante acentuada das hemácias não ocorrendo praticamente liberação de hemoglobina e de apenas 60% de liberação do K⁺ em comparação com a AmB na forma micelar que teve por volta de 83% de liberação de hemoglobina e 100% de K⁺. Além disso, o sistema desenvolvido apresentou uma eficácia *in vitro*, utilizando *Candida albicans* como fungo modelo, semelhante a forma micelar da AmB utilizado como grupo controle.

Durante o desenvolvimento deste doutorado um ponto que ficou marcado e que será desenvolvido posteriormente é a realização de experimentos *in vivo* utilizando camundongos Balb-C. Após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRN fizemos várias tentativas de realizar um estudo de sobrevivência e biodistribuição fúngica utilizando estes animais após a infecção por *Candida* e posterior tratamento com diversos sistemas contendo AmB. Porém, devido a fatores alheios ao nosso conhecimento, estas análises não apresentaram os resultados esperados.

Durante o desenvolvimento deste doutorado, que tinha como foco inicial apenas microemulsões de AmB, um novo fármaco, a sinvastatina, mereceu uma atenção especial. O desenvolvimento do sistema SIV-ME veio da necessidade de um grupo de pesquisa da UFRN, comandado pelo Prof. Aldo Medeiros, de incorporá-la em um sistema líquido para analisar as suas propriedades pleiotrópicas. Dada a ideia, incorporamos a sinvastatina na microemulsão e analisamos as propriedades do sistema desenvolvido. Foram avaliados vários parâmetros físico-químicos como índice de refração, pH, condutividade, tamanho das gotículas, reologia, viscosidade. A incorporação da SIV na ME mostrou uma boa interação entre eles, como foi evidenciada pela manutenção das suas propriedades físico-químicas. O desenvolvimento deste sistema foi de grande importância para o LASID, pois resultou na produção de 3 artigos científicos, entre eles o artigo 5.1.1 da seção Apêndice.

Do estudo dos sistemas microemulsionados tivemos a ideia de escrever um artigo de revisão sobre este tema, cujo objetivo foi fazer uma grande abordagem teórica sobre diversos parâmetros importantes para o estudo das MEs

e mostrar os recentes avanços na aplicação clínica destes sistemas como carreadores de moléculas insolúveis.

Um foco paralelo a este doutorado, foi a chegada ao LASID do então doutorando José Alexsandro da Silva, que trouxe uma proposta de preparar uma microemulsão contendo o diclofenaco dietilamônio para uso transdérmico. Durante a sua permanência no LASID pude trabalhar lado a lado no desenvolvimento deste sistema. Esta proposta de parceria obteve resultados bastante promissores como podem ser observados na produção de alguns artigos científicos com este tema (Apêndice 5.1.2 e 5.1.3).

Durante o desenvolvimento do doutorado fui aprovado em um concurso público para professor da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e tive que me mudar para uma nova cidade (João Pessoa) e manter em paralelo o projeto proposto. Isto só foi possível devido a minha equipe de trabalho no LASID composta por Clara Araújo, Laura Fonseca, Walteçá Silveira, Miguel Adelino e outros alunos de iniciação científica. Um dos objetivos da minha vida foi atingido (ser professor em uma Universidade pública), mas só estará completo com a conclusão deste doutorado, pois, só assim, poderei exercer todas as funções inerentes a um professor e pesquisador universitário.

O desenvolvimento desta vida científica me foi bastante gratificante, pois durante o mestrado e doutorado pude conviver com pessoas no LASID que só fizeram enriquecer o meu conhecimento. Entre eles, posso destacar a professora Ivonete Batista, que tive o privilégio de acompanhar, como aluno de iniciação científica, durante o desenvolvimento do seu mestrado e doutorado, pois o seu saber e poder de autocrítica ajudou bastante na minha formação. Uma outra pessoa que me honra muito te conhecido foi o Dr. Jacques Bolard, pesquisador de renome internacional, que tem mais de 120 artigos publicado na area de AmB e suas propriedades fisico-quimicas.

Além disso, pude participar de um congresso internacional fora do Brasil, em Amsterdã (Holanda). Nesta oportunidade pude apresentar quatro trabalhos no PSWC (*Pharmaceutical Science World Congress*) em 2007. Além desses, apresentei mais 50 trabalhos em congressos diversos. Quanto aos artigos científicos, tenho 8 publicados nos periódicos: *Journal of Pharmaceutical Science*, *Current Drug Delivery*, *Pharmaceutical Development and Technology*,

Journal of Dispersion Science and Technology, Acta Cirurgica Brasileira, Química Nova e Revista Brasileira de Farmácia.

Para finalizar, como já citado anteriormente, o meu ingresso na UEPB, só consolida a permanência neste ramo de atividade que me gratifica dia após dia, como na conclusão de trabalhos como este. Cujo objetivo principal é implementar uma linha de pesquisa que tenha como foco a incorporação de moléculas diversas em vários tipos de microemulsões, e a AmB nunca será abandonada durante estas pesquisas futuras, já que foi a base de toda uma vida científica.

5. APÊNDICE

5.1 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

5.1.1 SIMVASTATIN IMPROVES THE HEALING OF INFECTED SKIN WOUNDS OF RATS

Publicado no periódico: Acta Cirúrgica Brasileira, v. 22, p. 57-63, 2007.

Simvastatin improves the healing of infected skin wounds of rats¹

A simvastatina melhora a cicatrização de feridas infectadas da pele de ratos

Amália Cinthia Mendes do Rego¹, Israel Araújo Filho², Beltrão P.G.L. Damasceno³, Crayvaldo Siqueira Tabosa Filho⁴, Francisco Antônio da Silveira⁵, José Branstão Neto⁶, Aldo Cunha Medeiros⁷

1. Department of Surgery, School of Medicine, Federal University of Rio Grande Norte (UFRN), Natal, Brazil.
2. Graduate student, Scientific Initiation Program, UFRN, Brazil.
3. PhD Fellow of Postgraduate Program in Health Sciences, UFRN, Brazil.
4. PhD, Adjunct Professor, Department of Pharmacy, UFRN, Brazil.
5. Adjunct Professor, Department of Clinical Analysis, UFRN, Brazil.
6. Full Professor, Postgraduate Program in Health Sciences, UFRN, Brazil.
7. Full Professor, Department of Surgery, UFRN, Brazil.

ABSTRACT

Purpose: This study explores the potential of the simvastatin to ameliorate inflammation and infection in open infected skin wounds of rats. **Methods:** Fourteen Wistar rats weighting 205±12g were used. The study was done in a group whose open infected skin wounds were treated with topical application of simvastatin microemulsion (SEM, n=7) and a second group with wounds treated with saline 0.9% (SAL, n=7). A bacteriological exam of the wounds fluid for gram positive and gram negative bacteria, the residual expression of TNF α and IL-1 β by immunohistochemical techniques, and histological analysis by HE stain were performed. **Results:** The expression of TNF α could be clearly demonstrated in lower degree in skin wounds treated with simvastatin (668.6 ± 74.7 im²) than in saline (2126.0 ± 327.1 im²). In comparison, wound tissues from SEM group displayed leukocyte infiltration significantly lower than that observed in SAL group (p=0.05). Culture results of the samples taken from wound fluid on fourth post-treatment day revealed wound infection in only one rat of group simvastatin (SEM), where *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* and *Enterobacter sp* were isolated. In the rats whose wounds were treated with saline (SAL), polymicrobial infection with more than 100,000 CFU/g was detected in all the wounds. **Conclusion:** In addition to its antiinflammatory properties, the protective effects of simvastatin in infected open skin wounds is able to reduce infection and probably has antibacterial action. The potential to treat these wounds with statins to ameliorate inflammation and infection is promising.

Key words: Statins. Inflammation. Wound Healing. Wistar rat. Skin. Cytokine.

RESUMO

Objetivo: O presente estudo analisa o potencial da simvastatina para atenuar a inflamação e a infecção em feridas abertas infectadas de pele de ratos. **Métodos:** Foram utilizados 14 ratos Wistar pesando 205±12g. O estudo foi realizado com um grupo de animais cujas feridas abertas infectadas foram tratadas com aplicação tópica de simvastatina microemulsão (SEM, n=7) e um segundo grupo com feridas tratadas com solução salina 0,9% (SAL, n=7). Foi realizado exame bacteriológico do fluido das feridas para detecção de bactérias gram positivas e negativas, a expressão residual de TNF α e IL-1 β por imunohistoquímica e análise histológica pela coloração H.E. **Resultados:** A expressão de TNF α pode ser claramente demonstrada em menor grau nas feridas de pele tratadas com simvastatina (668,6 ± 74,7 im²) do que no grupo salina (2126,0 ± 327,1 im²). Em comparação, os tecidos das feridas do grupo SEM mostram infiltração leucocitária significativamente menor do que a observada no grupo SAL. (p=0,05). O resultado das culturas realizadas no fluido das feridas no 4º dia de tratamento revelou infecção em apenas um rato do grupo simvastatina (SEM), onde *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Enterobacter sp* foram isolados. Nos ratos cujas feridas foram tratadas com solução salina (SAL), infecção polimicrobiana com mais de 100.000 UFC/g foi detectada em todas as feridas. **Conclusões:** Além de suas propriedades anti-inflamatórias, o efeito protetor da simvastatina em feridas abertas e infectadas de pele é capaz de reduzir a infecção e provavelmente tem ação antibacteriana. O potencial da droga para atenuar inflamação e infecção de feridas é promissor.

Descritores: Estatinas. Inflamação. Cicatrização de Feridas. Rato Wistar. Pele. Citocinas.

Introduction

The healing of open skin wounds involves the epithelium and underlying stroma. Processes such as angiogenesis, activation, migration, and proliferation of fibroblasts, myofibroblasts and endothelial cells; formation of granulation tissue, and wound contraction are needed to close these defects^{1,2}. Some wounds are also frequently inflamed and, in general, stromal involvement and inflammation greatly increase the risk of subsequent complications^{3,4}. The repair process begins immediately after injury by the release of various growth factors, cytokines, and low molecular weight compounds. Disruption of blood vessels also leads to the formation of the blood clot, which is composed of cross-linked fibrin, and of extracellular matrix proteins such as fibronectin, laminin, and thrombospondin⁵. Wound infection develops in 2% to 5% of patients undergoing surgical procedures each year in most hospitals world-wide and continues being considered one of the most important problems in surgical wards nowadays. It is one of the main factors that alter the physiologic evolution of the wound healing^{6,7}. The bacteria inhibit the angiogenesis, secrete plasminogen activators, and proteolytic enzymes that may affect the extracellular matrix, blocking the wound contraction⁸. Several substances have been used to treat infected skin wounds, like honey, sugar, antibiotics, phytochemicals^{9,10,11,12}. Statins are a class of compounds that competitively inhibit the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, the first committed step in cholesterol biosynthesis. Increasingly, the pleiotropic properties of statins are being described. In endothelial cells, all of these effects seem to result from the inhibition of cholesterol's precursor mevalonic acid, which is critical to the isoprenylation of a diverse family of proteins^{13,14}. Simvastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, have been shown to exhibit important immunomodulatory effects independent of lipid lowering¹⁵. These pleiotropic effects have been demonstrated to include anti-inflammatory actions¹⁶, improvement of endothelial and microvascular function, modulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS)¹⁷, ischemia/reperfusion¹⁸ and repair¹⁹. However, statins have not been used to treat skin infected wounds. We thus approached the question of whether topical treatment with simvastatin might improve the healing of skin infected wounds in a rat model.

Methods

The experimental protocol was approved by the Research Ethics Committee (Animal Research Ethics Division) of the University Hospital-UFRN, Brazil. Animals were handled in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Brazilian College of Animal Experimentation.

Animals

Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, *Andrena mammalia*) weighing 26277g were used. They were housed in polypropylene cages and maintained under controlled temperature conditions on a 12h light-dark cycle and allowed *ad libitum* access to commercially available rat chow (Labina, Petrol nd) and water.

Experimental design and procedures

The animals were randomly separated in two groups of seven rats each. After 12 hours of fasting, the rats were anesthetized by intramuscular injection of 30mg/Kg of ketamine and thiopental 20mg/Kg intraperitoneal. After dorsal skin depilation and anti-sepsis with 1% povidone, the surgical procedures were performed under aseptic conditions. An open skin squared wound (1cm²), was done in the dorsal skin of all the rats. Immediately after the surgical procedure, the wounds were contaminated with topical application of 0.5ml of multibacterial solution prepared with 1g of rat fresh feces and 10ml of saline. In the following day, the infected wounds of the simvastatin group (SIM) (n=7) were topically treated with 0.2 ml of simvastatin microemulsion (10mg/ml) once a day. The wounds of group saline (SAL) (n=7) rats were treated with 0.2 ml of saline solution daily. When the wounds were totally epithelialized, the healing time was recorded and the resection of the ear was performed under anesthesia. The healed tissues were used for histopathological study and immunohistochemical dosage of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1 β).

Immunohistochemical staining of TNF- α and IL-1 β

Immunohistochemical staining for TNF- α and IL-1 β was performed on tissue samples obtained from the healing skin. These samples were fixed in 4% paraformaldehyde, processed in routine technique, cut into 5mm-thick frozen sections, and dried at room temperature. Absolute methanol containing 1% hydrogen peroxide was added to block endogenous peroxidase. After three washings with a phosphate buffered solution (PBS) for 5 min each, these sections were treated with 1% polyoxyethylene-10-octylphenyl-ether in PBS for 20 min at room temperature. After washing in the same way, these were reacted with 100 ml of biotinylated anti-rat TNF- α monoclonal antibody (Pharmingen, San Diego, CA) or biotinylated anti-rat IL-1 β monoclonal antibody (Pharmingen), diluted in 5 mL of PBS and 1 ml of whole goat serum at room temperature in a moist chamber for 2 h. After washing, the preparations were incubated, with two drops each of avidin solution and biotinylated peroxidase solution in 4.5 ml of PBS and 0.5 ml of 1% skim milk for 2 h at 37°C. After PBS rinsing, diaminobenzidine and nickel were applied for 5 min to

achieve permanent color change. Six views were selected randomly for each section and observed under a light microscope ($\times 100$). The mean number of reactive cells in the six views was regarded as the data for each sample. Sequential images of microscopic sections were photographed within 72 hours after immunostaining, by a digital camera (Sony, Tokyo, Japan) mounted on a light microscope (Olympus B-50, Tokyo, Japan) at a magnification of 100x, and saved in .jpg file format. Images were then analyzed in ImagePro-Plus software (Media Cybernetics, LP, USA). Briefly, the entire area colored by cytolines was marked, and the total marked area was calculated. The area stained by the antibody of interest was identified and calculated by using the software color algorithm. The integrated optical areas stained by antibodies were then recorded. The score index was calculated for each of the antibodies and it was averaged.

Histopathology

The biopsies of skin wounds were processed following the routine and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological analysis of the inflammatory reaction, using the optical microscope Olympus B-50, Japan, Tokyo. The quantification of cells, fibers and elements of the inflammatory reaction was performed by the Image Pro-Plus Media Cybernetics software, LP, USA.

Bacteriological examination

At the 4th postoperative day, exudate was collected from the wounds for microbiology and for quantitation of bacterial population. The materials were processed and cultured on selective MacConkey's agar, blood agar and sabb mounted agar. The agar plates were incubated at 37 °C and examined for growth after 24, 48 and 72 hours. Any growth in the plates of bacteria of the same biotype as cultured in the wounds was considered positive and expressed as colony-forming units per gram of tissue (CFU/g). All procedures were performed under laminar air flow.

Statistical analysis

Data are presented as the means standard deviation. Results were analyzed with ANOVA and Student t test. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$.

Results

Tumor necrosis factor alpha (TNF α)

The expression of TNF α could be clearly demonstrated in lower degree in skin wounds treated with simvastatin (668.6 ± 74.7 nm²) than in saline (2120.0 ± 327.1 nm²) treated wounds, as can be shown in figure 1 and

table 1. So, a distinct decrease of tissue reactivity occurred when the simvastatin microemulsion was applied to the infected wounds.

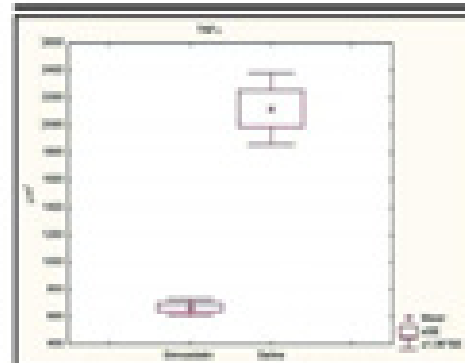


FIGURE 1 - Mean areas corresponding to the expression of TNF α . Significant difference comparing the groups simvastatin and saline ($p < 0.05$).

TABLE 1 - Mean and statistical analysis of optical density related to the expression of cytokines in tissues of skin infected wounds treated with simvastatin and saline (μm^2).

Cytokine	Group	Simvastatin (SEM) ^a	Saline (SAL) ^a	p-value
TNF α		668.6 \pm 74.7	2120.0 \pm 327.1	0.00000
IL-1 β		467.6 \pm 55.2	691.6 \pm 67.4	0.00000

^a Mean \pm standard deviation.

t - Difference statistically significant comparing the groups SEM/SAL (Student's test).

Image Pro-plus software Media Cybernetics was used.

Interleukin-1 β

IL-1 β expression was significantly more enhanced in the saline (SAL) group than in the Simvastatin (SIM) group after total epithelialization of the skin wounds. A clearly decreased immunohistochemical stainability could be noticed in the SIM group, whose data are expressed in figure 2 and table 1.

Histopathology

Contamination of skin wounds with multibacterial local infection caused intense inflammatory reaction in tissues of group SAL rats, with edema and marked leukocyte infiltration consistent with acute injury (Figure 3). In comparison, wound tissue from SIM group displayed leukocyte infiltration significantly lower than that observed in SAL group ($p < 0.05$). These pathologic changes were reduced by the administration of simvastatin typically in the infected wounds (Table 2). The histological slides (figures 3 and 4) suggest differences in neutrophil accumulation between the SAL and SIM groups.

TABLE 2 - Histological grading (based in the optical density related to the inflammatory reaction in tissues of skin infected wounds treated with simvastatin and saline (μm^2))

Group	Simvastatin (SIM) ^a	Saline (SAL) ^a	p-value
Inflammatory reaction	544.7 \pm 65.2	9416.1 \pm 233.4	0.00001

^a Mean \pm Standard deviation

1 - Difference statistically significant comparing the groups SIM/SAL (Student's test)

Image Pro plus software (Media Cybernetics) was used.

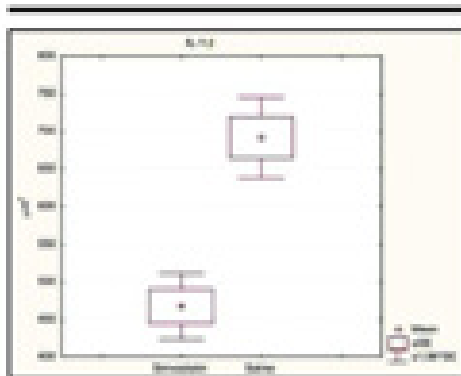


FIGURE 2 - Mean areas corresponding to the expression of IL-1 β Significant difference comparing the groups simvastatin and saline ($p < 0.05$).

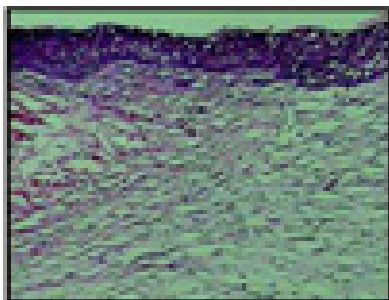


FIGURE 3 - Histological section of wound tissue taken from a SAL group rat, demonstrating significant neutrophil infiltration, giant cells and follicles. 100, 100x.

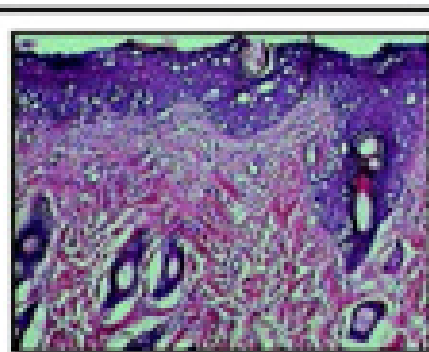


FIGURE 4 - Histological section of wound tissue taken from SIM group rat, demonstrating low neutrophil infiltration and good epithelial regeneration. 100, 100x.

Bacteriological examination

Culture results of the samples taken from wound fluid on fourth post treatment day revealed wound infection in only the rat number 4 of group simvastatin (SIM), where *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* and *Enterobacter sp* were isolated. In the rats whose wounds were treated with saline (SAL), polymicrobial infection with more than 100,000 CFU/g was detected in all the wounds (Table 3). The most frequently isolated microorganisms can be observed in table 3.

TABLE 3 - Detection of bacteria in the wound fluid of animals in groups treated with simvastatin (SIM) and treated with saline (SAL).

Rat number	SIM Group/ bacteria	CFU/g	SAL Group/bacteria	CFU/g
1	NEG	0	<i>Klebsiella</i> sp, <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Staphylococcus coagulans</i> negative	> 100,000
2	NEG	0	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus coagulans</i> negative	50,000
3	NEG	0	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus coagulans</i> negative	> 100,000
4	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> sp	50,000	<i>Klebsiella</i> sp, <i>Proteus mirabilis</i>	>100,000
5	NEG	0	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> sp, <i>Proteus mirabilis</i>	> 100,000
6	NEG	0	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	> 100,000

NEG, No bacterial growth; CFU/g, Colony forming unit per gram.

Discussion

Cutaneous wound healing is a complex process involving blood clotting, inflammation, new tissue formation, and finally tissue remodeling¹⁰. It is well described at the histological level and many experimental and clinical studies have demonstrated varied, but in most cases beneficial, effects of exogenous substances^{11,12} on the healing process. However, the roles played by these exogenous treatments have remained largely unclear. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) are used clinically for lowering hypercholesterolemia because of their inhibitory effect on hepatic biosynthesis of cholesterol at the mevalonate step¹³. These statins such as simvastatin have been shown to exhibit important immunomodulatory effects independent of lipid lowering¹⁴. These pleiotropic effects have been demonstrated to include anti-inflammatory actions¹⁵. The present study is one of the first to demonstrate that HMG-CoA reductase inhibitors significantly improve healing of infected skin wounds in an experimental model in rats. The improvement in inflammatory reaction and its cytokines expression corroborates some results in the literature that clearly demonstrate that simvastatin is a potent and effective endothelium-protective agent that reduces leukocyte-endothelial cell interactions independently of its well known lipid lowering effects. This effect has been found to be at least partially mediated via downregulation of P-selectin expression on the microvascular endothelium. Thus, HMG-CoA reductase inhibitors like simvastatin have important anti-

inflammatory effects besides their well-known lipid-lowering action^{16,17}. In the present study we demonstrated that the topical application of simvastatin attenuated the inflammatory reaction in wound healing of infected tissues, but to date the mechanism is not clear. Pradier *et al*¹⁸ demonstrated a protective effect of simvastatin under conditions of acute inflammation induced by an atherosclerosis within the microcirculation. In particular, they provide strong evidence that simvastatin is able to attenuate enhanced leukocyte-endothelium interaction after *S aureus* toxin administration. Pore-forming *S aureus* toxin is known to provoke inflammatory activation^{19,20}. These evidence may explain our results with the topical use of simvastatin in the healing of infected wounds. Statins affect the production of many acute phase reactants, including CRP, which is produced in the liver under stimulation by cytokines (IL-1 and IL-6). In nonatherosclerotic huCRP transgenic mice, statins decreased basal and IL-1 β -induced plasma huCRP levels independently of cholesterol lowering and of an effect on IL-6 production²¹. In fact, in this work simvastatin was able to induce a marked decrease in TNF α and IL-1 β in healing tissues, as demonstrated by immunocytochemical analysis. A probable antibacterial effect was also observed, and the exact mechanism to explain this action is to be described. In an other study the pretreatment was found to decrease cytokine-stimulated transcription factor activation and iNOS expression in the endothelium, stating that simvastatin affect cytokines with several ways²².

Conclusion

In addition to its anti-inflammatory properties, the protective effects of simvastatin in infected open skin wounds is able to reduce infection and probably has antibacterial action. The potential to treat these wounds with statins to ameliorate inflammation and infection is promising.

References

1. Clark RAF. Wound repair: Overview and general considerations. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (2nd ed.), edited by Clark RAF. New York: Plenum, 1994, p. 3–50.
2. Martin P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75–81, 1997.
3. Redd MJ, Cooper L, Wood W, Strasser B, Martin P. Wound healing and cell animation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359: 777–84.
4. Hira B, Gabbiani G. Cell matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost* 2003; 90: 993–1002.
5. Clark RAF. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci*. 1993; 306: 42–8.
6. Pichori T, Siddiqui AR, Ahmed M. Surgical wound infection surveillance in general surgery procedures at a teaching hospital in Pakistan. *Am J Infect Control*. 2005;31:398–1.
7. Narong MN, Theongyapason S, Thairat N, Jamsilmit S, Kasattipal N. Surgical site infection in patients undergoing major operations in a university hospital: Using standardized infection rate as a benchmarking tool. *Am J Infect Control*. 2003;31:274–9.
8. Perry AW, Sartain JB, Gottlieb LD. Skin graft survival. The bacterial barrier. *Ann Plast Surg*. 1989; 22:479–83.10.
9. Santos MPS, Cezario NG, Nassif PAN, Ribas-Filho JM, Almeida BLP, Malafaia O, Ribas CAPM, Travençolo NM, Henriques GS, Maia MA, Britoconet RCA. Evaluation of the use of raw extract of *Azospira grossipifolia* L. in the healing process of skin wounds in rats. *Acta Cir Bras*. 2006;(supl.3):212–7.
10. Nunes Jr JAT, Ribas-Filho JM, Malafaia O, Cezario NG, Inácio CM, Negrão AW, Lucena PLH, Moreira H, Wagemfar Jr J, Cruz H. Evaluation of the hydroalcoholic *Echinus terebinthifolius* Ruschii (Asteraceae) extract in the healing process of the alpha lipoic in rats. *Acta Cir Bras*. 2006;(supl.3):218–15.
11. Gomes IC, Campos ACL, Timbira EM, Timóteo SB, Torres OBM, Aguilhem MA, Araújo-ACF, Santos-Isolan PMB, Oliveira EM, Arruda ECM. Extract from *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in

- rats: morphometric and histological study. *Acta Cir Bras*. 2006;(supl.3):2135–45.
12. Martins NLP, Malafaia O, Ribas-Filho JM, Heibel M, Balleira RN, Vasconcelos PRL, Moreira H, Marzani M, Nassif PAN, Wallbach TE. Healing process in cutaneous surgical wounds in rats under the influence of *Delignaja phalarata* aqueous extract. *Acta Cir Bras*. 2006;(supl.3):2166–75.
13. Biondo-Simões MLP, Gomes ADGA, Pascho C, Torres LFB, Barreto ES. Inflamação da hipertensão arterial tratada com losartan na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Acta Cir Bras*. 2006;21:144–50.
14. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343:425–30.
15. Corini A, Bellotti S, Barini R, Paganelli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther*. 1999;84:413–28.
16. Kwak B, Malhotra P, Myit S. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*. 2006;6:399–402.
17. Pradier D, Makawski J, Schnell M. Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha toxin. *Circulation*. 2003;106:2104–2110.
18. Laufs U, Lino JC. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. 1998;273:24266–71.
19. Naidu BV, Woolley SM, Farivar AS, Thomas R, Praga C, Malligan MS. Simvastatin ameliorates injury in an experimental model of lung ischemia-reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126:482–9.
20. Mees MW, Lichten EA, Isomuro U, Lütjens R, Schrader J, Harms P, Weber C. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin profoundly improves survival in a murine model of sepsis. *Circulation*. 2004;109:2560–5.
21. MARTIN P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276: 75–81.
22. Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am J Cardiol*. 1988;62:10–15.
23. Kwak B, Malhotra P, Myit S. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*. 2006;6:399–402.
24. Pradier D, Makawski J, Schnell M. Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha toxin. *Circulation*. 2003;106:2104–10.
25. Pradier D, Scalia R, Lefler AM. Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2094–900.
26. Kimura M, Kusano I, Russell J, Granger DN. Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc*

- Biol.* 1997;17:1521-1526.
27. Franke D, Makowski J, Schnell M, Buerke U, Dahm M, Cohen H, Sibelius U, Grandel U, Grömminger F, Senger W, Meyer J, Duran H, Buerke M. Simvastatin Inhibits Inflammatory Properties of *Staphylococcus aureus* δ -Toxin. *Circulation*. 2002;106:2104-2110.
28. Valeva A, Weiszer A, Walker B, et al. Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal δ -toxin. *EMBO J*. 1996;15:4337-44.
29. Sibelius U, Grandel U, Buerke M. Staphylococcal δ -toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation*. 2000;101:78-85.
30. Buerke M, Sibelius U, Grandel U. Staphylococcus aureus δ -toxin mediates polymorphonuclear leukocyte induced vasoconstriction and endothelial dysfunction. *Shock*. 2002;17:34-8.
31. Kleemann R, Verschuren L, de Rooij BJ, Lindeman J, de Maat MM, Szalai AJ, Princen HM, Koozma T. Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPARalpha activation in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro. *Blood*. 2004;103:4188-94.
32. Ghetti Paiva A, Martins MR, Felix JV, de Rocha MO, Carmo EC, Elias LL, Antunes-Rodrigues J (2004) Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxemic shock in rats. *Shock*. 21:271-5.

Correspondence:
Abdo Cunha Medeiros
Av. Miguel Alcides Araújo 1889
Natal, RN, Brazil

Source of funding:
Conflict of interest:

5.1.2 USO DE DIAGRAMAS DE FASE PSEUDOTERNÁRIOS COMO FERRAMENTA DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES TRANSDÉRMICAS

Publicado no periódico: Revista Brasileira de Farmácia, v. 90 (3), p. 243-247, 2009.

Uso de diagramas de fase pseudoternários como ferramenta de obtenção de nanoemulsões transdérmicas

Use of pseudo-ternary phase diagrams as a tool to produce transdermal nanoemulsion

José Alexandre da Silva¹, Bolívar Porciano Goulart de Lima Damasceno², Valéria Ferreira de Costa Botaf³, Eryvato Nóbrega Santos de Aguiar⁴ & Davi Ferreira de Santana⁵

RESUMO – As nanoemulsões (NE) são dispersões isotrópicas, transparentes, termodinamicamente estáveis, usualmente formadas por misturas de 4 componentes, água, óleo, tensoativo (T) e co-tensoativo (CO). A construção de diagramas de fase pseudoternários (DFPT) é uma ferramenta fundamental para obtenção de sistemas nanoemulsionados. Os DFPT, neste estudo, foram obtidos por inspeção visual das misturas dos componentes PEG-8 caprílico caprílico glicídeo (T) com poliglicérol-5 dioléato (CO) nas proporções 4:1, 3:1, 2:1 e 1:1 e, a esta mistura de T:CO, foi adicionado misturas de isopropila (fase oleosa) nas proporções 1:9 a 9:1. As titulações foram feitas com água ultrapura, utilizando uma pipeta automática ajustada a 1000µL, para a gota, sob agitação magnética e à temperatura ambiente. Após as titulações, foi possível definir as várias regiões dos diagramas. A técnica empregada para a sua determinação mostrou-se simples e reproduzível, podendo indicar a melhor combinação dos componentes da fórmula e suas respectivas quantidades, a fim de produzir um sistema estável para a incorporação de fármacos.

PALAVRAS-CHAVE – Diagramas de fase pseudoternário; nanoemulsões transdérmicas.

SUMMARY – The nanoemulsions (NE) are isotropic, transparent and thermodynamically stable systems. They are usually produced with 4 ingredients: water, oil, surfactant and co-surfactant. The pseudo-ternary phase diagram (PTPD) construction is an essential step to NEs systems' production. The PTPD were produced by the mixture 4:1, 3:1, 2:1 and 1:1 of PEG-8 caprylic capric glycerides (T) and polyglyceryl-5 dioleate (CO), respectively, with the isopropyl mixture [oil phase (O)] in the range from 1:9 to 9:1. To this T:CO mixture, the aqueous phase (water Milli Q) was titrated with an automatic pipette, and shaken with magnetic stirrer at room temperature. After the titration, the transition from separated phase to optically clear NE was seen and analyzed by naked eye. The technique used to determine the NE regions in the PTPD and the best ratio of NE components were simple, reliable, and suitable to obtain droplets with nanometer dimensions and generate a thermodynamic stable system (NE systems).

KEYWORDS – Pseudo-ternary phase diagram; transdermal nanoemulsions.

INTRODUÇÃO

As NE são dispersões isotrópicas, transparentes, termodinamicamente estáveis, usualmente formadas por misturas de 4 componentes, água, óleo, tensoativo e co-tensoativo. Elas apresentam grande potencial como sistemas de liberação e de direcionamento de fármacos, pelas propriedades de solubilizar fármacos hidrofílicos em meio lipofílico, lipofílico em meio aquoso e anfifílicos na interface óleo/água (RE *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2004; DJORDJEVIC *et al.*, 2004; ESCOBANO *et al.*, 2003; MENDONÇA, RICA & PLATNICKI, 2003; PAOLINO *et al.*, 2002; TABA *et al.*, 2002; SILVA, 2001; CANDAU & FABON, 1999; CONSTANTINIDES &

SCALART, 1997; TROTA & GASCO, 1994; LEUNG & SHI, 1989).

Este sistema apresenta uma estabilidade termodinâmica que oferece vantagens sobre dispersões instáveis e sistemas tradicionais de liberação tópicos e transdérmicos, pois é possível a incorporação de vários tipos de compostos na fase que apresenta baixa constante dielétrica (fase oleosa), na região interfacial (comumente dielétrica intermediária entre o óleo e a água) e na fase aquosa em que a constante dielétrica é elevada (RE *et al.*, 2005; CHEN & CHANG, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004; SHAI, 1998; LEUNG & SHI, 1989).

Além disso, esses sistemas podem se formar espontaneamente (KINDOV & BOJNER, 2006; PAOLINO *et al.*,

Data de aceite: 10/03/2010

¹ Depto. de Farmácia, Univ. Estadual de Paraíba, Rua João Manoel Araújo, s/n, 58121-710, Campina Grande-PB, Brasil
² Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Univ. Estadual de Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil
³ Departamento Ciências Farmacéuticas, Univ. Federal de Pernambuco, Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas, Recife-PB, Brasil
⁴ Núcleo de Desenvolvimento Farmacológico e Controle (NDFAC), Recife-PB, Brasil
⁵ Depto. de Farmácia, Laboratório de Sistemas Dispersos (LSDSD), Univ. Fed. de Paraíba Grande do Norte, Natal-RN, Brasil

2002; CANDAU & PABON, 1999) e resultaram em sistemas reservatórios com propriedades particulares (FORMARIZ *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2004) podendo existir sob várias formas estruturais: globular (sólida, líquida), incompletas e críticas ou lamelares (JURKOVIC & GLASPERLIN, 2004; SILVA, 1998).

O sistema de equilíbrio das fases em preparações contendo três ou mais componentes, como é o caso das NE, são representados classicamente por um DFTT (Figura 1), em que cada vértice do triângulo representa 100% de um componente particular. Este diagrama permite identificar várias regiões possíveis, assim como aquela que representa a melhor combinação dos componentes da fórmula em suas respectivas quantidades e que produz o sistema de maior estabilidade (MACEDO, 2005).

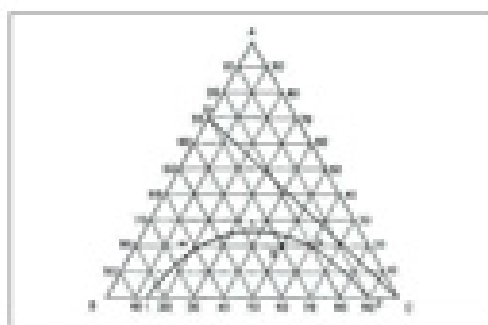


Fig. 1. Representação esquemática de um DFTT. Fonte: Adaptado de OLIVEIRA (2004).

A construção do DFTT é uma ferramenta fundamental para caracterizar o domínio das regiões de NE, cuja interpretação descreve as estruturas presentes comidas nelas, podendo-se escolher a região cuja viscosidade é mais apropriada para o fármaco ser incorporado (FORMARIZ, 2004). Deixé, em 1946, em seu estudo sobre cristalização, foi um dos primeiros pesquisadores a estudar e incorporar os DFTTs (MACEDO, 2005).

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

Segundo CERA (2001), as propriedades dos triângulos equiláteros devem ser extremamente exploradas, ou seja, a soma dos lados perpendiculares de um determinado ponto no triângulo é igual a sua altura. A Figura 1 mostra um triângulo equilátero onde cada lado (dividido em 100 partes correspondentes à composição percentual de cada ponto) é representado por um dos componentes da fórmula. O ponto A representa a mistura T/CO, o ponto B, a água e o C, o óleo (MACEDO, 2005). Na escolha de um ponto do diagrama, para obter uma formulação, é importante evitar

regiões limitas, caso contrário, haverá o perigo de indesejáveis transições de fase (FLORENCE & ATTWOOD, 2001).

A abordagem contextualizada no ensino de farmacotécnica tem se mostrado eficiente para a compreensão dos conceitos que envolvem o ensino-aprendizagem dessa ciência. No entanto, o tema abordado neste trabalho ainda é considerado pouco explorado nas revistas de publicação nacional na área farmacêutica. Considerando que pesquisas realizadas na literatura apontam a eficácia de estratégias de desenvolvimento de novas formas farmacêuticas (NF) pautadas na utilização de artigos científicos, temos como objetivo, desenvolver um DFTT para obtenção de NE transdissimulada e identificar o domínio de regiões de NE líquidas ou gel sob condições transparentes, isotérmicas e estáveis para posterior estudo de desenvolvimento farmacotécnico, caracterização e utilização em condições de permeação *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Substâncias de referência

PEG-8 óptico/capítulo glicolítico (Labesol[®]) e poliglicol-6-diolato (Purool Óptico[®]) foram obtidos pela Gattefosse-França; nitrato de isopropila foi adquirido pela Velp, Brasil. A água purificada foi produzida por um sistema Millipore Milli-Q[®] (Millipore Corporation, USA).

Construção dos diagramas de fase pseudoternários

Os diagramas foram obtidos por inspeção visual das misturas dos componentes polietileno glicólico 8 óptico-capítulo glicolítico (T) com poliglicol 6-diolato (CO) na proporção 4:1; 3:1; 2:1 e 1:1 e, a esta mistura, foi adicionado nitrato de isopropila (fase sólida) nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1, respectivamente. As titulações foram feitas com água purificada ultrapura Milli-Q[®], utilizando uma pipeta automática ajustada para 1000µL, adicionando gota a gota, em temperatura ambiente. Durante a titulação, a mistura foi homogeneizada por agitador magnético por 1min e as mudanças de aspecto visual, contra um fundo preto, foram observadas. Considerando-se as proporções dos componentes, após as titulações aquecidas, plotaram-se os pontos em que se deu a formação de sistema isotérmico e opticamente transparente líquido ou gel (NE) ou de NEs para sistema opaco líquido ou sólido (mistúris) ou dispersão opaca ou ainda separação de fases em cada diagrama (KE *et al.*, 2005; JURKOVIC *et al.*, 2004; FORMARIZ *et al.*, 2007; FORMARIZ *et al.*, 2006; SINTOV & SHAPIRO, 2004). Os diagramas foram feitos em duplicatas.

Seleção das formulações NE

Após a construção dos DFTT, as formulações NE líquidas e gel foram obtidas de regiões distintas dos DFTT. A partir dessas regiões, foram selecionadas 14 formulações (NEs líquidas e gel), as quais foram preparadas por simples solubilização dos componentes sob agitação magnética. As formulações foram preparadas 48h antes dos testes de caracterização para estabilização termodinâmica do sistema em temperatura ambiente (SILVA *et al.*, 2009).

Microscopia de luz polarizada

A isotropia das NEs foram realizadas por microscopia de luz polarizada e software analizador de imagens (Zetoc) depois de percorrido o tempo de 3 dias para o equilíbrio dos sistemas (ROSSINI, 2006).

Determinação do índice de refração (n_D)

O IR foi determinado, utilizando-se Refratômetro de Abbe, Carl Zeiss-Jena, aferido com água desionizada ultra-pura Milli-Q[®] (índice de refração 1,3325), a temperatura de 25 ± 0,5 °C, em triplicata (FORMALIZ *et al.*, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento empregado na construção dos DFTs, na maioria dos casos, consistiu na preparação de misturas binárias com posterior titulação de um terceiro componente (óleo ou água), avaliando-se a mistura a cada adição (MACEDO, 2005), cujos resultados das misturas obtidas são registrados e plotados em um triângulo equilátero, onde cada ponto da superfície corresponde às proporções definidas dos componentes da mistura (LAWRENCE & REES, 2006).

A mistura dos constituintes das NEs nem sempre conduziu a um sistema disperso homogêneo, podendo ocorrer diferentes estruturas (FORMALIZ, 2004). Um sistema de classificação foi proposto por Winsor em 1948 para definir os vários equilíbrios existentes entre as fases oleosa e aquosa, os quais foram estabelecidos em 4 tipos de sistemas:

- Região Winsor I, fase bicontínua representada por uma fase oleosa em equilíbrio com uma fase emulsãoada contendo óleo, água e a maior parte da mistura de tensoativo;
- Winsor II, também bicontínua, constituída de uma fase aquosa em equilíbrio com uma emulsão;
- Winsor III, trífase, contendo uma fase aquosa e outra oleosa, separadas por uma fase emulsãoada;
- Winsor IV, correspondente a uma região monotípica simplesmente (WYBOR, 1948).

Conforme já relatado anteriormente, os DFTs desta pesquisa, foram obtidos a partir da mistura binária do PEG-8 ejetor capilares glicérolico (T) com poliglicol-6 dibenzo (CO), cujos pontos experimentais obtidos através das titulações, referiram-se regiões limite e de transição entre as duas fases (aquosa e oleosa), os quais foram caracteri-

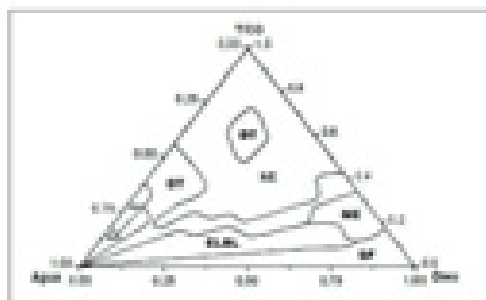


Fig. 3 - Diagrama de fase ternário obtido para o sistema PEG-8 ejetor capilares glicérolico (T) com poliglicol-6 dibenzo (CO) em água. O triângulo equilátero representa a mistura de componentes. O ejetor capilares glicérolico (T) e poliglicol-6 dibenzo (CO) são os componentes da mistura. O ejetor capilares glicérolico (T) e poliglicol-6 dibenzo (CO) são os componentes da mistura. O ejetor capilares glicérolico (T) e poliglicol-6 dibenzo (CO) são os componentes da mistura.

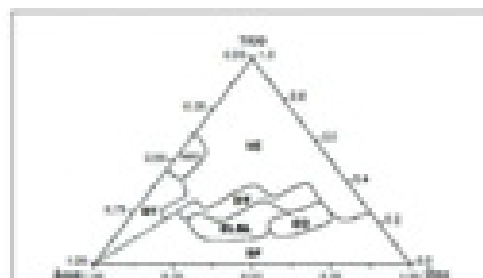


Fig. 4 - Diagrama de fase ternário obtido para o sistema PEG-8 ejetor capilares glicérolico (T) com poliglicol-6 dibenzo (CO) em água com surfactante. O ejetor capilares glicérolico (T) e poliglicol-6 dibenzo (CO) são os componentes da mistura. O ejetor capilares glicérolico (T) e poliglicol-6 dibenzo (CO) são os componentes da mistura.

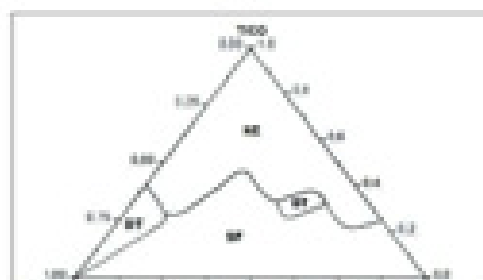


Fig. 5 - Diagrama de fase ternário obtido para o sistema PEG-8 ejetor capilares glicérolico (T) com poliglicol-6 dibenzo (CO) em água com surfactante. O ejetor capilares glicérolico (T) e poliglicol-6 dibenzo (CO) são os componentes da mistura. O ejetor capilares glicérolico (T) e poliglicol-6 dibenzo (CO) são os componentes da mistura.

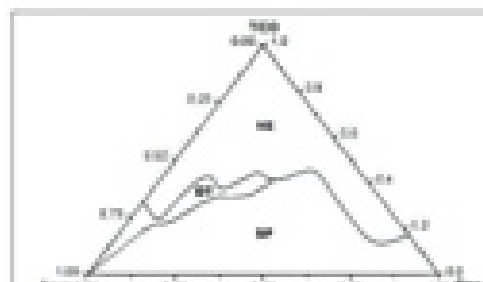


Fig. 6 - Diagrama de fase ternário obtido para o sistema PEG-8 ejetor capilares glicérolico (T) com poliglicol-6 dibenzo (CO) em água com surfactante. O ejetor capilares glicérolico (T) e poliglicol-6 dibenzo (CO) são os componentes da mistura. O ejetor capilares glicérolico (T) e poliglicol-6 dibenzo (CO) são os componentes da mistura.

zadas nos diagramas das **Figuras 3, 4 e 5**, estabelecendo-se as regiões de domínio das NEs. Durante as titulações, teve-se a tendência de padronizar a homogeneização para que um aumento inadequado da velocidade não proporcionasse a coalescência das gotículas, gerando resultados inadequados, além do tempo de observação ser padronizado em 3min.

Os sistemas NEs foram diferenciados dos demais por inspeção visual contra um fundo preto, uma vez que os demais sistemas se apresentaram como emulsão líquida

branco leitoso (ELBL), emulsão semioleosa (ESS), emulsão aquosa (EA), dispersão turva ou sistema turvo (DT) e separação de fases (SF). A partir dos dados das Figuras 2, 3, 4 e 5, observa-se uma larga faixa do lado de cima de cada diagrama, cujos destaques são as regiões de NEs, para qualquer proporção de DCO, aos quais foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada como sendo sistemas isotrópicos, cujas propriedades são utilizadas para revelar informações sobre a microestrutura interna dos sistemas (FORMISAKI *et al.*, 2007). Sendo assim, as NEs encontradas apresentaram apenas um índice de refração ($n = 1,39 \pm 0,01$), não havendo, portanto, nenhum desvio ou vibração da luz polarizada, ao qual se apresentaram com as mesmas propriedades ópticas em todas as direções, sejam com elevada ($\sim 90\%$) ou com baixa concentração ($\sim 30\%$) de água.

Segundo MACEDO (2007), as regiões do diagrama, particularmente com composição nas proximidades do eixo líquido óleo/água, onde a quantidade de surfactante é insuficiente para a formação de uma única fase, podem existir sob a forma de múltiplas fases, cuja complexidade aumenta com o número dos componentes da mistura. Estes sistemas multifásicos podem ser descritos pela classificação de Winsor (WINSOR, 1948). A Figura 6 mostra os resultados da classificação Winsor desta pesquisa, a qual foi possível determinar em condições experimentais as regiões limites de transição, ou seja, equilíbrio entre a fase emulsificada e a fase oleosa em excesso (Winsor I), equilíbrio entre a fase emulsificada e a fase aquosa em excesso (Winsor II), sistema trífásico óleo-emulsão-água (Winsor III) e formação de um sistema monofásico (Winsor IV), caracterizando as NEs. Nesta classificação, o sistema NE, geralmente explicado como sistema de liberação de fármacos é conhecido como sistema do Winsor IV.

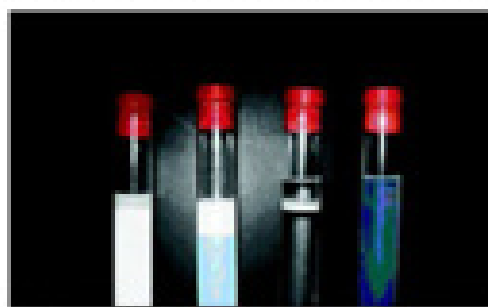


Fig. 6. Representação da classificação de Winsor, demonstrando as regiões limites de Winsor I, Winsor II, Winsor III e Winsor IV.

Durante o processo de produção dos sistemas NEs, selecionados a partir dos DFTT deste estudo, foi possível observar que a energia empregada e as proporções de seus componentes (óleo, água, tensoativo e co-tensoativo) foram apropriadas para reduzir a tensão interfacial até certo ponto e foi capaz de conduzir a formação de um sistema homogêneo, límpido e translúcido tipo Winsor IV que é característico de NE (WINSOR, 1948). Tal observação está em concordância com OSBORNE & WARD (1999), quando afirma que a estabilidade termodinâmica das NE é um fator de suma importância para os sistemas isotrópicos, pois, estas características resultam numa formulação cujas propriedades não dependem do processo de fabrica-

ção, ou seja, velocidade de rotação e esfriamento forçado e que não sofrem separação de fases, desde que a pressão e a temperatura permaneçam razoavelmente constantes.

CONCLUSÃO

A técnica empregada para a determinação do DFTT se mostrou bastante simples e reproduzível, onde foi possível determinar e identificar as várias regiões geradas como NE líquida e gel, emulsão líquida branca leitososa, emulsão aquosa, emulsão semioleosa e separação de fases, além de indicar a melhor combinação dos componentes das fórmulas em suas respectivas quantidades a fim de produzir um sistema mais estável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKER, R.C. & FLORENCE, A.T. Investigations into the Formation and Characterization of Microemulsions - I. Phase Diagrams of the Ternary System Water-Sodium Alkyl Sulfonate-Sulfuric Acid/The Quaternary System Water-Kyrol-Sodium Alkyl Sulfonate-Sulfuric Acid. *J. Colloid Interface Sci.*, 1980, p. 171-85, 1984.
2. CADETE, F. & PINHO, M. Polyelectrolyte microemulsions: some criteria to achieve an optimal formulation. *Colloid Surf. B*, 1997, p. 47-58, 1999.
3. COSTA, L.F.S. Estudo de interação de eletrólitos iônicos com micelas de surfactantes: Formulação e liberagem in vitro. 2007. 146p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacológicas), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita, São Paulo.
4. CHEN, H. & CHANG, S. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of proteins. *J. Control. Release*, v. 94, p.427-438, 2004.
5. CONSTANTINESCU, PP & SCALARI, J.P. Formulation and physical characteristics of water in oil microemulsions containing long-chain fatty acid ester-sphingolipids. *Int. J. Pharm.*, 1997, p.17-28, 1997.
6. SUCREQUIRO, L., PRINORAC, M., STORVA, M., KVALBERG, D. Characterization of nanostructured emulsions based on microemulsion drug delivery vehicles for an ophthalmic drug. *Int. J. Pharm.*, 2011, 371 (1-2) p. 1-11, 2009.
7. ESCOBARO, E., ORJENA, A.C., DIEZEL, J., ORACH, R. & DOMÍNGUEZ, J. Assessment of emulsions prepared with different formulations, and inflammatory study of a selected formula. *Int. J. Pharm. Sci.*, 1999, p.203-210, 2000.
8. DE OLIVEIRA, A.T. & ATWOOD, D. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia*. São Paulo, 1995, 300-330p.
9. FORMISAKI, T.P. Incorporação de doxorrubicina em microemulsões estáveis líquidas por hidratação a frio e estudo de estabilidade físico-química e *in vitro* análise de solubilizantes de células. 2004. 156p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacológicas), Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
10. FORMISAKI, T.P., URBAN, W.C.C., SILVA-JUNIOR, A.A., OLIVEIRA, W.F.D. & OLIVEIRA, A.O. Microemulsão e fase líquida emulsificada como sistemas de liberação de fármacos. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, 41(3) p.501-515, 2005.
11. FORMISAKI, T.P., SARAENTO, W.H. & SILVA-JUNIOR, A.A., SCARPA, W.C., SANTILLI, O.H. & OLIVEIRA, A.O. Doxorrubicina incorporada em microemulsão estabilizada por surfactante contendo água propileno-glicol. *Colloid Surf. B*, 51, p. 14-21, 2006.
12. FORMISAKI, T.P., OLIVEIRA, J.A., SARAENTO, W.H. & SANTILLI, O.H., EDIOTO, E.S.T. & OLIVEIRA, A.O. Relationship between structural features and *in vitro* release of doxorubicin from biodegradable emulsions. *Colloid Surf. B*, 52, p. 28-35, 2007.
13. JAFAROV, F. & GASPARYAN, M. Microemulsion as dermal drug delivery systems. *Pharmazie*, 2004, 59, p. 149-151, 2004.
14. KE, W.T., CHEN, S.Y., HO, H.O. & HSEH, M.T. Physical characterizations of microemulsion systems using lauryltrimethylammonium glycol 1000 succinate (TFO20) as a surfactant for the oral delivery of protein drugs. *J. Control. Release*, 1999, p.489-507, 2000.
15. LAMPRENE, W.J. & REES, D.G. Microemulsions based on novel drug delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 40, p. 49-74, 2000.
16. LEUNG, S. & SHAI, D.O. Microemulsions: An emerging technology for pharmaceutical applications. *Control. Release*, 1, p. 125-174, 1993.
17. MACEDO, J.F.F. Uso de diagramas ternários e HLB como ferramenta de previsão da estabilidade de sistemas emulsificados. 2005. 156p. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacológicas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

18. MENDONÇA, C. R. B., DE SA, E. D. & PATTON, C. M. S. Water-in-oil-in-oil emulsions: a vehicle for intravitreal administration. *J. Biol. Chem. Biol.*, 14(10) p 438-439, 2005.
19. OLIVEIRA, A. G., SOARES, W. V., CORREA, M. A., DEFA, L. R. & FORTINHA, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim. Nova*, 27(1) p 131-138, 2004.
20. DEBOPAR, D. W. & WARD, A. J. *Artificial emulsion vehicles in topical drug delivery vehicles. Topical drug delivery formulations*. M. Dekker, New York, 1998, pp 37-57.
21. FACIUNO, D., VENTURA, C. A., NETTO, S., PUGLISI, S. & FRESTA, W. Local administration for the topical administration of metoprolol: percutaneous absorption through human skin and *in vivo* human skin permeability. *Int. J. Pharm.* (249) p 21-27, 2002.
22. ROBERTI, F. G. *Microemulsões como sistemas de liberação cutânea para drogas lipofílicas*. Tese de doutorado na Escola de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Escola de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998).
23. SHAR, S. G. *Modelos, microemulsões and emulsões*. New York, 1998.
24. DE SA, E. D. O. Estudo de sistema microemulsionado para aplicação na pele e formulação de pomada 2007. Tese, Dissertação (Estrutura em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
25. DE SA, J. A., REOP, E. G. D., DAMASCENO, S. P. O., OLIVEIRA, A. G., COSTA, L. B. T. & SANTANA, D. P. Physico-chemical characterization and development of a microemulsion system for transdermal use. *J. Department Technol.* 2005 p. no year, 2005.
26. SPINON, A. G. & SHARPE, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration of zinc and enhances drug bioavailability *in vivo*. *J. Control Release*, 95(2) p 177-183, 2004.
27. SPINON, A. G. & BOUTIER, S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the *in vitro* permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *Int. J. Pharm.*, 271(1-2) p 55-62, 2004.
28. TAHA, M. O., AL-SHAZLI, M., ABULAMARA, F. & KHALL, F. Development of quantitative structure-property relationship models for pseudo ternary microemulsions formulated with various α -Picolinic acid derivatives: application of data mining and molecular modeling. *Can. J. Pharm. Sci.*, 10(7) p 407-416, 2008.
29. THOFA, M. & GABCO, M. P. Transdermal diffusion of fenestapipyrin in polyethylene therapy *in vitro* release from microemulsion. *Int. J. Pharm. Sci.*, 4 p 150-154, 1999.
30. WINDOR, P. A. *Hydrogels, Solubilization and Release/Encapsulation Processes, Part 1*. *Trans. American Soc.*, 44(3) p 170-198, 1948.

Autores correspondentes:
 José Alexandre de Sá
 E-mail: jsa@ufrpb.edu.br

5.1.3 PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND DEVELOPMENT OF A MICROEMULSION SYSTEM FOR TRANSDERMAL USE

Publicado no periódico: Journal of Dispersion Science and Technology, v. 31 (1), p. 1-8, 2010.

Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use

José A. Silva,^{1,2} Danilo C. G. Bedor,¹ Bolívar P. G. L. Damasceno,^{3,4} Anselmo G. Oliveira,⁵ E. Sócrates T. Egito,² and Davi P. Santana¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacéuticas, Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas, Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Controle (NDP/AC), Recife, Brazil

²Universidade Estadual de Paraíba, Departamento de Farmácia, Campus Grande/PR, Brazil
³Universidade Estadual de Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais e Aplicações, João Pessoa, Brazil

⁴Universidade Estadual Paulista, Departamento de Farmácia e Medicamentos, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas, Araraquara, Brazil
⁵Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Farmácia, Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID), Natal, Brazil

A microemulsion (ME) carrier system containing diclofenac diethylamine (DDA) was developed and physicochemically characterized. In addition, a methodology for analytical determination of DDA by UV-vis spectrophotometry was validated. The methodology used to produce the ME was simple and reliable, producing a stable ME system with a high DDA entrapment efficiency of 84.13%. The ME system presents a mean droplet size, conductivity, pH, refractive index and viscosity of around 35 nm, 300 $\mu\text{S cm}^{-1}$, 7.8, 1.099, and 119 mPa, respectively. Furthermore, the analytical method developed to evaluate the DDA content was validated and used to quantify DDA in the ME formulation.

Keywords: Diclofenac diethylamine, microemulsion, pseudo-ternary phase diagram, spectrophotometry, stability, validation

INTRODUCTION

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

approach of new drug delivery and properties at the nanometric scale.^[1]

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

Diclofenac diethylamine (DDA), a nonsteroidal anti-inflammatory drug, is able to form micelles and lyotropic liquid crystals in water.^[4] Besides, it interacts with the phospholipids of the skin and contributes to the increase of fluidity through the arachidonic cascade, thereby increasing the cutaneous permeability.^[5] DDA presents hepatic metabolism, a short life span, and a low partition coefficient. Yet, it does not metabolize on the skin and does not induce tolerance.^[6,8] The widely known pharmaceutical dosage form to carry DDA for transdermal use is a hydrophilic

Received 5 May 2008; accepted 21 May 2008

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

Address correspondence to E. Sócrates T. Egito, UFRN, CCS, Departamento de Farmácia (DF/AR), Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID), Rua Frei de Azeite Branco, 5048, 59064-905, Brazil. E-mail: socrates@ufrn.br or socrates@lspj.com.br

emulsion gel named Volhard Emulgel (Novartis, Basel, Switzerland). Such medicine contains a moisturizer, propylene glycol, and ethanol or isopropyl alcohol, which acts as an enhancer absorption agent and could induce skin irritation. Additionally, when diluted in conventional pharmaceutical dosage forms, like Emulgel, DDA usually cannot achieve a remarkable concentration on the target organism tissue due to the fact that between the application spot and the place where it must have its pharmacological effect are a number of biological barriers.^{15,17} This justifies its use in the ME formulation. The aim of this work was to develop and to characterize a transdermal DDA loading ME using a pseudo-ternary phase diagram as a tool to identify the regions of MEs, and to develop and to validate an analytical methodology to assess the amount of DDA into a ME.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DDA (Nortec Química, Brazil), polyethylenglycol-8 caprylic/capric glycerides (Labrasol, HLB=16.0) and polyglyceryl-6 dioleate (Pharol Oligoat, HLB=4.0) were kindly gifted from Genefosse (Lyon, France). Isopropyl myristate was supplied by Volp (Sao Paulo, Brazil). Water was purified using the Millipore Milli-Q Water System (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Methods

Construction of Phase Diagrams

Phase diagrams were built by visual inspection of the surfactant (S) and cosurfactant (CS) admixtures [polyethylenglycol-8 caprylic/capric glycerides (S) and polyglyceryl-6 dioleate (CS)] at the proportion of 4:1; 3:1; 2:1 and 1:1, to this S/CS admixture, isopropyl myristate (oil phase) was added in the proportions from 1:9 to 9:1, respectively. The ultrapure water type Milli-Q was treated

with an automatic pipette at ambient temperature, and the system was stirred with a magnetic shaker for 3 minutes. The transition from separated phase to optically clear microemulsion was seen and analyzed by naked eye against a black background.^{15,17} Each experimental assay was performed in duplicate.

Formulation Selection

After the construction of the phase diagram, 14 ME formulations (F1 to F14, Table I) were obtained from a certain region of these pseudo-ternary diagrams. The DDA was incorporated into the MEs at the concentration of 1% w/v. The MEs were prepared at the ambient temperature 48 hours before the incorporation of the DDA for system equilibrium.¹⁷

Microemulsion Characterization

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

DDA Encapsulation Efficiency for the MEs. The entrapment efficiency was assessed after centrifugation (11000g to 1400rpm) of 1 mL of each formulation for 30 minutes. The aim of this procedure was not to settle ME droplets, but to settle both metastable systems and DDA crystals not incorporated in the ME droplets. At the end of the centrifugation cycle, 50 µL of the supernatant were carefully extracted and diluted in 2400 µL of methanol.

TABLE I
Formulation composition (%) of ME systems chosen from specific points of the pseudo-ternary phase diagram

	4:1 (%)				3:1 (%)			2:1 (%)			1:1 (%)			
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14
Labrasol														
polyethylenglycol-8 caprylic/capric glycerides	36	40	32	24	37.5	30	22.5	23.3	33.3	35.3	25	15	15	25
Pharol oligoat														
polyglyceryl-6 dioleate	9.0	10	8.0	6.0	12.5	10	7.5	11.7	16.7	17.6	25	15	15	25
isopropyl myristate	5.0	15	10	5.0	15	10	5.0	15	15	5.0	20	32	20	15
Water	50	35	50	65	35	50	65	50	35	41.2	30	30	50	35
HLB	13.60	13.60	13.60	13.60	13.00	13.00	13.00	11.99	11.99	12.61	10.00	10.00	10.00	10.00

The entrapment percentage was determined from the Equation (1).

$$EE = \frac{Abs_{sup}}{Abs_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

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

Conductivity Measurements

Electrical conductivity (κ) of the formulation was measured using a conductometer (Model Combo HI 9129, Hanna, Brazil). The equipment was calibrated with a calibration solution of specific conductance (341.2 $\mu S/cm$) at 25°C. Each experimental assay was performed in triplicate, and the results were presented as mean \pm SD (standard deviation).

Rheological Measurements

The rheological properties of the Blank and the DDA-loaded MEs were determined using a controlled-stress (model Brookfield, Rheology International, Germany) with cone-plate geometry. The experiments were performed with a shear rate ($\dot{\gamma}$) in the range of 0–100 1/s. The used shear rate regions were selected due to the existing abilities against the applied stresses. The rheological measurements ($n = 3$) were performed for both, up- and down-curves.²⁷

pH Evaluation

The pH values of the samples were measured ($n = 3$) at 25 \pm 0.2°C, in a pre-calibrated pH meter (model Checker, Hanna Instruments, Vila do Conde, Portugal). The electrode was placed directly into the formulation stored into sterilization flasks (15 mL).

Refractive Index Measurements

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

Macroscopic Appearance

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

Particle Size Evaluation

The particle size analysis was performed using a photon correlation spectroscopy apparatus (Brookhaven Instruments Corp., Model EMI 900). Prior to analysis, the samples were diluted with ultrapure Milli-Q water and filtered (0.22 μm). The size measurements were carried out at a fixed angle of 90°. The correlator was operated in parallel

mode and the cumulant method of analysis was used to calculate the mean droplet size according to the intensity of scattered light (Z -average diameter). The results are the mean and SD of the least of 10 measurements of the samples.²⁷ The measurements were performed at 25 \pm 0.2°C.

Validation Parameters for Blank and DDA Loaded ME

Selectivity or Specificity. The selectivity was determined comparing the spectrophotometric analyses at 282 nm of the blank and the DDA-loaded ME at 1% (w/v).^{27,28}

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

Precision. Precision of the method (repeatability, inter-mediate precision, and reproducibility) was determined by dilution (1:500) of the DDA-loaded ME at 1% (w/v) in order to obtain a 20 $\mu g/mL$ DDA concentration. Each experimental assay was performed in sextuplicate.

Accuracy. The accuracy describes the average proximity of the results obtained in a test, in a given concentration, and in relation to the real value; that is, the relation between the one found by the method and that accepted as true or referential, usually determined by three triplicate analyses, at least one at low, other at medium, and another at high concentration.^{27,28}

Robustness. The robustness of the method was observed through variations of the methanol brand (different suppliers) and the samples preparation technique (manual and ultrasonic shaking for 5 minutes).^{27,28,31}

RESULTS AND DISCUSSION

Phase Diagram

The specific composition of the mixtures allowed a large variety of formulations with different properties and was, therefore, very appropriate as a vehicle for transdermal administration of drugs such as diclofenac diethylamine. Compared with the work of Kriest and Mallogoymann,²⁷ our ME did not use phospholipids, which could make the ME production difficult and could increase the price of the final product.

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

system (MEG), Figure 1. On the right side of each pseudo-ternary diagram, a large ME region can be observed by any S/CS ratio. On the other hand, only the 1:1 S/CS ratio produces a small MEG region at the bottom of the pseudo-ternary diagram. From these regions, 14 formulations with a HLB (hydrophilic-lipophilic balance) range from 10.00 to 13.00 were chosen for further studies (Table 1). In addition, it was checked that the incorporation of the DDA did not interfere or alter these formulations, keeping them isotropic and optically transparent characteristic, even after centrifugation at 10000g for 30 minutes.

During the ME production process, the energy used and the proportions of the components (oil, water, surfactant, and cosurfactant) were appropriate for reducing the interfacial tension sufficiently to produce homogeneous, clear, and transparent systems with a Winsor IV characteristic.⁷⁰ After the DDA incorporation, the systems remained with the same optical property in all selected formulations. This could be due to location of DDA into the oil core of the

O/W microemulsion with the hydrophilic region of the molecule in the oil-water interface that did not disturb the Winsor IV behavior of the system. In fact, like DDA has a low partition coefficient (K_p , 0.078) remaining partitioned between the oil phase and the interfacial region of the system.⁷⁴

Formulation Characterization

DDA Entrapment Efficiency for the ME

The average entrapment efficiency value of DDA in the formulations was $89.60 \pm 14.19\%$ (Table 2). Additionally, after the centrifugation process, no modifications such as precipitation of DDA crystals were observed. However, when the S/SC proportion was 1:1 (formulations F11 to F14) and the oil phase was at the higher value (20%), the entrapment efficiency dropped to around 70%. This was probably due to the high amount of oil phase and low concentration of surfactants that produce larger oil droplets and reduce the interfacial area of the ME. These data reveal that DDA molecules were strongly bound to the

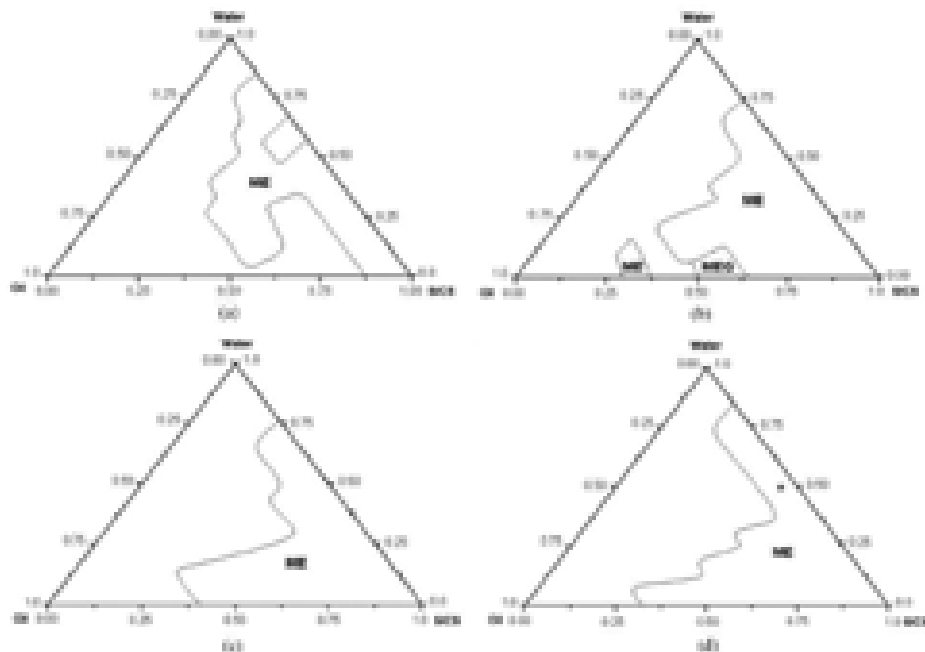


FIG. 1. Pseudo-ternary phase diagram for the systems containing PEG-4 capryl/capric glycolide (S), polyglycerol-4 dibenzo (CS), isopropyl myristate (phase oil) and water for S/CS ratios of (a) 1:1, (b) 2:1, (c) 3:1, and (d) 4:1. Key: (ME) microemulsion, (MEG) gel-like microemulsion. (*) HLB ME formulation (HLB=11.00).

TABLE 2
Entrapment efficiency of DDA-loaded MEs

Formulation	Before centrifugation		After centrifugation		
	Abs	DDA load ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Abs	DDA load ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	DDA loaded (%)
F1	0.73 \pm 0.00	19.71 \pm 0.07	0.73 \pm 0.00	19.67 \pm 0.09	99.56 \pm 0.59
F2	0.90 \pm 0.03	24.20 \pm 0.76	0.80 \pm 0.00	21.40 \pm 0.05	88.90 \pm 2.76
F3	0.77 \pm 0.02	20.77 \pm 0.49	0.79 \pm 0.01	21.23 \pm 0.39	102.19 \pm 0.70
F4	0.77 \pm 0.00	20.74 \pm 0.07	0.70 \pm 0.01	20.90 \pm 0.17	100.74 \pm 0.75
F5	0.79 \pm 0.02	21.13 \pm 0.44	0.77 \pm 0.00	20.66 \pm 0.07	97.64 \pm 2.15
F6	0.77 \pm 0.01	20.69 \pm 0.22	0.70 \pm 0.01	20.09 \pm 0.13	100.99 \pm 0.49
F7	0.75 \pm 0.02	20.25 \pm 0.40	0.77 \pm 0.01	20.00 \pm 0.19	101.03 \pm 1.15
F8	0.94 \pm 0.02	25.20 \pm 0.42	0.82 \pm 0.04	21.91 \pm 1.20	96.93 \pm 3.43
F9	0.82 \pm 0.01	22.00 \pm 0.15	0.80 \pm 0.01	21.70 \pm 0.14	97.64 \pm 1.20
F10	0.82 \pm 0.01	22.14 \pm 0.30	0.83 \pm 0.01	22.40 \pm 0.20	101.16 \pm 0.74
F11	1.00 \pm 0.01	20.65 \pm 0.16	0.77 \pm 0.01	20.62 \pm 0.13	71.39 \pm 1.39
F12	1.00 \pm 0.00	20.45 \pm 0.09	0.73 \pm 0.02	19.71 \pm 0.55	69.20 \pm 1.72
F13	1.00 \pm 0.01	20.64 \pm 0.25	0.71 \pm 0.02	19.14 \pm 0.49	68.00 \pm 1.63
F14	1.00 \pm 0.01	20.33 \pm 0.33	0.75 \pm 0.01	20.15 \pm 0.13	68.53 \pm 0.49
Mean	—	—	—	—	89.6 \pm 14.19

ME oil droplets (Table 2). Such phenomenon was responsible for the high stability of the ME systems. In fact, taking into account the pK_a value of DDA as 4.87,²¹ in the pH value of 7.05 observed for DDA-loaded ME, DDA is mostly in the molecular state and can be favorably partitioned into oil droplets by hydrophobic effect.²²

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

Because DDA is a weak alkali (pK_a of 4.87), when this molecule is dispersed in a pH higher than its pK_a , it tends to remain in the molecular state, generating molecular arrangements in the aqueous phase resulting in a viscosity and conductivity increase.²³ In fact, the results of these characterizations of F1 show that not only was the pH

parameter not so affected by the presence of the DDA, but also the pH change was slight, from 6.55 for the F1 Blank ME to 7.09 for the F1 DDA-loaded ME.

Because of its dynamic nature and the small size of the ME droplets of $40.1 \pm 3.9\text{nm}$ and $61.1 \pm 1.0\text{nm}$ for the F1 Blank ME and the F1 DDA-loaded ME, respectively, the direct examination of the formulation was quite difficult. Therefore, it was necessary to use indirect techniques such as α measurement and rheology determination to obtain information about the structure of the system.^{24,25}

As was reported, the α of the F1 formulation was modified with the addition of DDA, since the values of the F1 Blank ME and the F1 DDA-loaded ME were 294.7 ± 0.17 and $364.8 \pm 2.0 \mu\text{S}/\text{cm}$, respectively (Table 3). In fact, the diethylamine grouping increases this value due to the presence of this cation in the aqueous phase.^{26,27}

In order to explore the system as to the kind of ME, an α monitoring in relation to the volume fraction of the aqueous phase (Φ_w) was performed (Figure 2). Thus, bicontinuous ME structures were identified. These structures may vary with the increase in the water fraction and depend directly on the kind of the surfactant used.²⁸

TABLE 3
Results of the characterization of the F1 DDA-loaded ME and the F1 Blank ME formulations

	pH	Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Refractive index	Apparent viscosity (mPa)
F1 Blank ME	6.55 \pm 0.04	294.7 \pm 0.57	1.399 \pm 0.001	106.84 \pm 3.68
F1 DDA-loaded ME	7.09 \pm 0.03	364.8 \pm 2.0	1.420 \pm 0.010	113.92 \pm 0.76

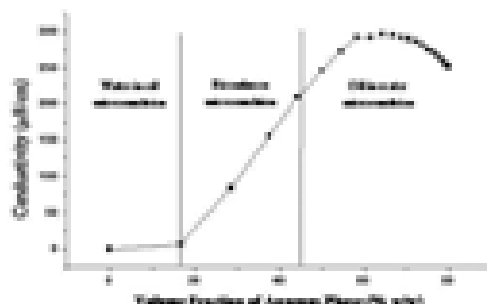


FIG. 2. Electrical conductivity as a function of volume fraction of aqueous phase in the FI formulation at 27°C ($n = 3$).

Figure 2 shows that in low water ratios (until $\Phi_w \approx 10\%$ w/v), σ was practically independent of the fraction volume of the aqueous phase added to the system followed by a linear increase region until $\Phi_w \approx 45\%$ w/v; after that, the system reached a maximum with a subsequent small decrease. This behavior can be explained, since the conductivity curve reveals the existence of three structural regions: w/o ME with $\Phi_w < 10\%$ w/v; bicontinuous ME with 10% w/v $< \Phi_w < 45\%$ w/v, and o/w ME with $\Phi_w > 45\%$ w/v. The region where σ increases linearly with Φ_w is called critical percolation (Φ_{wp}), and a possibility of an ultracritical percolation (Φ_{up}) can also be reported.^[24]

Rheological analysis consists of the study of the outflow or deformation of the material when submitted to a shear tension. The method is applicable to the characterization of ME systems because the behavior of the fluid is directly

related to the kind and degree of organization of the system. In addition, it can be used to check the quality during the production process, allowing a study of the DDA-addition effect on the formulation.^[24] The result of the rheological parameter shows that both systems, FI DDA-loaded ME and FI blank ME, were time-independent Newtonian fluids because their viscosity remains constant with the shearing speed applied. It also shows a superposition of the ascending and descending curves with a small standard deviation (Figure 3). Therefore, the presence of DDA does not disturb the rheological properties of the MEs.

The refraction index results show that the obtained values, between the FI blank ME (1.399 ± 0.001) and the FI DDA-loaded ME (1.420 ± 0.000), were not significant (Table 3). Therefore, the presence of DDA does not alter the transparency of the ME system, which confirms that DDA was inserted in a molecular state in the interfacial layer of the ME and this process does not disturb its stability. In fact, these parameters are used as stability loss indicators of MEs in different temperatures and storage organizations, and may also influence the location and stability of the drug in the system.^[25]

Particle Size Analysis

Because the viscosity of the systems may lead to an experimental determination error,^[27] the dynamic light scattering technique, which use a diffusion process,^[27] was employed to determine the size of the mono-disperse droplets.^[21,28-30] Such technique is based on the Brownian dispersion movement of the droplets, which is dependent of their diffusion coefficients.^[29]

Table 4 shows the diameter and the polydispersity index (PDI) of the investigated system. A monomodal

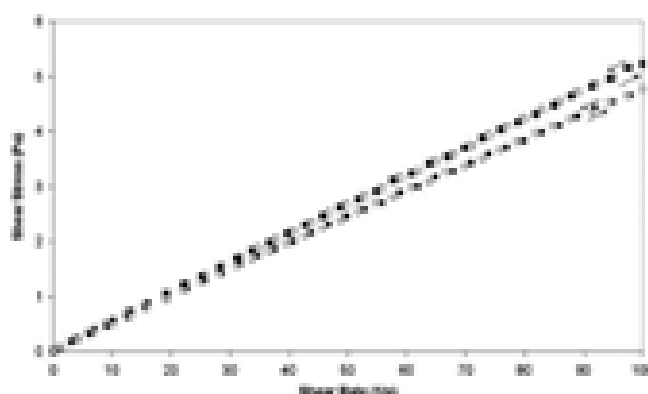


FIG. 3. Rheological behavior of the FI DDA-loaded ME (■) and the FI blank ME (□) of the phase diagram at surfactant:monofunctional ratio 4:6.

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

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

and homogeneous distribution of the droplets and a low PDI can be observed. Since the system remained homogeneous, the addition of the DDA did not cause a high increase in the size of the droplets and its PDI. However, the slight increase on the ME droplets may be a consequence of the location of the DDA, in the oil core with the hydrophobic region of the molecule in the interfacial region, increasing the diameter of the structures. This phenomenon was confirmed by the increase of the α , which was almost doubled for DDA-ME (Table 3). The low diameter of the ME droplets, smaller than 200nm, allows the use of such system by transdermal application.¹³⁰ In fact, the literature describes that systems presenting small droplets after their transdermal application can be used as prolonged liberation systems.¹³¹

Development and Validation of DDA Analytical Methodology

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

Spectrophotometric analysis of the F1 blank ME and the F1 DDA-loaded ME showed that the F1 blank was not absorbed at $\lambda = 282$ nm demonstrating the specificity of the method for the DDA quantification. The linearity of the experiment was tested with a stock solution (100 μ g/mL) dissolved in methanol, with concentrations in the range of 5 to 35 μ g/mL (Table 5). The statistic analysis of the obtained results by linear regression through the minimum square method was validated using the variance analysis (ANOVA). The LLOD and LLOQ were 0.0094 μ g/mL and 0.0210 μ g/mL, respectively.

The repeatability (intra-assay precision) and reproducibility (interlaboratorial precision) were evaluated from the injections in vials/packets¹³² in which the analyzed concentration of 20 μ g/mL was chosen for representing the average spot of the specified interval by the procedure (5 to 35 μ g/mL on the analytical curve) and expressed by the relative standard deviation (RSD%) of the Laboratories 1 and 2 (2.18% and 2.33%, respectively). The reproducibility

TABLE 5
Linearity of the assay from a stock solution of 100 μ g of DDA/mL in methanol (mean, precision, and accuracy)

Concentration (μ g/mL)	Mean (μ g/mL) (n = 3)	Precision (%)	Accuracy (%)
5.00	5.12 \pm 0.23	4.47	98.27
10.00	10.42 \pm 0.25	2.44	100.74
15.00	15.38 \pm 0.57	3.72	101.28
20.00	20.58 \pm 0.60	2.91	100.70
25.00	25.32 \pm 0.98	3.88	99.46
30.00	30.57 \pm 1.04	3.39	99.23
35.00	35.58 \pm 1.51	4.26	98.85

(interlaboratorial accuracy) was done by different laboratories, machines, and analysts and on different days^{133,134} without any statistically significant difference (Table 6).

The accuracy of the method was determined after the linearity and specificity studies, by checking it from nine determinations, including the interval of the linear procedure, three replicates of low concentration (10 μ g/mL, RSD = 0.42%), three replicates of medium concentration (20 μ g/mL, RSD = 1.82%), and three replicates of high concentration (30 μ g/mL, RSD = 1.30%). The accuracy was within the expected variation, due to the fact that the variation coefficient (VC) was not higher than 5% in any of the analytical determinations, and the values of $F_{\text{max/min}}$ on the three concentrations were always below the values of $F_{\text{table}} = 4.30$ in all concentrations when compared with the standard solutions.

It was also noticed that the method possesses an intrinsic robustness as well because it maintained its response, in triplicate, among the variations of the methanol brands and different suppliers (20.88 \pm 0.13 μ g/mL and 20.77 \pm 0.59 μ g/mL, respectively) and the technique for the preparation of the samples, manual shaking, and ultrasonic for 5 minutes (20.88 \pm 0.11 μ g/mL and 20.76 \pm 0.08 μ g/mL, respectively). According to Ribani,¹³⁵ if the changes are within the limits of acceptable precision and accuracy,

TABLE 6
Intraday and interday precision of the F1 DDA-loaded ME

Analyst	Day	Mean (μ g/mL) (n = 6)	Precision (%)	Accuracy (%)
Analyst 1	1	19.652 \pm 0.763	3.88	98.26
	2	19.840 \pm 0.345	1.74	99.20
Analyst 2	1	19.300 \pm 0.828	4.29	96.50
	2	20.129 \pm 0.711	3.50	101.64

the method is robust, and such variations can be incorporated into the analytic procedures.

CONCLUSION

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

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

REFERENCES

- Tera, H.E. (2005) *Quim. Nova*, 28: 548-551.
- Formaria, T.P., Urban, M.C.C., Finioz, A.A.S., Grenillo, M.P.D., and Oliveira, A.G. (2003) *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 41: 301-311.
- Oliveira, A.G., Scarpa, M.V., Correa, M.A., Coss, L.F.R., and Formaria, T.P. (2004) *Quim. Nova*, 27 (1): 116-118.
- Klein, K. and Mullerpyshmann, C.C. (1993) *Int. J. Pharm. Biopharm.*, 10 (6): 294-298.
- Buchanan, B., Calpeza, A.C., Querdt, J., Otach, R., and Demicheli, J. (2003) *Int. J. Pharm. Sci.*, 19 (6): 203-210.
- Djordjevic, L., Primona, M., and Skapar, M. (2005) *Int. J. Pharm.*, 298 (1-2): 73-79.
- Klein, K. and Mullerpyshmann, C.C. (1995) *Int. J. Pharm.*, 124 (2): 231-242.
- Chen, H.B., Chang, X.L., Wang, T., Zhao, X.Z., Guo, Z.H., Yang, Y.J., Xu, H.B., and Yang, X.L. (2004) *J. Control. Release*, 99 (3): 427-436.
- Comaromiro, P.P. and Sotier, J.P. (1997) *Int. J. Pharm.*, 158 (1): 37-48.
- Djordjevic, L., Primona, M., Skapar, M., and Krpanik, D. (2004) *Int. J. Pharm.*, 271 (1-2): 13-19.
- Ko, W.T., Lin, S.Y., Ho, H.O., and Shen, M.T. (2003) *J. Control. Release*, 102 (2): 489-500.
- Petrilli, M.A., Telo, V.R.M., Amaral, L.Q., and Ferraz, B. (2003) *Colloid Surf. J. Physicochem. Eng. Ap.*, 261 (1-3): 150-158.
- Senise, A.C. and Soares, L. (2004) *J. Control. Release*, 95 (2): 175-183.
- Mirvis, S.L. and Rzesutka, M.O.O. (2004) *Quim. Nova*, 27 (2): 301-305.
- Formaria, T.P., Sacramento, V.B.V., Silva-Junior, A.A., Scarpa, M.V., Sacchi, C.V., and Oliveira, A.G. (2005) *Colloid Surf. J. Sci. (T)*, 24-41.
- International Conference on Harmonization. (2005) In *Methodology*, V. O. A. P., Ed. QSA (CPMP/ICH/281/95).
- Senise, M.B. and Krol, I.S. (1997) *Analytical Method Development and Validation*, New York: Marcel Dekker.
- Convention, C.I.P. (1995) *OSP-24. Validation of Compensal Methods*.
- International Conference on Harmonization. (1994) In *Harmonized technical guidelines. Validation of analytical procedures: test and methodology*, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use.
- Coss, Q.B. and Degens, A.L.G. *Determinação de substncia por HPLC - Fundamentos, metodologia e validao*. Editora da UFSCar: São Carlos.
- Santos, R.S., Senise, B.A.A., Silva, J.A., and Sacramento, D.P. (2005) *Revista Brasileira de Farmácia*, 16 (3): 15-21.
- Winnic, P.A. *Hydrogels, Gelatination, and Related Emulsification Processes*. Part 1. *Trans. Faraday Soc.*, 44 (5): 178-190.
- Ferreira, F.R., Feresca, L.A.A., Sousa, K.B., Silva, A.K.A., Macedo, J.P.F., Arrigo, J.R., Senise, L.A.L., and Egitto, E.S.T. (2007) *International Journal of Pharmaceutics*, 344 (1-2): 138-140.
- Kubicek, M., Stry, R., Hanzl, D., Kucinski, H., Schmalzing, T., Fuchsbauer, B., Berlekamp, M., Hahn, H.P., et al. (1997) *J. Control. Release Soc.*, 118 (2): 436-453.
- Stry, R. (1994) *Rev. Cienc. Farm.*, 10: 33-46.
- Ferreira, T., Campos, A., and Teixeira, H. (2004) *Acta Farm. Bras.*, 25 (4): 538-544.
- Aboukhat, R., Barlow, D.J., and Lawrence, M.J. (2000) *JAPPS Pharm. Sci.*, 2 (3), art. no. 19.
- Lawrence, M.J. and Ben, G.D. (2000) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 45 (1): 19-32.
- Ortizales, D. and Glaser, O. (2002) *Chem. Phys. Lipids*, 107: 179-189.
- Lundberg, B.B., Mierlinar, B.C., and Redgrave, T.G. (1994) *Int. J. Pharm.*, 104 (2): 125-127.
- Troita, M. (1998) *J. Control. Release*, 40 (2-3): 399-403.
- Ribani, M., Botto, C.B.G., Collins, C.H., Berlin, I., and Melo, L.F.C. (2004) *Quim. Nova*, 27 (2): 771-782.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Astier A. Formes galéniques nouvelles en cancérologie. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2006;64(1):23-35.
2. Streisand JB, Stanley TH. Newer drug delivery systems. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 1995;6(2):113-20.
3. Dalmora ME, Dalmora SL, Oliveira AG. Inclusion complex of piroxicam with [beta]-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;222(1):45-55.
4. Karasulu HY. Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2008 Jan;5(1):119-35.
5. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2000 Dec 6;45(1):89-121.
6. Vyas TK, Babbar AK, Sharma RK, Singh S, Misra A. Preliminary brain-targeting studies on intranasal mucoadhesive microemulsions of sumatriptan. *AAPS Pharmscitech*. 2008;7(1):E1-E9.
7. Constantinides PP, Scalart JP, Lancaster C, Marcello J, Marks G, Ellens H, et al. Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation of water-in-oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. *Pharmaceutical Research*. 1994 Oct;11(10):1385-90.
8. Ho HO, Hsiao CC, Sheu MT. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996 Feb;85(2):138-43.
9. Tenjarla S. Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 1999;16(5):461-521.
10. Farnier M, Davignon J. Current and future treatment of hyperlipidemia: The role of statins. *The American Journal of Cardiology*. 1998;82(4, Supplement 2):3J-10J.
11. Sarr FS, Andre C, Guillaume YC. Statins (HMG-Coenzyme A reductase inhibitors)-biomimetic membrane binding mechanism investigated by molecular chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2008;868(1-2):20-7.
12. Campo VL, Carvalho I. Hypolipemic statins and new therapeutic trends. *Química Nova*. 2007;30(2):425-30.
13. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2005;45:89-118.
14. Rego ACM, Araújo Filho I, Damasceno BPGL, Egito EST, Silveira IA, Brandão-Neto J, et al. Simvastatin improves the healing of infected skin wounds of rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2007;22(Suppl. 1):57-63.

15. Souza-Neto JL, Araújo-Filho I, Rego AC, Dominici VA, Azevedo IM, Egito EST, et al. Effects of simvastatin in abdominal sepsis in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006;21(4):8-12.
16. Bolard J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochimica et Biophysica Acta*. 1986 Dec 22;864(3-4):257-304.
17. Gaboriau F, Cheron M, Leroy L, Bolard J. Physico-chemical properties of the heat-induced 'superaggregates' of amphotericin B. *Biophysical Chemistry*. 1997 May 21;66(1):1-12.
18. Gold W, Stouth A, Pagano JF, Donovan R. Amphotericins A and B antifungal antibiotics produced by streptomycete. *Antibiotics Annual*. 1955/1956:579-86.
19. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action. *Antibiotic Agents and Chemotherapy*. 1990 Feb;34(2):183-8.
20. Latorre FP, Sánchez OD, Rabanal MVA. Paciente con aspergilosis pulmonar: Indicación de la administración de una mezcla iv de anfotericina B en intralipid 20%. *Farmácia Clínica*. 1995;12(1):31-4.
21. Hong Y, Shaw PJ, Tattam BN, Nath CE, Earl JW, Stephen KR, et al. Plasma protein distribution and its impact on pharmacokinetics of liposomal amphotericin B in paediatric patients with malignant diseases. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2007;63(2):165-72.
22. Tasset C, Goethals F, Preat V, Roland M. Effect of polyoxyethyleneglycol (24) cholesterol on the solubility, toxicity and activity of amphotericin B. *International Journal of Pharmaceutics*. 1990 JAN 15;58(1):41-8.
23. Moreno MA, Frutos P, Ballesteros MP. Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B. *Pharmaceutical Research*. 2001 Mar;18(3):344-51.
24. Pestana KC, Formariz TP, Franzini CM, Sarmiento VHV, Chiavacci LA, Scarpa MV, et al. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2008;66(2):253-9.
25. Egito EST, Araujo IB, Damasceno BPGL, Price JC. Amphotericin B/emulsion admixture interactions: An approach concerning the reduction of amphotericin B toxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002 Nov;91(11):2354-66.
26. Egito EST, Fessi H, Appel M, Barratt G, Legrand P, Bolard J, et al. A morphological study of an amphotericin B emulsion-based delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996 Dec 6;145(1-2):17-27.
27. Kawakami K, Yoshikawa T, Hayashi T, Nishihara Y, Masuda K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs ii. In vivo study. *Journal of Controlled Release*. 2002 May 17;81(1-2):75-82.
28. Kawakami K, Yoshikawa T, Moroto Y, Kanaoka E, Takahashi K, Nishihara Y, et al. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs i. Prescription design. *Journal of Controlled Release*. 2002 May 17;81(1-2):65-74.

29. Langevin D. Microemulsions. *Accounts of Chemical Research*. 1988;21(7):255-60.
30. Rosano HL. Microemulsions. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. 1974;25(11):609-19.
31. Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002 Nov 1;54:S77-S98.
32. Winsor PA. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes .1. To .4. *Transactions of the Faraday Society*. 1948;44(6):376-98.
33. Lawrence MJ. Microemulsions as drug delivery vehicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 1996 Dec;1(6):826-32.
34. Aboofazeli R, Lawrence CB, Wicks SR, Lawrence MJ. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant. *International Journal of Pharmaceutics*. 1994 Oct 6;111(1):63-72.
35. Aboofazeli R, Lawrence MJ. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. II. Pseudo-ternary phase-diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and alcohol: Influence of purity of lecithin. *International Journal of Pharmaceutics*. 1994 May 16;106(1):51-61.
36. Shinoda K, Araki M, Sadaghiani A, Khan A, Lindman B. Lecithin-based microemulsions - phase-behavior and microstructure. *Journal of Physical Chemistry*. 1991 Jan 24;95(2):989-93.
37. Gao ZG, Choi HG, Shin HJ, Park KM, Lim SJ, Hwang KJ, et al. Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for oral delivery of cyclosporin a. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998 Feb 9;161(1):75-86.
38. Darole PS, Hegde DD, Nair HA. Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(1):122-8.
39. Esposito E, Bortolotti F, Menegatti E, Cortesi R. Amphiphilic association systems for amphotericin b delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003 Jul 24;260(2):249-60.
40. Fialho SL, da Silva-Cunha A. New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2004 Dec;32(6):626-32.
41. Silva JA, Bedor DCG, Damasceno BPGL, Oliveira AG, Egito EST, Santana DP. Physicochemical characterization and development of a microemulsion system for transdermal use *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2010;31(1):1-8.
42. Silva JA, Santana DP, Bedor DGC, Borba VFC, Lira AAM, Egito EST. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão *gel-like*. *Química Nova*. 2009;32(6):1389-93.

43. Carbonell T, Freire E. Binding thermodynamics of statins to HMG-CoA reductase. *Biochemistry*. 2005;44(35):11741-8.
44. Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006;112(1):71-105.
45. Namazi MR. Statins: Novel additions to the dermatologic arsenal? *Experimental Dermatology*. 2004;13(6):337-9.
46. Vandeputte J, Wachtel JL, Stiller ET. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. II. The isolation and properties of crystalline amphotericins. *Antibiotics Annual*. 1955/1956:587-91.
47. Espuelas MS, Legrand P, Irache JM, Gamazo C, Orecchioni AM, Devissaguet JP, et al. Poly(epsilon-caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. *International Journal of Pharmaceutics*,. 1997 Dec 1;158(1):19-27.
48. Pascual B, Ayestaran A, Montoro JB, Oliveras J, Estibalez A, Julia A, et al. Administration of lipid-emulsion versus conventional amphotericin B in patients with neutropenia. *Annals of Pharmacotherapy*. 1995 Dec;29(12):1197-201.
49. British pharmacopoeia. London: Stationery Office; 2001.
50. Nahar M, Mishra D, Dubey V, Jain NK. Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2008;4(3):252-61.
51. Strauss G, Kral F. Borate complexes of amphotericin B polymeric species and aggregates in aqueous solutions. *Biopolymers*. 1982;21(2):1-12.
52. Filippin FB, Souza LC, Maranhao RC. Amphotericin B associated with triglyceride-rich nanoemulsion: Stability studies and in vitro antifungal activity. *Quimica Nova*. 2008;31(3):591-4.
53. Czub J, Borowski E, Baginski M. Interactions of amphotericin b derivatives with lipid membranes--a molecular dynamics study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2007;1768(10):2616-26.
54. Baginski M, Sternal K, Czub J, Borowski E. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochimica Polonica*. 2005;52(3):655-8.
55. James PR, Rawlings BJ. Probing the mechanism of action of amphotericin B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1996;6(5):505-8.
56. Herve M, Debouzy JC, Borowski E, Cybulska B, Garybobo CM. The role of the carboxyl and amino-groups of polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity - a p-31-nmr study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1989 Apr 28;980(3):261-72.
57. Ellis D. Amphotericin B: Spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002 Feb;49:7-10.

58. Antoniadou A, Dupont B. Lipid formulations of amphotericin B: Where are we today? *Journal de Mycologie Médicale*. 2005;15(4):230-8.
59. Karie S, Launay-Vacher V, Deray G, Isnard-Bagnis C. Toxicité rénale des médicaments. *Néphrologie & Thérapeutique*. 2010;6(1):58-74.
60. Bekersky I, Fielding RM, Buell D, Lawrence I. Lipid-based amphotericin B formulations: From animals to man. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 1999;2(6):230-6.
61. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Chemaly R, Raad, II, Kontoyiannis DP. Effects of liposomal amphotericin b versus an amphotericin B lipid complex on liver histopathology in patients with hematologic malignancies and invasive fungal infections: A retrospective, nonrandomized autopsy study. *Clinical Therapeutics*. 2007;29(9):1980-6.
62. Juliano RL, Grant CWM, Barber KR, Kalp MA. Mechanism of the selective toxicity of amphotericin B incorporated into liposomes. *Molecular Pharmacology*. 1987 Jan;31(1):1-11.

7. ABSTRACT

Several pharmaceutical products have been developed in recent years aiming to enhance the treatment of diseases by increasing the effectiveness of drugs. Many of these new products are based on new drug delivery systems. Among these, microemulsions, which were first studied in 1943 by Hoar and Schulman, is of great interest. Microemulsion can be defined as a thermodynamically stable, isotropic, translucent and transparent system of two immiscible liquids stabilized by a surfactant film located in the oil / water interface. The aim of this work was the incorporation of Amphotericin B and Simvastatin to a microemulsion system and analyzes its physicochemical properties and their therapeutical activity when incorporated into this system. Some very promising results were achieved as the reduction of the toxicity and maintenance of the efficacy of the Amphotericin B incorporated into a microemulsion, which was demonstrated in the *in vitro* pharmacotoxicological study. As for the incorporation of Simvastatin in microemulsion, it was observed a significant improvement in the potential anti-inflammatory and anti-infective properties when the system was used to treat infected wounds (simvastatin pleiotropic effects). Therefore, it can be concluded that the incorporation of these drugs into microemulsion system reveals the potential of microemulsions as a promising and novel dosage form, qualifying them for future trials in order to make them available in the pharmaceutical market.

KEYWORDS: amphotericin B, microemulsion, new drug delivery system, pharmacotoxicity, pleiotropic effects, simvastatin.