Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Dissertação de Mestrado

Cinética de difusão *in vitro* e atividade *in vivo* de preparações magistrais de cetoprofeno

ANDRÉ LUIS MENEZES CARVALHO

Mestre

RECIFE, 2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Dissertação de Mestrado

Cinética de difusão *in vitro* e atividade *in vivo* de preparações magistrais de cetoprofeno

Dissertação de mestrado aprovada pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa: Produção e Controle de Medicamentos.

Mestrando: André Luis Menezes Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Co - orientador: Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

Recife, 2007

Carvalho, André Luis Menezes

Cinética de difusão *in vitro* e atividade *in vivo* de preparações magistrais de cetoprofeno / André Luis Menezes Carvalho. – Recife: O Autor, 2007.
vii, 73 folhas : il., tab., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2007.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Medicamentos – Cinética de difusão *in vitro*. 2. Medicamentos – Farmácia magistral. 3. Cetoprofeno. I. Título.

615.012 CDU (2.ed.) UFPE
615.19 CDD (22.ed.) CCS2007-88

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 26 de janeiro de 2007.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA,** por decisão unânime, em 26 de Janeiroo de 2007 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque ((Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Fálba Bernadete Ramos dos Anjoss (Deptº de histologia da Universidade Federal de pernambuco).

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor

Amaro Henrique Pessoa Lins

Vice – Reitor

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Pró-Reitor para assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Celso Pinto de Melo

Diretor de Ciências da Saúde – CCS

José Thadeu Pinheiro

Vice – Diretor do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Jane Sheila Higino

Vice – Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Samuel Daniel de Souza Filho

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Pedro José Rolim Neto

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Beate Saegesser Santos

Dedico este trabalho a toda a minha família que mora no Piauí, em especial a Maria Meneses (mãe), Nair Menezes (avó) por estarem sempre do meu lado em todos os momentos de minha vida. Agradeço a Deus por ter mães tão especiais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar meus caminhos, fortalecer minha determinação e está presente em todas as minhas conquistas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, pelo apoio, confiança, aprendizagem e pela excelente oportunidade de poder participar de sua equipe.

Ao Professor Drº. Erivaldo Sócrates e a toda equipe do LASID – UFRN pelas orientações, principalmente no início de nossas atividades.

À Profª. Drª. Miracy Muniz e toda a sua equipe, pela disponibilidade e apoio, em especial: Ruth, Rosário, Júnior Ceará e Rosana.

Ao Prof. Dr. Pedro Rolim por disponibilizar as instalações do LTM para realização de análises espectrofotométricas.

À Profa. Drª. Ana Cristina por ter disponibilizado as instalações do LABSINFA / UFPE para testes iniciais de Cromatografia.

À Profª. Drª. Ivone pela tranqüilidade, incentivo e disponibilidade para realização do estudo in vivo.

À Sandra da Silva Guimarães pela ajuda, estímulo, carinho, compreensão e paciência em todos os momentos desta caminhada. Esta conquista é nossa. Apesar das inúmeras adversidades que passamos, nós vencemos!

A José Alexsandro da Silva pela força, contribuição e orientação imprescindível para realização desse trabalho.

Aos amigos que conquistei em Recife: Gilson, Cinthia (Binha), Silvia, Youssef, Ivana Gláucia, Júnior Ceará, Paula Soares, André Santos, Elisângela, Greta, Ana Flávia, Antonilêne, Patrícia, pelo convívio e torcida permanente.

Aos amigos que moram longe: Pablo Camacho, Everton, Myrna, Rômulo, Cícero, Erivan, Paulo Pedro, Márcio Rocha, Sérgio, Elisiane, Viviana, Gustavo Montgomery.

A Danilo Bedor e Carlos Eduardo Miranda pelo auxílio nas análises cromatográficas.

Aos colegas de trabalho do NUDFAC, Carlos Eduardo, Marema, Margareth Valdivino, Henrique, Júlio, Carlos César, Raquel, Talita Mota, Valéria, Karine, Bráulio, Danilo e Virna, Ricardo Galindo pela torcida e respeito.

Á Ana Amélia pelas importantes dicas nos cálculos dos resultados.

À Farmácia Escola Carlos Drumonnd de Andrade, pela oportunidade de trabalho e aprendizagem. Agradeço especialmente a todos os funcionários (Homero, André Santos, Bety, Elisson, Olívia, Nilson, Tatiana, Fernando, André Correia, Suelaine, Wyldenira, Ana Rêgo) e aos estagiários que tive o prazer de conviver.

Aos professores da Universidade Federal do Piauí (UFPI), em especial ao Prof°. Vieira, e Profª. Graça Citó, pelos incentivos durante a graduação e a força para encarar mais esse desafio clamado MESTRADO.

À minha avó, D. Nair Menezes, por ter acreditado em mim e ser esse exemplo de dignidade, honestidade e luta que levo diariamente nas batalhas da vida. Á minha mãe por sempre ter optado nessa vida pela minha felicidade. Ao João Gabriel, meu irmão, pela vivacidade e a alegria. Luis Fernando, meu tio, que sempre foi um verdadeiro Pai e que mesmo no silêncio ou na distância sempre foi um modelo a ser seguido. A minha madrinha, Conceição, pelo seu otimismo frente aos meus sonhos e demais tios e primos.

"De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um novo caminho, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte e da procura um encontro".

(Fernando Sabino)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS..... I
LISTA DE TABELAS..... III
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... IV
LISTA DE SÍMBOLOS..... V
RESUMO..... VI
ABSTRACT..... VII
1.0 - Introdução..... 2
2.0 – Revisão da Literatura..... 4
2.1 – Cetoprofeno..... 5
2.2 – Estrutura da Pele..... 7
2.2.1 – Epiderme como barreira cutânea..... 8
2.3 – Mecanismo de permeação cutânea..... 8
2.4 – Estratégias de aumento de permeação cutânea..... 9
2.5 – Difusão *in vitro*..... 10
2.5.1 – Aspecto teóricos da difusão *in vitro*. 12
2.6 – Pluronic® Lecithin Organogel - PLO..... 13
2.6.1 – PLO como veículo de liberação de fármaco..... 13
2.6.2 – Componentes de emulgel baseado em PLO..... 15
2.6.2.1 - Poloxamer..... 15
2.6.2.2 – Lecitina de soja..... 16
2.6.3 – Estudos Clínicos com PLO..... 18
2.7 – Aspectos importantes de reologia..... 19
3.0 - Objetivos..... 22
4.0 – Artigo I – Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de cetoprofeno em enulgel por CLAE-UV e aplicação e cinética de difusão *in vitro*..... 24
5.0 – Artigo II – Cinética de difusão *in vitro* e atividade antiinflamatória de preparações magistrais de cetoprofeno..... 44
6.0 Conclusão..... 65
7.0 Referências Bibliográficas..... 68
8.0 Anexos..... 73

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estrutura química do cetoprofeno 5
Figura 2. Corte com as camadas da pele 7
Figura 3. Representação dos mecanismos de penetração de substâncias através do estrato córneo. 9
Figura 4 – Figura ilustrativa de uma célula de difusão 11
Figura 5 – Fotografia de uma célula de difusão *in vi*tro (tipo Franz) 11
Figura 6. Equação do fluxo de liberação**.** 12
Figura 7. Equação do tempo de latência. 13
Figura 8. Estrutura química do poloxamer – a = cadeias hidrofílicas de oxietileno, b = cadeias hidrofóbicas de oxipropileno 16
Figura 9. Estrutura química da lecitina 17
Figura 10. Equação de viscosidade 19
Figura 11. Gráfico de fluxo de fluído newtoniano 20
Figura 12 – Gráfico de fluxo de fluido plástico 20
Figura 13 - Gráfico de fluxo de fluido não - newtoniano pseudoplástico 21
Figura 14 – Gráfico de fluxo de fluído não - newtoniano dilatante 21

ARTIGO I

Figura 1. Estrutura química do cetoprofeno 26
Figura 2. Cromatograma da formulação sem fármaco (placebo) 34
Figura 3. Cromatograma do emulgel de cetoprofeno a 35µg/mL 34
Figure 4. Cinética de difusão in vitro de emulgel de cetoprofeno com seus respectivos desvios padrões para n = 03 experimentos. 38

ARTIGO II

FIGURA 1 – Microfotografia da formulação F3 de emulgel de cetoprofeno na lente ocular micrométrica com aumento de 100x 53

FIGURA 2 – Viscosidade relativa de emulgel de cetoprofeno em fluxo de rampa ascendente e descendente de 1 a 37 rpm. 54

FIGURA 3 – Comportamento reológico da amostra F3 de emulgel de cetoprofeno submetido a fluxo de rampa ascendente e descendente de 1 a 37 rpm. 55

FIGURA 4 – Espalhabilidade das formulações após 48 horas de preparo, em função do peso (g) aplicado sobre as amostras. 56

FIGURA 5 – Cinética de difusão in vitro das 08 formulações de emulgel de cetoprofeno do planejamento fatorial 2^3 57

FIGURA 6 – Efeito das formulações F3, Profenid® (25mg/cm²) por via tópica sobre o modelo edema de patas induzido por carragenina em ratos Wistar adultos.*p < 0,05 comparado com o controle que recebeu apenas o placebo F3 (formulação sem fármaco). Teste "t" de student 59

FIGURA 7 – Efeito das formulações F8, Profenid® (25mg/cm²) por via tópica sobre o modelo edema de patas induzido por carragenina em ratos Wistar adultos.*p < 0,05 comparado com o controle que recebeu apenas o placebo F8 (formulação sem fármaco). Teste "t" de student 60

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

TABELA I – Linearidade do método a partir de uma "solução mãe" de 1mg/mL de cetoprofeno diluído em etanol com suas respectivas médias, precisão e exatidão. 33

TABELA II – Análise de Variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados. 33

TABELA III – Repetitividade do método a uma concentração de 35µg/mL desvios padrão e coeficiente de variação. 35

TABELA IV – Ensaios de exatidão com os valores médios nas concentrações baixa, média e alta de cetoprofeno nos emulgéis, com suas respectivas, média, desvio padrão e coeficiente de variação. 36

TABELA V – Precisão intermediária (precisão – inter-corrida) entre analistas e dias diferentes do cetoprofeno com suas respectivas médias, precisão e exatidão. 37

TABELA VI – Análise de variância (ANOVA) dos ensaios de precisão intermediária entre dias e analistas diferentes. 37

ARTIGO II

TABELA I – Composição centesimal das formulações de emulgel de cetoprofeno % (p/p) de acordo coma matriz de planejamento fatorial 2^3. 47

TABELA II – Valores reais e níveis dos fatores estudados para o planejamento fatorial 2^3. 48

TABELA III – Resultados dos testes físico-químicos e parâmetros da cinética de difusão in vitro (valores médios de triplicatas). 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs – Antiinflamatório não-esteriodal

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

NUDFAC – Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético

PI – Palmitato de Isopropila

PLO – Pluronic® Lecithin Organogel

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UV – Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C – graus Celsius

µg - microgramas

µl - microlitros

µm – micrômetro

cm - centímetro

CV – Coeficiente de variação

g – gramas

J – Fluxo

M - molar

mg – miligramas

mL - mililitro

mm – milímetro

R^2 - Coeficiente de correlação

rpm – rotações por minuto

λ – comprimento de onda

RESUMO

O cetoprofeno é um antiinflamatório não -esteroidal (AINES) utilizado no tratamento sintomático da artrite reumatóide e a administração via oral, por um período prolongado, pode ocasionar distúrbios gástricos, como irritação, dores abdominais e ulcerações. O emulgel estudado é baseado em PLO (Pluronic® Lecithin Organogel) e tem como propósito atingir a circulação sistêmica e evitar a passagem pelo estômago.Esses veículos têm sido muito utilizados em Farmácias Magistrais no Brasil e E.U.A. O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de difusão in vitro e atividade preliminar in vivo de formulações galênicas de cetoprofeno derivadas de PLO. Inicialmente, desenvolveu-se um método para o doseamento do cetoprofeno em emulgel por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), realizou-se a aplicação de forma específica em cinéticas de difusão *in vitro*. As análises foram realizadas por CLAE-UV em um comprimento de onda de 254 nm, com coluna de fase reversa (C18; 150 x 4,6 mm e 5 μm), fase móvel isocrática contendo acetonitrila - tampão fosfato de sódio, 20 mM, pH 3 (50:50). Os resultados obtidos foram os seguintes: a faixa de linearidade do método foi de 5 a 60 $\mu g.mL^{-1}$ com $r^2 = 0, 99419$, a especificidade do método para as cinéticas de difusão *in vitro* foi evidenciada. O método desenvolvido mostrou-se sensível, rápido, preciso, exato e linear e podendo ser utilizado para a quantificação do cetoprofeno em formulações galênicas emulgel. Além disso, avaliou-se o perfil de liberação *in vitro* em células de Franz utilizando membranas artificiais de acetato de celulose.Observou-se que os perfis de todas as formulações foram semelhantes e o efeito do promotor de permeação (Transcutol GC) não foi evidenciado nos estudos de liberação *in vitro.* As formulações F3, F8 obtiveram as maiores quantidades de fluxo ($\mu g/cm^2.h^{-1}$).Finalmente, estudou-se a atividade antiinflamatória preliminar utilizando o modelo de edema pata de rato induzido por carragenina, com administração tópica na região dorsal do animal de 1g (25mg/g do emulgel) das formulações F3 e F8, seus respectivos placebos e uma preparação comercial gel (Profenid®) de liberação estritamente tópica. No estudo *in vivo*, a formulação F3 não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao placebo F3, com isso não ocorreu permeação de fármaco em quantidade suficiente para reduzir o edema durante as 06 horas de realização do ensaio. Na formulação F8, após 06 horas existiu redução do edema de até 47,17% e foi estatisticamente diferente do placebo F8. Isso demonstra que a formulação com transcutol® (F8) promoveu a passagem do cetoprofeno aplicado topicamente no dorso do animal.

PALAVRAS CHAVE: Cetoprofeno, validação, cinética de difusão *in vitro,* emulgel, atividade antiinflamatória.

ABSTRACT

The Ketoprofen is a nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID) used in the symptomatic treatment for rheumatoid arthritis. The oral administration, for a long period can cause gastric disorders, as stomach upset, pains and ulceration. The emulgel studied in this work was based on PLO (Pluronic® Lecithin Organogel) and was developed with the aim of reaching systemic circulation while avoiding stomach contact. This vehicle has been used en compounding pharmacies in Brazil and the U.S.A. The goal of this work was to evaluate the *in vitro* diffusion kinetics and preliminary *in vivo* activity in galenic ketoprofen formulations based on PLO. Initially, a ketoprofen quantification method for the emulgel formulation was developed by high performance liquid chromatography (HPLC) and applied to the determination of ketoprofen in the *in vitro* diffusion kinetics experiments. The method used HPLC with uv detection at 254nm. Separation was carried out with a C-18 reversed phase column (150 x 4,6, 5µ) with a mobile phase contisting of 20mm sodium phosphate buffer pH 3 and acetonitrile (50:50). The method was validated and proved to be linear (5 a 60µg.mL-¹), sensitive, precise and accurate. The realease profile of ketoprofen from the emulgel formulation was studied *in vitro* using franz diffusion cells with cellulose acetate membrane. The results indicated that all formulations tested have similar diffusion profiles and the effect of permeation promoter (Transcutol CG) could not be demonstrated in the *in vitro* realease studies. The formulations used F3 e F8 showed the highesr flow (µg/cm². h-¹). Finally a preliminary antiinflamatory activity study was carried out with the formulation using the carragenin – induced paw edema in rats, with topical administrationof 1 g (25mg/g emulgel) in the dorsal region. The formulation F3 e F8 was tested againt their respective placebos formulations. In the anti-inflammatory assay, formulation F3 and its placebo did not differ significantly in relation to edema inhibition showing that this formulation did not produce sufficient drug permeation up to 6 hours. The formulation F8 showed a 47, 17% reduction of paw edema after 06 hours, a reduction that the F8 formulation with transcutol CG®, promoted ketoprofen permeation when applied in the animal"s dorsal region.

KEY WORDS: Ketoprofen, validation, *in vitro* diffusion kinetic, emulgel, antiinflammatory activity.

1.0 Introdução

1.0 Introdução

As Farmácias Magistrais estão cada vez mais investindo em novas formulações, para promoção da saúde e em busca de estratégias alternativas de tratamento, para personalizar a terapêutica de seus usuários. Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA publicou o guia de Boas Práticas em Farmácia Magistral (RDC 214 / 06) que estipula novos procedimentos para controle e garantia da qualidade dos medicamentos produzidos por estes estabelecimentos que atendem boa parte da população, principalmente pelos preços acessíveis e a possibilidade de tratamento individualizado (BRASIL, 2006). Por isso, torna-se necessária a investigação dessas novas formas farmacêuticas e veículos que são utilizados pelas Farmácias e avaliar a segurança quanto à utilização destes produtos.

O Poloxamer 407 associado à lecitina granulada de soja é utilizada em Farmácias Magistrais como veículo de diversos fármacos para alcançar a via sistêmica para uso Farmacêutico e veterinário. Esses veículos são denominados de Pluronic® Lecithin Organogel (PLO). Diversas classes de medicamentos têm sido livremente veiculadas em PLO, como: antiinflamatórios, hormônios, anti histamínicos. Entretanto, poucos estudos científicos, sólidos, sobre as características físicas, reológicas, permeação in vitro e atividade in vivo têm sido reportados na literatura. (WINGATE, 2002; HOFFMANN *et al*., 2003; MURDAN, 2005).

Um dos fármacos veiculados pelo PLO é o cetoprofeno. É um antiinflamatório não - estereioidal utilizado no tratamento de artrite reumatóide, osteoartrite, espondilite anquilosante, e gota. Pode causar diversos distúrbios gastrintestinais, com o uso prolongado, por via oral. Além disso, o fármaco citado é considerado como de alto risco quando comparado a outros antiinflamatórios no tocante a capacidade de causar danos gástricos. Por isso, torna-se um excelente candidato pra ser veiculado por outras vias, por exemplo, tópica para ação local ou sistêmica. (MARTINDALE, 1996; GOODMAN & GILMANN, 1996; RODRIGUEZ, 1998) .

Essa dissertação é composta por uma revisão da literatura e 02 artigos com os resultados do trabalho experimental desenvolvido no mestrado. Inicialmente, desenvolveu-se um método para quantificação de cetoprofeno por CLAE - UV no emulgel e em amostras derivadas de cinética de difusão *in – vitro* (artigo I). Este manuscrito foi submetido para publicação a Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas – RBCF. Em seguida, avaliou-se a

cinética de difusão *in vitro* e atividade antiinflamatória (modelo de edema induzido de pata de rato por carragenina) das formulações galênicas de cetoprofeno baseadas em PLO. Por fim, investigaram-se os efeitos das concentrações de lecitina de soja, poloxamer 407 e transcutol CG na difusão *in vitro* das formulações estudadas, utilizando uma ferramenta estatística de planejamento fatorial (artigo II).

2.0 Revisão da Literatura

2.0 Revisão da literatura

2.1 Cetoprofeno

O Cetoprofeno [2-(3-benzoilfenil) ácido propiônico] é um antiinflamatório (Aine), potente inibidor da síntese de prostaglandina com fórmula molecular e PM $C_{16}H_{14}O_3$ e 254,3 respectivamente, conforme Figura 1 (MARTINDALE, 1996; MERCK INDEX, 1996). GARCIA, 2001, avaliou o coeficiente de solubilidade em água e em tampão fosfato e o coeficiente de partição. A solubilidade do cetoprofeno encontrada em água foi de 0,1771 mg/mL (± 0,001894) e em tampão fosfato de 13,7112 (± 0,425496).

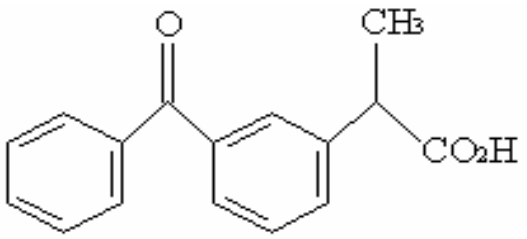


Figura 1. Estrutura química do Cetoprofeno.

Este antiinflamatório é utilizado no tratamento de artrite reumatóide, osteoartrite, espondilite anquilosante, e gota. É rapidamente absorvido após administração oral e as concentrações plasmáticas máximas são atingidas após 1-2 horas. Este fármaco se liga extensamente as proteínas plasmáticas e sua meia-vida no plasma são de cerca de 2 horas. O cetoprofeno é conjugado com ácido glicurônico no fígado sendo o conjugado excretado na urina. (MARTINDALE, 1996; GOODMAN & GILMAN, 1996).

Diversos distúrbios gastrintestinais estão associados com o uso prolongado, por via oral, desta substância. Por outro lado, evidenciou-se que a mesma possui facilidade de penetração cutânea. Esta característica o torna um excelente candidato à liberação tópica para ação local ou sistêmica.

Vários métodos de quantificação do cetoprofeno têm sido reportados na literatura. DVORÁK, 2004, desenvolveu um método de quantificação simultânea deste princípio ativo com metilparabeno, propilparabeno e produtos de degradação do fármaco, com tempo de corrida de 10 minutos, utilizando como padrão interno o etilparabeno para correção de área. JALÓN, 2000, utilizou cromatografia a líquido para determinação de cetoprofeno, em amostras de permeação *in vitro* utilizando pele de rato, com fase móvel de acetonitrila – tampão fosfato de sódio 0,01M (60:40), ajustado em pH 1, 5. Utilizou-se, ainda, o ibuprofeno como padrão interno, cujo o tempo de corrida cromatográfica foi de 10 minutos.

BEMPONG, 2005, publicou um método de quantificação de cetoprofeno em um gel de penetração tópica a base de lecitina de soja e poloxamer. A técnica utilizada foi cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE – UV), com uma coluna C18 (150mm x 4,6 mm) com diâmetro de partícula da ordem de 5µm. A fase móvel consistiu de tampão fosfato (pH 3,5) – água - acetonitrila (8:43: 49 v/v). A extração do fármaco na matriz do gel foi realizada com a própria fase móvel. O tempo de retenção do fármaco foi de 6,5 minutos para cada amostra a ser quantificada.

O grande desafio da quantificação de fármacos em amostras derivadas de cinética de difusão ou permeação está na redução do tempo de análise cromatográfica, devida à elevada quantidade de replicatas e de amostras ao longo de um estudo de liberação *in vitro* e muitas vezes o armazenamento pode ocasionar a perda da estabilidade da amostra ou o aparecimento de produtos de degradação. Com isso, faz-se necessário à descoberta de métodos rápidos, específicos e que sejam utilizados os mesmos parâmetros cromatográficos tanto para análise da forma farmacêutica quanto para cinética de difusão *in vitro.*

2.2 Estrutura da Pele

A pele é composta por 3 camadas, epiderme, derme e hipoderme. As características bioquímicas, histologia, disposição e a composição de cada camada do tecido tegumentar atribuem funções bem específicas, como proteção, força mecânica, barreira química, térmica, elétrica, proteção microbiológica e a irradiações (AULTON, 2005). De acordo com a figura 2, pode-se observar a disposição de cada uma das camadas da pele.

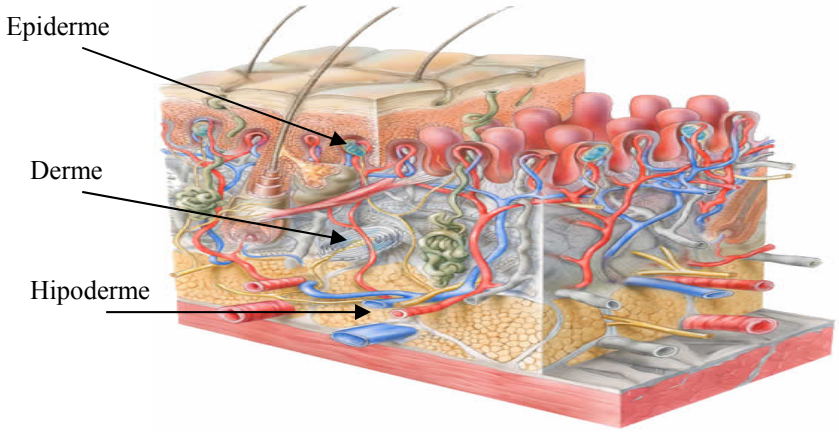


Figura 2. Corte com as camadas da pele.

A epiderme é a parte mais externa da pele, apresenta-se como multicamada varia em espessura, oscilando desde 0,8mm nas palmas da mão e sola dos pés até 0,006mm nas pálpebras. É formada por tecido pavimentoso estratificado e composta pelas seguintes porções: estrato germinativo, estrato espinhoso, granuloso, lúcido e córneo. Existe um intenso movimento de renovação celular das camadas mais internas da epiderme (estrato germinativo) até o estrato córneo. Á medida que se processa a migração, as células vão sendo desidratadas, anucleadas, achatadas até a camada mais externa (ANSEL *et al*, 2000; AULTON, 2005).

O Estrato córneo é composto por aproximadamente 40% de proteínas (principalmente queratina) e 40% de água, sendo o restante formado por lipídeos, principalmente triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e fosfolipídios (ANSEL *et al.,* 2000). Cada célula do extrato córneo desenvolve um envoltório cornificado resultante do entrecruzamento

de involucrina e queratolina. Isto constitui exoesqueleto insolúvel que atua como um arcabouço rígido para os filamentos internos de queratina. Os principais lipídeos da epiderme são os seguintes: ácido fatídico, fosfoglicerídeos, colesterol, esfingolipídeos (WERTZ, 1996). Dessa forma a epiderme constitui-se como uma das principais barreiras de penetração cutânea.

A Derme é uma camada que fica mais interna a epiderme onde ficam localizados o plexo vascular, possui 3 a 5 mm de espessura. É composta por uma densa matriz de tecido conectivo no qual predominam feixes de fibras colágenas (aproximadamente 75%), elastina (4%) e algumas fibras reticulares (0,4%) envolvidas em mucopolissacarídeos. Além disso, encontram-se, também, os apêndices cutâneos, glândulas sebáceas, sudoríparas (écrinas e apócrinas), folículos pilosos e nervos. A hipoderme é uma camada mais interna de tecido adiposo que têm a função de promover isolamento térmico, proteção mecânica e reserva energética (WILLIAMS *et al*., 1992; BENY, 2000).

2.2.1 Epiderme como barreira cutânea

O transporte de fármacos através da pele é complexo, pois muitos fatores influenciam sua permeação, como exemplos podem ser citados: estrutura e propriedade da pele, penetração da molécula, relação físico-química do fármaco com a pele e com o sistema de liberação, sistema interno de liberação (RANADE, 1991). Estes fatores afetam a atividade termodinâmica, fundamental na relação fármaco / sistema de liberação que é importante para o direcionamento da substância na pele ou na permeabilidade de fármacos na pele, particularmente no estrato córneo (URTII, 2002).

2.3 Mecanismos de penetração cutânea

A penetração de fármacos por via tópica tem sido um dos principais desafios para administração de medicamentos para efeitos locais ou sistêmicos. A disponibilidade adequada

de fármacos incorporados em bases dermatológicas está relacionada à sua liberação e solubilização nas camadas da pele, sendo que suas características de liberação a partir de uma forma farmacêutica são dependentes de sua estrutura molecular e das interações existentes entre este fármaco e outros componentes da preparação (PEREIRA, 1999).

As principais vias de penetração cutânea são as seguintes: via apêndices: através dos anexos como glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas; via intercelular por difusão entre as células, via transcelular entre os espaços do estrato córneo, de acordo com a Figura 3.

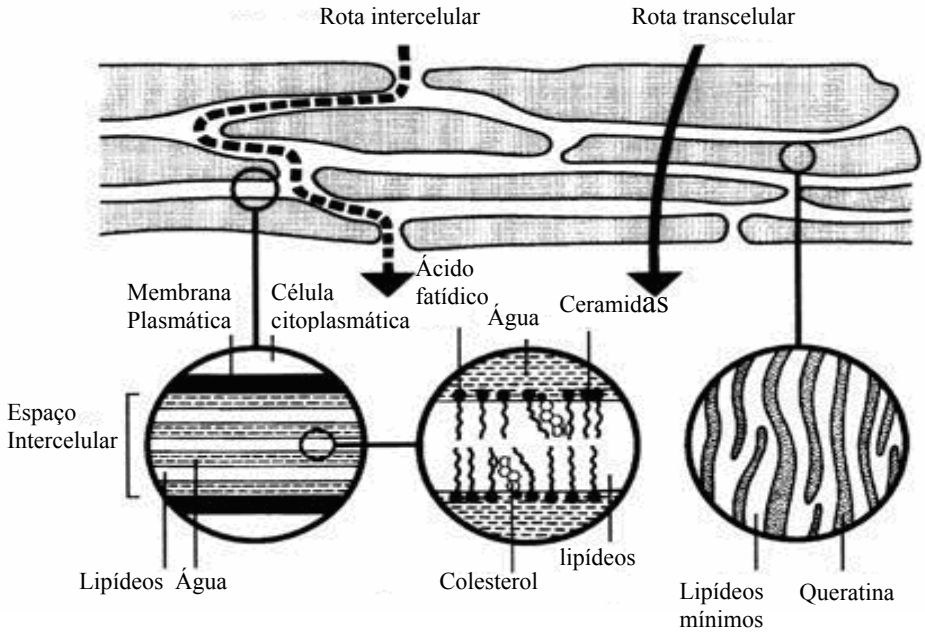


Figura 3. Representação dos mecanismos de penetração de substâncias através do estrato córneo (PEREIRA, 1999).

2.4 Estratégias de aumento de permeação cutânea.

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para promover a permeação cutânea de fármacos, como: interações fármaco - excipientes (promotores de permeação), desenvolvimento de sistemas vesiculares ou partículas nanométricas (lipossomas, microemulsões), modificação do estrato córneo (oclusão e hidratação), remoção do estrato córneo e métodos elétricos (Fonoforese, Iontoforese, Magnetoforese) (LOPES, 2000).

O Transcutol® (éter monoetil dietilenoglicol) é uma substância utilizada como promotor de absorção cutânea por promover o aumento do fluxo de diversos fármacos via epiderme. Esse composto não é tóxico, possui boa compatibilidade tópica, além de ser utilizado como solvente de inúmeros fármacos (MURA, 2000). De acordo com GANEM - QUITAMAR *et al*., 1997, a ação do Transcutol®, como promotor de permeação, pode ser atribuída pela alteração do coeficiente de partição do fármaco no veículo, por hidratação (água absorvida do ar), maximinizando a atividade termodinâmica devida à mudança de solubilidade dos fármacos.

2.5 Difusão *in vitro*

Diversas metodologias são utilizadas para avaliar o perfil de liberação *in vitro* em formas farmacêuticas semi-sólidas. Dentre os modelos, destacam-se as células do tipo Franz com a utilização de membranas sintéticas ou tecido animal e humano. O produto a ser avaliado é colocado sobre uma membrana (analogia a uma barreira cutânea) situada entre dois compartimentos um doador e outro receptor, de acordo a figuras 4 e 5. Para manutenção de temperaturas próximas a da pele, as células de difusão (Franz) são dotadas de compartimento receptor de dupla parede com um banho termostatizado, possibilitando temperaturas controladas, mimetizando, assim, as condições fisiológicas da pele. O fármaco que conseguir ultrapassar a membrana é monitorado através da quantificação das amostras coletadas do fluído presente no compartimento receptor.

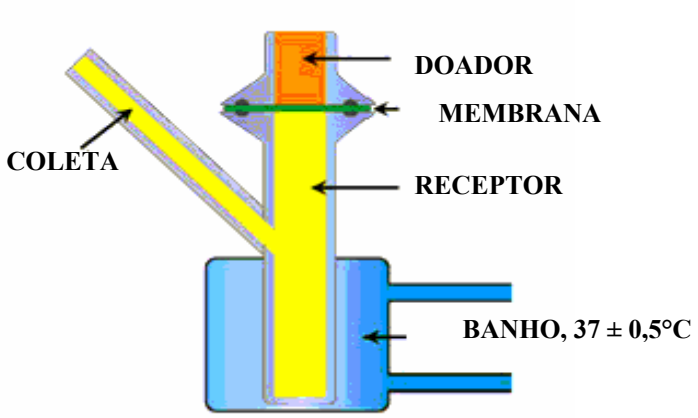


Figura 4. Figura ilustrativa de uma célula de difusão.

Ressalta-se que a natureza da membrana é escolhida frente às características físico-químicas do fármaco e do veículo estudado. As membranas utilizadas em testes de difusão *in vitro*, podem ser: porosas (acetato de celulose) ou não porosas (nylon, acrílica, polidimetil - sioloxane). Os estudos *in vitro* permitem reproduzir a passagem quantitativa e qualitativa do princípio ativo a partir da forma farmacêutica, entretanto demonstram evidentes limites quanto à complexidade biológica e físico-química da pele humana. (SESTER, 1997; LIRA, 2003). Por isso, algumas vezes, avalia-se o comportamento do sistema testado *in vivo* para verificar se existe correlação *in-vitro e in-vivo.*

Figura 5. Fotografia de uma célula de difusão *in vitro* (Tipo Franz).

Para manutenção das condições "sink", utiliza-se no compartimento receptor um fluído ou mistura de solventes onde o(s) fármaco(s) possua (m) alta solubilidade para garantir que qualquer quantidade que seja liberada possa difundir-se livre e completamente.

2.5.1 Aspectos teóricos da difusão *in vitro.*

A difusão de compostos através da pele pode ser descrita pela Lei de fick, descrita de acordo com a fórmula abaixo:

$$J = \frac{Dm\ Cs,\ m}{L} \quad x \quad \frac{Cv}{Cs,\ v}$$

Figura 6. Equação do fluxo de liberação.

Onde J é a velocidade de permeação do fármaco na membrana, Dm é o coeficiente de difusão, Cs, m é a solubilidade do composto na membrana, L o comprimento membrana, Cv a concentração do composto no veículo e Cs, v a solubilidade do composto no veículo. De acordo com a equação pode-se observar que J é diretamente proporcional a razão de Cv/ Cs, v que representa o grau de saturação do fármaco na formulação relacionada ao crescimento da atividade termodinâmica dos sistemas sendo independente da concentração necessária para alcançar esse grau de saturação (SANTANA, 1992.; LLÓPES *et al.,* 2005).

A velocidade de absorção percutânea não é imediatamente constante, pois existe um tempo de latência. Este tempo traduz o período necessário para a penetração da substância na pele e o estabelecimento do gradiente de concentração. O valor deste tempo varia de um composto (ou veículo) para outro. Determina-se, o tempo de latência, pela extrapolação da parte linear da curva sobre o eixo das abscissas (T) (SANTANA, 1992), expressas de acordo com a equação abaixo:

$$T = \frac{L}{D}$$

Figura 7. Equação do tempo de latência

Onde **T** = tempo de latência, **L** espessura da membrana e **D** o coeficiente de difusão.

Quando o sistema que está veiculando o fármaco atinge o equilíbrio (steady-state), a quantidade de substância que penetra na membrana ao nível de derme é igual àquela que penetra na epiderme. Este momento é o ideal para obter o fluxo através da regressão linear dos últimos pontos da cinética no estado de equilíbrio. Geralmente, calcula-se o fluxo, através do coeficiente angular, do gráfico de quantidade permeada (µg/mL) versus tempo (horas) (SANTANA, 1992; LLÓPES *et al.,* 2005).

2.6 Pluronic Lecithin Organogel - PLO

2.6.1 - PLO como veículo de liberação de fármaco

Em 1990, o PLO (Pluronic® lecithin organogel) foi desenvolvido como um veículo para liberação tópica e transdérmica de fármacos por Marty Jones e Lawson Kloesel em uma farmácia magistral americana. Eles preparam o organogel de lecitina original – LO pela adição de quantidade de água em solução orgânica de lecitina e acrescentaram a fase aquosa da formulação o polímero Polaxamer F127 (MURDAN, 2005).

WILLIMANN *et al*, 1992, relataram que o organogel de lecitina interagia com o estrato córneo na pele e desorganizava as camadas lipídicas para que o fármaco que carreava penetrasse mais facilmente. É possível que a proposta de desorganização seja devido à interação entre os lipídeos da pele e os fosfolipídios utilizados na preparação do gel. Verificou-se, também, que a escopolamina, broxaterol, estradiol, aminoácidos e peptídeos

poderiam ser transportados transdermicamente via gel de lecitina, pois os resultados dos seus estudos sugerem que não existem grandes restrições em relação à estrutura química do fármaco. Eles então concluíram que o organogel de lecitina poderia ser uma forma de liberação transdérmica diferenciada e eficaz.

No Brasil, atualmente, muitas farmácias de manipulação utilizam o PLO para veicular antiinflamatório, hormônios, anti-histamínico, analgésicos e etc. O fornecedor é a EMBRAFARMA que disponibiliza ao mercado magistral os componentes necessários para o preparo do veículo. Muitos prescritores estão indicando aos seus pacientes fármacos veiculados em PLO para aplicação tópica com intuito de alcançar a via sistêmica. A empresa descreve a formulação como uma "microemulsão lipossomal fosfolipídica" empregada para veiculação de fármacos para via transdérmica e afirma que o mesmo possui alta permeabilidade cutânea, com capacidade para carrear fármaco(s) incorporado(s) e alcançar a via sistêmica (EMBRAFARMA, 2004).

De acordo com MURDAM, 2005; EMBRAFARMA, 2006. Os fármacos são incorporados na fase oleosa ou na fase aquosa dependendo das características físicas e químicas dos mesmos. Além disso, pode-se utilizar algum solvente, como propilenoglicol para levigar fármacos lipofílicos antes de dispersá-los na fase oleosa. A seguir uma lista com alguns fármacos que são incorporados dentro do PLO:

- Hormônios como estriol e estradiol;
- Antiinflamatórios não esteroidais, como o cetoprofeno, piroxicam, diclofenaco dietilamômio;
- Inibidores de recaptação de serotonina, como: fluoxetina, paroxetina;
- Ciclobenzaprina com lidocaína;
- Dexametasona.

Microemulsão são dispersões de água e óleo estabilizadas por um emulsionante e por um co-emulsionante que formam um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água. Além disso, são sistemas transparentes, termodinamicamente estáveis e apresentam tamanho de partícula menor que 1,0µm. Portanto, o PLO não pode ser definido como "microemulsão", pois não possui isotropia, transparência e o tamanho de suas partículas não atingem níveis nanométricos com técnicas convencionais de agitação e mistura (TENJARLA, 1999; JÚNIOR *et al*., 2003; OLIVEIRA, *et al*., 2004).

De acordo com o EMBRAFARMA, fornecedor de matéria-prima para o mercado magistral, o preparo do "gel transdérmico" deve ser realizado pela técnica de extrusão de duas serigas interligadas por um conector tipo luer – lock. Preparam-se as fases oleosa (lecitina de soja e palmitato de isopropila – 1:1 (p/p) e aquosa (gel de poloxamer a 20%), deixa - se em repouso para completa formação das fases por 24 horas. Em seguida, pesa-se a quantidade necessária do fármaco e dependendo da afinidade físico – química, o mesmo é incorporado a fase oleosa ou aquosa preparadas previamente. Finalmente, o "gel" é formado pelas misturas das fases através de duas seringas conectadas até obtenção de mistura homogênea.

A técnica de preparo do "gel", entretanto, não é reprodutível, pois os movimentos laterais com as seringas podem ser alterados dependendo da força do manipulador. Adicionalmente, o sistema formado pode não ter estabilidade em função da qualidade dos movimentos que são empregados no preparo da forma farmacêutica.

2.6.2 Componentes de emulgel baseado em PLO

2.6.2.1 Poloxamer

O poloxamer é um copolímero não iônico de polioxietileno – polioxipropileno usado principalmente nas formulações farmacêuticas como agente emulsificante ou solubilizante.

Ele possui em sua estrutrutura química de acordo com a figura 6, um segmento hidrofílico (polioxietileno) e outro hidrofóbico. Todos os poloxamers são quimicamente similares em composição, diferindo somente na quantidade relativa de óxido de propilenoglicol e etileno adicionado durante a sua síntese. Além disso, são usados numa variedade de formas farmacêuticas (oral, parenteral e tópica) e geralmente são materiais não tóxicos (KIBBE, 1999).

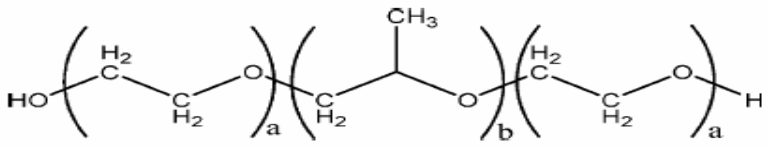


Figura 8. Estrutura química do Poloxamer - a = cadeias hidrofílicas de oxietileno, b = cadeias hidrofóbicas de oxipropileno.

O Poloxamer forma a frio um gel termorreversível e biocompatível que se apresenta no estado físico líquido e ao chegar a temperatura do corpo converte-se em um gel de alta viscosidade (SCHMOLKA, 1972; KNOW *et al.*, 2005). A adição de quantidades de lecitina (2, 4 e 8% v/v) em um gel de poloxamer 407 aumentou o fluxo de fármacos hidrofílicos através da pele e a retenção cutânea, decorrente da presença de micelas de lecitina que devem ter alterado o equilíbrio do fármaco na matrix do gel. Assim, a malha do hidrogel retardou a liberação de fármacos e diminuíu a aproximação das gotículas de lecitina formadas pelo processo de emulsificação a frio (BENTLEY *et al*, 1999; MURDAN, 2005).

2.6.2.2 Lecitina de soja

Lecitina é um nome trivial de 1,2 – diacyl-sn-3-fosfocolina. É pertencente a uma classe de substâncias biologicamente essenciais chamadas de fosfoglicerídeos ou fosfolipídeos. Eles formam a matrix lipídica de membrana biológica e representam um papel chave no metabolismo celular. Como um sufactante biocompativel, é largamente usado no dia a dia, incluindo comida humana e animal, medicina, cosméticos e muitas aplicações

industriais. Uma lista de solventes em que a lecitina é capaz de formar o organogel compreende mais de 50 itens. Dentre eles, destacam-se alcanos cíclicos, lineares, e ramificados, éteres, e ésteres, ácidos fatílicos e aminas (SHCHIPUNOV, 2001).

Outro componente crucial para a formação do organogel é a água. Este solvente polar é adicionado em traços ou pequenas amostras que dependem da media orgânica da lecitina. Foi também estabelecido que a água possa ser substituída por outras substâncias orgânicas polares como glicerol, etilenoglicol e formaldeído (SHCHIPUNOV, 2001).

A lecitina é solúvel em hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, hidrocarboneto halogenado, óleo mineral, ácidos fatílicos. Ela é praticamente insolúvel em óleos vegetais e animais a frio, solventes polares e água. Entretanto, quando misturada com água, pode ocorrer hidratação e promover a formação de emulsão (KIBBE, 1999).

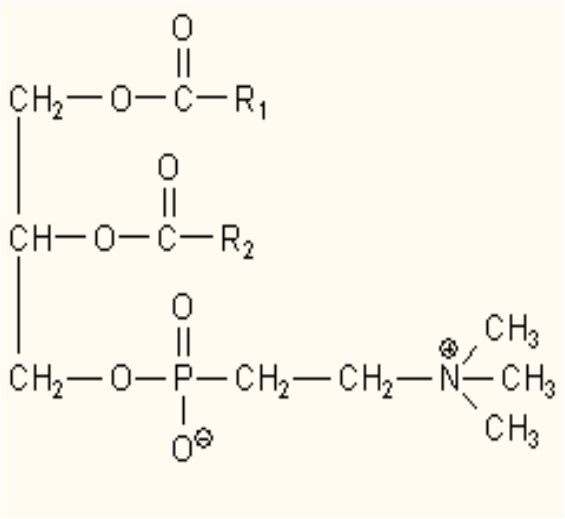


Figura 9. Estrutura química da lecitina.

Várias formulações tópicas a base de lecitina como lipossomas, emulsões e microemulsão têm sido propostas como sistemas de liberação dérmica e transdérmica. As microemulsões apresentam algumas vantagens sobre os carreadores lipossomais, como alta

estabilidade de armazenagem, preparação de baixo custo, boa viabilidade de produção, ausência de solventes orgânicos e não há necessidade de intensa sonicação. As vantagens são baseadas no fato que as microemulsões são sistemas coloidais termodinamicamente estáveis (sistema isotrópico limpo ou ligeiramente opalescente) que podem espontaneamente ser formado pela junção da mistura de uma fase aquosa, uma fase lipofílica e uma mistura de surfactante / co-surfactante (Fresta, 2002).

O Palmitato de isopropila (PI), também, é um componente das formulações do PLO, a sua função é servir como solvente da lecitina de soja.O PI é um emoliente não oleaginoso que agrega as formulações farmacêuticas e cosméticas boas características de espalhabilidade, além de ser usado como formador de filme percutâneo em sistemas de liberação controlada. Por fim, os sorbatos (ácido sórbico e sorbato de potássio) são utilizados como sistemas conservantes nas preparações de PLO. Eles são usados como preservantes antimicrobianos, por suas propriedades antibacteriana e antifúngica, utilizados em preparações farmacêuticas, cosméticas nas concentrações de 0,05 a 2% (KIBBE, 1999).

2.6.3 Estudos clínicos com PLO.

Poucos estudos sistemáticos têm sido conduzidos por médicos e veterinários para provar a eficácia do PLO como veículo de liberação transdérmica de fármacos. Nestes estudos, o efeito clínico do fármaco foi medido e em outros a concentração plasmática foi quantificada (bioavaliação) após simples ou repetidas aplicações da formulação no homem e em animais. DOWLING, *et al.*, 2004, verificou a biodisponibilidade relativa de cetoprofeno a 20% em “poloxamer lecithin organogel”. Realizou-se um estudo do tipo aberto, randomizado, em dose única de cápsulas de cetoprofeno de 50mg contra um gel de cetoprofeno a 20% em PLO. Todas as análises foram realizadas em CLAE / UV ou LC-MS-MS. Os resultados da bioavaliação indicaram que o cetoprofeno não possui biodisponibilidade relativa entre as duas

formas farmacêuticas. Além disso, ocorreu uma alta variabilidade quando o fármaco foi administrado por via tópica. A baixa concentração média pode ser atribuída a um retardo da velocidade da fase de absorção do gel e a técnica de obtenção através de seringas conectadas que possuem baixa reprodutibilidade.

HOFFMAN *et al.*, 2003 realizou um estudo usando PLO com veículo para administração transdérmica de metimazol. O objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração sérica de tiroxina e a resposta clínica em gatos com hipertireiodismo. Foram escolhidos 13 gatos com hipertireiodismo, recebendo doses diferentes de 2,5mg (24 horas) ou 10mg (12 horas). Adicionalmente, acompanhou-se a evolução dos animais durante todo o período de tratamento e foram realizadas reavaliações em média de 4,3 semanas e ao final de 05 meses. Observou-se uma melhoria clínica e um decréscimo significativo na concentração da tiroxina nas duas reavaliações realizadas frente ao estado clínico inicial. Não foi evidenciado efeito adverso nos animais estudados.

2.7 Aspectos importantes de reologia.

A viscosidade de um fluido é a resistência ao fluxo ou movimento. É expressa pela constante de proporcionalidade entre o gradiente de corte (S) e a tensão de corte (D), sendo denominada por η , de acordo com a expressão abaixo:

$$\eta = S / D$$

Figura 10. Equação da viscosidade

Onde **S** é a razão da força pela área (dina /cm²) e **D** a razão das diferenças de velocidades pela distância percorrida (cm/s/cm). Como a unidade dina é a força que atua por um segundo capaz de produzir uma velocidade de 1cms-¹ sobre a massa de 1 grama., a unidade de viscosidade vira Poise (g/cm-¹g-¹). Por fim, verifica-se que a velocidade de fluxo (S) é propocional a tensão aplicada (D) (LACHMAN *et al.*, 2001; AULTON, 2005).

O estudo da deformação e fluxo de matéria, os quais envolvem fenômenos de elasticidade, plasticidade e viscosidade constituem um dos principais objetivos da reologia (FERREIRA *et al*, 2005). A Reologia consiste no estudo do escoamento ou deformação do material em estudo quando submetido a uma tensão. Em etapas de investigação, desenvolvimento de formulações, as medidas reológicas são importantes para caracterizar a facilidade com que o material seja retirado de um recipiente, avaliar a influência na espalhabilidade de preparações tópicas e servir como parâmetro de acompanhamento da estabilidade acelerada e de prateleira (LACHMAN *et al*, 2001).

Os fluidos podem apresentar os seguintes comportamentos reológicos independentes do tempo: fluidos newtonianos, fluidos não - newtonianos (plástico, pseudoplático e dilatante) de acordo com os reogramas abaixo, de acordo com as figuras 11, 12, 13 e 14.

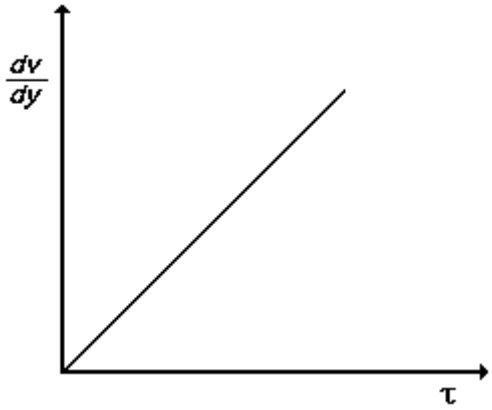


Figura 11. Gráfico de fluxo de fluido newtoniano.

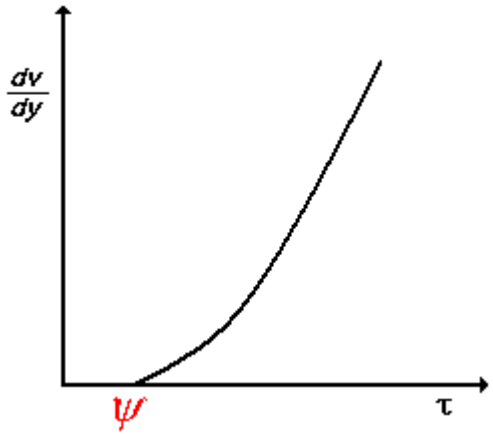


Figura 12. Gráfico de Fluxo de fluido plástico.

Os fluidos newtonianos possuem comportamento típico da figura 8. Existe uma relação linear entre a taxa e a velocidade de cisalhamento. O gráfico é tipicamente uma reta. Estes fluídos obedecem à lei de Newton que regem a proporcionalidade entre a velocidade de cisalhamento e a tensão de cisalhamento. Exemplos típicos: água, glicerina, microemulsões, óleos vegetais (SCHRAMM, 1998; ALMEIDA, 2003).

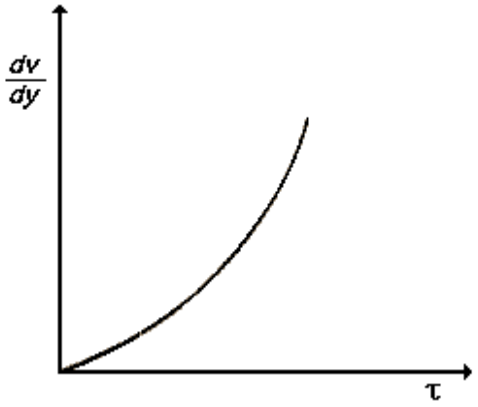


Figura 13. Gráfico de fluxo de fluido não - newtoniano pseudoplástico.

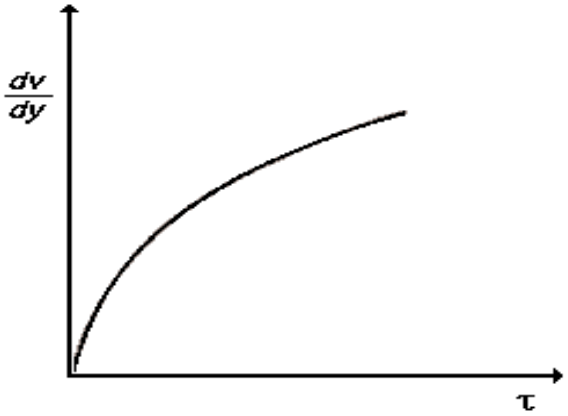


Figura 14. Gráfico de fluxo de fluido não-newtoniano dilatante.

Os fluidos não – newtonianos são mais complexos que os anteriores. Não obedecem as leis de Newton. Neste caso, ocorre a variação da viscosidade aparente em função da velocidade de cisalhamento da amostra. Exemplos: sistemas poliméricos, suspensões, emulsões. Nos fluidos chamados de plásticos tem que existir uma força para deformar a amostra que possui uma resistência **Ψ** de acordo com a Figura 12 e ocorre o escoamento do líquido ou semi-sólido. Os fluidos pseudoplásticos (Figura 13) possuem comportamento semelhante, entretanto não existe na porção inicial um valor de cedência bem definido como nos plásticos. Os dilatantes (figura 14) por fim aumenta a viscosidade com a taxa de cisalhamento (ALMEIDA, 2003).

3.0 Objetivos

3.0 Objetivos

Objetivo Geral

O Objetivo geral deste trabalho consistiu na obtenção, caracterização físico-química, avaliação da cinética de difusão *in vitro* e estudo preliminar in *vivo* de emulgéis de cetoprofeno baseadas em PLO.

Objetivos Específicos

- Obter preparações magistrais de emulgel de cetoprofeno baseadas em Pluronic® Lecithin organogel, por agitação mecânica;

- Caracterizar as formulações obtidas, através de testes de microscopia, viscosidade relativa, espalhabilidade, reologia e microscopia óptica;

- Desenvolver e validar um método analítico para quantificação de cetoprofeno em emulgel por CLAE e realizar aplicação em amostras derivadas de cinéticas de difusão *in vitro*;

- Avaliar a influência da concentração de poloxamer, lecitina de soja e de um promotor de absorção cutânea (Transcutol®) na liberação *in vitro* de emulgel de cetoprofeno;

- Avaliar a atividade *in vivo* de formulações de emulgel, utilizado o modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina.

4.0 Artigo I:

Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de Cetoprofeno em emulgel por CLAE-UV e aplicação em cinética de difusão *in vitro*.

Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas – RBCF / Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.

Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de Cetoprofeno em emulgel por CLAE-UV e aplicação em cinética de difusão *in vitro*.

André Luis Menezes Carvalho[1], Carlos Eduardo Miranda de Souza[1], Danilo César Galindo Bedor[1], José Alexsandro da Silva[1, 3], Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito[2], Davi Pereira de Santana[1]*.

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC), Universidade Federal de Pernambuco, UFPE – Recife-PE, Brasil.

[2]Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID), Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal–RN, Brasil.

[3]Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, Brasil.

RESUMO

O cetoprofeno é um antiinflamatório não-esteroidal (AINES) utilizado no tratamento sintomático da artrite reumatóide e a administração via oral, por um período prolongado, pode ocasionar distúrbios gástricos, como irritação, dores abdominais e ulcerações. O emulgel estudado é baseado em PLO (Pluronic® Lecithin Organogel) e tem como propósito atingir a circulação sistêmica e evitar a passagem pelo estômago. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método para o doseamento do cetoprofeno em emugel por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e utilizá-lo para quantificar de forma específica em cinéticas de difusão *in vitro*. As análises foram realizadas por CLAE-UV em um comprimento de onda de 254 nm, com coluna de fase reversa (C18; 150 x 4,6 mm e 5 µm), fase móvel isocrática contendo acetonitrila - tampão fosfato de sódio, 20 mM, pH 3 (50:50). A faixa de linearidade deste estudo foi de 5 a 60 $\mu g.mL^{-1}$ com $r^2 = 0,99419$ e a especificidade do método para as cinética de difusão *in vitro* foi evidenciada. Em conclusão, o método desenvolvido e validado por CLAE-UV mostrou-se sensível, rápido, preciso, exato e linear. Portanto, podendo ser utilizado para a quantificação do cetoprofeno em formulações galênicas emulgel.

Unitermos: Cetoprofeno, validação, cinética de difusão *in vitro,* emulgel.

INTRODUÇÃO

Cetoprofeno [2-(3-benzoilfenil) ácido propiônico] é um antiinflamatório (AINEs), potente inibidor da síntese de prostaglandina com fórmula molecular e PM $C_{16}H_{14}O_3$ e 254,3 respectivamente (Figura 1) e facilmente solúvel em etanol, acetona e cloridrato de metileno (Merck Index., 1996; Lenger, Kristl, 2003). Garcia, 2001 em seu estudo determinou o coeficiente de partição (K_p) óleo/água e óleo/tampão fosfato em pH 7,2 os quais foram 283,940 e 0,867 respectivamente, com um coeficiente de solubilidade, em tampão fosfato pH 7,2, de 13,7112 ± 0,425496 mg/mL.

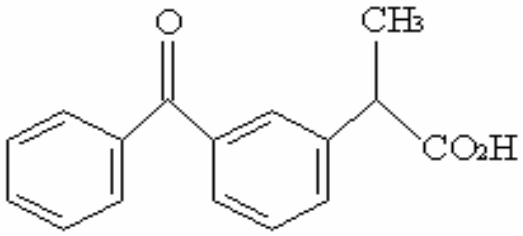


Figura 1. Estrutura química do Cetoprofeno

O cetoprofeno está associado a diversas complicações gastrintestinais, sendo considerado de alto risco quando comparados com outros AINEs como: indometacina, diclofenaco sódico, naproxeno, ácido acetilsalicílico e ibuprofeno (Rodriguez, 1998). Com isso, o fármaco torna-se uma excelente alternativa terapêutica para ser administrado por via tópica (transdérmica) e evitando distúrbios gástricos.

O emulgel de cetoprofeno estudado nesta pesquisa foi baseado no PLO (Pluronic® Lecithin Organogel), pois é um veículo de alta difusibilidade tópica que vem sendo bastante estudado pelo seu alto poder de permeação nas regiões mais profundas da pele e a possível capacidade de atingir níveis plasmáticos. Este sistema vem sendo utilizado em várias Farmácias Magistrais dos Estados Unidos e Brasil para uso humano e veterinário (Wingate, 2002; Hoffmann *et al*., 2003; Kumar & Katare, 2005; Murdan, 2005). Dessa forma, tem

suscitado muito interesse para avaliar a extensão da cinética de difusão *in vitro* e a permeação de diversos fármacos incorporados a este sistema. A formulação é composta de cetoprofeno, poloxamer 407®, lecitina granulada de soja, palmitato de isopropila, propilenoglicol, transcutol CG®, ácido sórbico, sorbato de potássio e água destilada.

Poucos procedimentos analíticos para quantificação do cetoprofeno em preparações tópicas têm sido relatado na literatura (Bempong, Bhattacharyya, 2005), os poucos existentes utilizam padrão interno para correção de área (Jálon *et al*., 2000) (Dvorák., 2004), pois possuem tempos de retenção altos e não são utilizados em cinética de difusão in vitro (Bempong, Bhattacharyya, 2005). O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico por CLAE-UV para quantificar cetoprofeno em emulgel e utiliza-lo para determinar de forma específica em cinética de difusão *in vitro* (célula de Franz).

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Cetoprofeno (substância química de referência) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, Rio de Janeiro, Brasil; Cetoprofeno (DEG farmacêutica – Brasil); acetonitrila grau HPLC (J.T.Baker - Phillipsburg, NJ - EUA); etanol (Vetec – Brasil), fosfato hidrogenado de sódio e o ácido orto-fosfórico (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO - EUA); água Milli-Q® (Milipore - Molsheim); Poloxamer® 407, lecitina granulada de soja, palmitato de isopropila, ácido sórbico, sorbato de potássio (Embrafarma – Brasil); Transcutol® GC (Brasquim – Brasil); membranas hidrofílicas de 0,45 μm da (S&S – Brasil).

Condições analíticas

As análises foram realizadas por CLAE-UV composto de duas bombas (LC 10ADvp), forno para coluna (CTO 10Avp), detector UV/VIS (SPD 10AVvp) configurado para o comprimento de onda de 254 nm, coletador automático (SIL 10ADvp) e um controle do sistema (SCL 10avp) todos da Shimadzu (Kyoto, Japão).

A Separação cromatográfica isocrática foi realizada com uma coluna C18 Gemini® (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) com 150 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel constituída de tampão fosfato hidrogenato de sódio 20 mM pH 3,0 e acetonitrila (50:50, v/v) que foi filtrada, degaseificada e bombeada a um fluxo de 1,5 mL/min. A temperatura do forno foi de 40ºC e o volume de injeção de 20 µl.

Preparo do emulgel

Os emulgeis foram preparados 48 horas antes dos ensaios, para que ocorresse a estabilização termodinâmica das micelas na temperatura ambiente (Moraes, Rezende, 2004)**,** os quais foram preparados no NUDFAC (Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosméticos) utilizando-se uma farmacotécnica de preparo simples, a frio, com a dispersão do polímero e conservante em água destilada (2 a 8ºC). Esta solução polimérica foi mantida sob refrigeração por 24 horas para aumentar a sua taxa de solubilização (Schmolka, 1972; Bentley *et al.,* 1999). A fase oleosa foi obtida pela mistura (1:1) espontânea de lecitina granulada de soja (50%, p/p) e palmitato de isopropila (50 % p/p) mantidas por 24 horas em repouso para facilitar a solubilização da lecitina. O cetoprofeno (2,5 % p/p) foi incorporado, sob agitação constante, a 22 % da fase oleosa, na qual foi adicionada a fase aquosa (solução de poloxamer® 407) em quantidade suficiente para 100 % da formulação. Posteriormente, foi adicionado 10 g de transcutol CG® sob agitação por 30 minutos com o auxílio de agitador mecânico.

Validação do método

O método foi desenvolvido e validado de acordo com as normas da ICH (Internacional Conference on Harmonisation guidelines) de validação de procedimentos analíticos (ICH, 2005). Todas as análises foram realizadas por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sistema shimadzu ajustado na região do UV no $\lambda = 254$ nm.

Preparo da solução padrão de Cetoprofeno

Foi pesado, exatamente, o equivalente a 10 mg de Cetoprofeno padrão primário, dissolvendo em 10 mL de etanol e sonicando por 10 minutos de forma a obter solução de concentração de 1 mg/mL. Alíquotas desta solução foram tomadas e diluídas em etanol para obter concentrações no intervalo de 5,0 a 60,0 μg/mL.

Preparo das amostras do emulgel de Cetoprofeno

Foi pesado, exatamente, 200 mg de emulgel, o que corresponde a 5 mg de cetoprofeno, dispersado em álcool etílico p.a e sonicado por 10 minutos aferindo o balão para 100 mL. Posteriormente, foi usado uma alíquota de 7 mL desta solução e diluída com etanol para 10 mL para obter uma concentração final de 35 μg/mL.

Parâmetros analíticos de validação

Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (Swartz, Krull, 1997). Neste estudo, foi preparado uma curva de calibração, em triplicata, dissolvendo-se, exatamente, 10 mg de cetoprofeno em 10 mL de etanol. Diluições foram efetuadas de modo a obter uma concentração final de 5,0; 20; 35; 50 e 60 μg/mL de cetoprofeno, e as corridas foram determinadas em λ = 254 nm.

Seletividade

A seletividade de um método é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa, como é o caso dos emulgeis. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como, por exemplo, outros ingredientes ativos, excipientes,

impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes (USP, 1999).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras em um sistema emulsionado. Neste caso, a forma utilizada foi comparando os cromatogramas da matriz isenta da substância de interesse (placebo) com uma matriz adicionada de cetoprofeno, ambas à 35 μg/mL, sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve possuir mesmo tempo de retenção da substância de interesse (Swartz, Krull, 1997).

Precisão

Avalia a concordância dos resultados em uma série de medidas de uma amostragem múltipla da mesma amostra, de um mesmo método, efetuado sob as mesmas condições de medições (procedimentos, analistas, local e instrumento) (Swartz, Krull, 1998; Ribani *et al*., 2004). A precisão deste método (repetitividade, precisão intermediaria) foi avalida, em sextuplicata, e de cada vez, fazendo-se diluições de forma a obter uma concentração de leitura de 35 μg/mL de cetoprofeno. A precisão intermediária foi determinada em dias distintos e por analistas diferentes.

Exatidão

Verifica a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Foram analisadas nas concentrações de 80 % , 100 % e 120 % da concentração de leitura (35 μg/mL de cetoprofeno) em triplicata utilizando o método de recuperação do analito.

Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

O LD é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser detectado, mas não quantificado e o LQ corresponde a menor quantidade do analito determinada com precisão e exatidão. Para calcular o LD foi utilizado o desvio padrão do intercepto obtido dos coeficientes lineares das 3 curvas de calibração multiplicado por 3 e dividido pela média dos

coeficientes angulares das curvas. O LQ foi determinado de forma semelhante variando apenas a multiplicação por 10 (USP, 1995).

Cinética de difusão

As cinéticas de difusão *in vitro* foram conduzidas utilizando células de difusão tipo Franz com área difusional de 1,15 cm^2, volume de ± 6 mL e usando membranas artificiais hidrofílicas (acetato de celulose) S&S de 0,45 μm. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato 20 mM em pH = 7,2 em um sistema composto de seis células individuais conectados a um banho termostatizado à 37 ± 0,5 ^oC sob agitação constante de 100 rpm em agitador magnético por um período de 6 horas. As membranas foram colocadas cuidadosamente no compartimento doador de forma que ficassem em contato com a solução receptora. Todas as membranas foram umedecidas no tampão fosfato por uma hora antes do início do experimento. No compartimento doador, aplicou-se 100 mg da formulação diretamente sobre a membrana artificial de cada célula, sendo três com o Emulgel placebo (sem o fármaco) e três com Emulgel teste (correspondente a 2500 μg de cetoprofeno). As amostras da solução receptora foram coletadas nos seguintes tempos: 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 6,0 horas. O volume total da fase receptora de cada célula (≈ 6 mL) foi substituído a cada amostragem com tampão fosfato na mesma temperatura (37 ± 0,5 ^oC) para manutenção das condições "sink". A quantidade de fármaco liberado no compartimento receptor foi quantificada por CLAE-UV através do método analítico desenvolvido e validado previamente.

Especificidade do método de quantificação na cinética de difusão

A especificidade da quantificação do fármaco na cinética de difusão foi realizada durante todos os pontos de coleta do experimento Comparou-se os cromatogramas obtidos em todos os pontos de coleta e foi verificado o aparecimento, ou não, de algum pico no mesmo tempo de retenção do padrão de referência de Cetoprofeno.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do Método

Linearidade

A linearidade do ensaio foi avaliada dentro de um intervalo de concentração entre 5 à 60 μg/mL, partindo de uma "solução mãe" de 1000 μg/mL, realizando três repetições autênticas conforme descrito na Tabela I. O tratamento estatístico dos resultados obtidos pelo modelo linear dos mínimos quadrados ordinários foi validado por meio da análise de variância teste unilateral (ANOVA), cujos elementos estão descritos na Tabela II. Uma boa maneira de avaliar matematicamente a qualidade de um modelo é comparar as médias quadráticas que são obtidas pela divisão das somas quadráticas por seus respectivos graus de liberdade. Quanto maior o valor desta razão (MQreg/MQr), melhor é o modelo (Barros Neto *et al*., 2003; Nunes *et al*. 2005).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (Ribani *et al*., 2004). Além dos coeficientes de regressão a e b, angular = 0,9487 ± 0,0434 e linear = 0,6105 ± 1,7115 respectivamente, também foi possível calcular, a partir dos pontos experimentais, em termos de concentração (μg/mL) o coeficiente de correlação r^2 = 0,99419, cujo valores significa que 99,42 % da variação total em torno da média é explicada pela regressão e o erro dos resíduos foi de apenas 0,58. Este resultado permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Chui *et al.,* 2001). Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para regressão (Nunes *et al.*, 2005). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99

Observa-se, também, que não houve falta de ajuste do modelo, pois os valores de $F_{calculado}$ foram menores que os valores do $F_{critico}$ com um nível de confiança de 95 % Tabela II.

Tabela I. Linearidade do método a partir de uma "solução mãe" de 1mg/mL de cetoprofeno diluído em etanol com as suas respectivas médias, precisão e exatidão

Concentração teórica (µg/mL)	Média (µg/mL) (± DP) (n = 3)	Precisão (%)	Exatidão (%)
5,0	4,871 (± 0,131)	2,69	97,71
20,0	19,446 (± 0,357)	1,84	97,23
35,0	34,962 (± 0,778)	2,22	99,89
50,0	48,401 (± 2,098)	4,33	96,80
60,0	56,658 (± 2,592)	4,58	94,43

Tabela II. Análise de Variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Valores de F	
				$F_{calculado}$	$F_{crítico*}$
Regressão	5319,568672	1	5319,568672	2,22266	4,6672*
Resíduos	31,1133656	13	2,393335815	Curva Linear	
Falta de ajuste	7,377097597	3	2,459032532	1,03598	3,7083**
Erro puro	23,736268	10	2,3736268	Não há falta de ajuste	
Total	5350,682038	14	382,1915741		

*F (1,13) teórico de acordo com teste ANOVA unilateral ($p<0,05$)
** F (3,10) teórico de acordo com teste ANOVA unilateral ($p<0,05$)

Os resíduos derivados da linearidade para método de quantificação da forma farmacêutica emulgel, apresentou-se com adequado ajuste ao modelo, indicando uma distribuição linear e aleatória dos dados. Além disso, não existem indícios que sua variância não seja constante.

Seletividade

A seletividade ou especificidade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico e, este parâmetro deve ser reavaliado continuamente durante a validação e subseqüente uso do método. A partir dos dados das Figuras II e III, respectivamente, pode-se observar que não existe nenhum pico no mesmo tempo de retenção do fármaco, logo o método desenvolvido é seletivo para quantificação de cetoprofeno veiculado no emulgel. Todas as amostras analisadas do emulgel placebo não apresentaram picos próximos ao tempo de retenção do fármaco de 3,5 minutos com o tempo de corrida cromatográfica de 4,5 minutos.

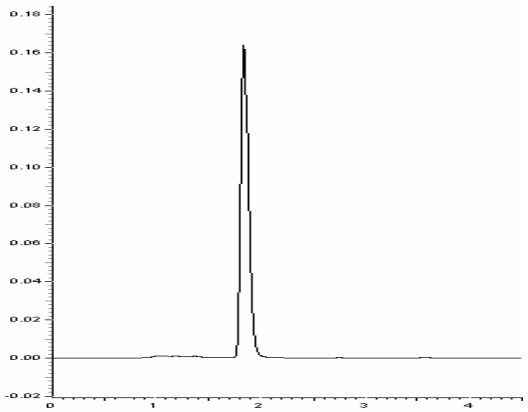


Figura 2. Cromatograma da formulação sem fármaco (placebo).

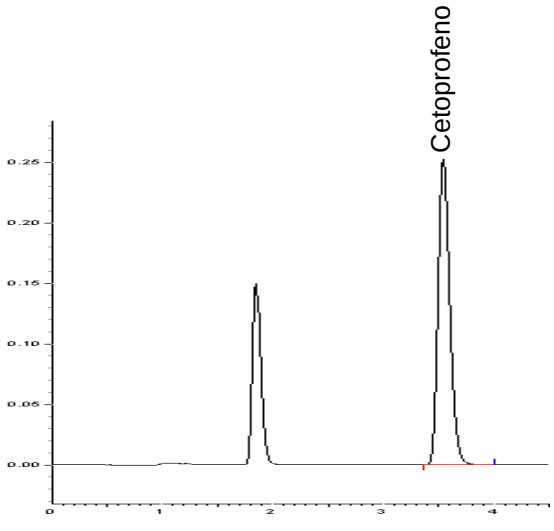


Figura 3. Cromatograma do emugel de cetoprofeno a 35µg/mL.

Repetitividade

A repetitividade (precisão intra-corrida) foi avaliada a partir de injeções em sextuplicatas de acordo com Brasil, 2003 e ICH, 2005, onde a concentração testada de 35 µg/mL de cetoprofeno foi escolhida por representar o ponto médio do intervalo especificado pelo procedimento (5 à 60 µg/mL da curva de calibração), mostrado na Tabela III, e expressado pela média, desvio padrão e Coeficiente de Variação (CV%).

Tabela III. Repetitividade do método a uma concentração de 35µg/mL ,desvio padrão e coeficiente de variação.

Amostra	µg/mL	Área	Concentração %
01	34.03	1913103	97.22
02	33.43	1879403	95.50
03	34.46	1937436	98.45
04	32.75	1841617	93.58
05	34.21	1923551	97.75
06	34.17	1921271	97.63
Média	33.84	1902730	96.69
DP	0.63	35688	1.81
CV%	1.88	1.88	1.88

Exatidão

A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de 9 (nove) determinações autênticas contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações baixa (28 µg/mL), 3 (três) concentrações média (35 µg/mL) e 3 (três) concentrações alta (42 µg/mL), com três réplicas cada, conforme dados da Tabela IV. A exatidão encontra-se dentro da faixa esperada, pois o coeficiente de variação (CV) não excedeu 5% em nenhuma determinação

analítica e os valores de $F_{calculado}$ foram sempre abaixo dos valores de $F_{tabelado}$ (4,3030) em todas as concentrações.

Tabela IV. Ensaio de Exatidão com os valores médios nas concentrações baixa, média e alta de cetoprofeno nos emulgeis, com suas respectivas, médias, desvio padrão e coeficiente de variação.

DETERMINAÇÕES	μg/mL / %					
	28 μg/mL	80%	35 μg/mL	100%	42 μg/ mL	120%
1	28.07	100.23	35.42	101.20	42.72	101.71
2	27.37	97.76	35.14	100.40	42.10	100.24
3	27.79	99.25	33.92	96.91	41.30	98.34
MEDIA	27.74	99.08	34.83	99.51	42.04	100.09
DESVPAD	0.35	*	0.80	*	0.71	*
CV (%)	1.26	*	2.28	*	1.69	*

Precisão Intermediária

Os ensaios de precisão intermediária (precisão inter-corridas) foram realizados por dois analistas e em dias diferentes e os valores expressados na Tabela V, com os seus respectivos parâmetros estatísticos (Tabela VI). Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre analistas e dias diferentes. Os valor de $F_{calculado}$ foram sempre menores que o $F_{crítico}$. Estes resultados foram obtidos a partir do método estatístico ANOVA a 95% de nível de confiança. .

Tabela V. Precisão intermediária (precisão inter-corridas) entre analistas e dias diferentes do cetoprofeno com suas respectivas médias, precisão e exatidão

Analistas	Dias	Média (± DP) (n=6)	Precisão (%)	Exatidão (%)
1	Dia 1	33.84 (± 0.63)	1.88	96.69
	Dia 2	33.92 (± 0.76)	2.25	96.91
2	Dia 1	33,96 (± 3.21)	2.95	97.02
	Dia 2	34.15 (± 1.40)	1.91	97.57

Tabela VI. Análise de variância (ANOVA) dos ensaios de precisão intermediária entre dias e analistas diferentes.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Dias	9,59E+08	3	3,2E+08	0,120033	0,946899	3,287383
Analistas	2,54E+10	5	5,09E+09	1,909314	0,152406	2,901295
Erro	4E+10	15	2,66E+09			
Total	6,63E+10	23				

Os parâmetros limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram 0,3725 µg/mL e 0,5644 µg/mL respectivamente. Sendo que o LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo intervalo de confiança, correspondendo a um teste limite que especifica se a substância em exame está ou não presente na amostra. Enquanto que o LQ representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser quantificada com certo intervalo de confiança pré-estabelecido (Brasil, 2003).

Cinética de difusão *in vitro*

O método desenvolvido e validado mostra que pode ser utilizado para a quantificação do cetoprofeno em estudos de cinética de difusão *in vitro*, pois foi observado, em todos os pontos de coleta, que as amostras estavam dentro do intervalo linear proposto pelo método (5,0 a 60 µg/mL). A especificidade do método, nas cinéticas de liberação, foi acompanhada em todos os pontos de coleta nas formulações placebo, e foi constatado que não apareceu nenhum pico cromatográfico no tempo de retenção de 3,5 minutos (Figura IV).

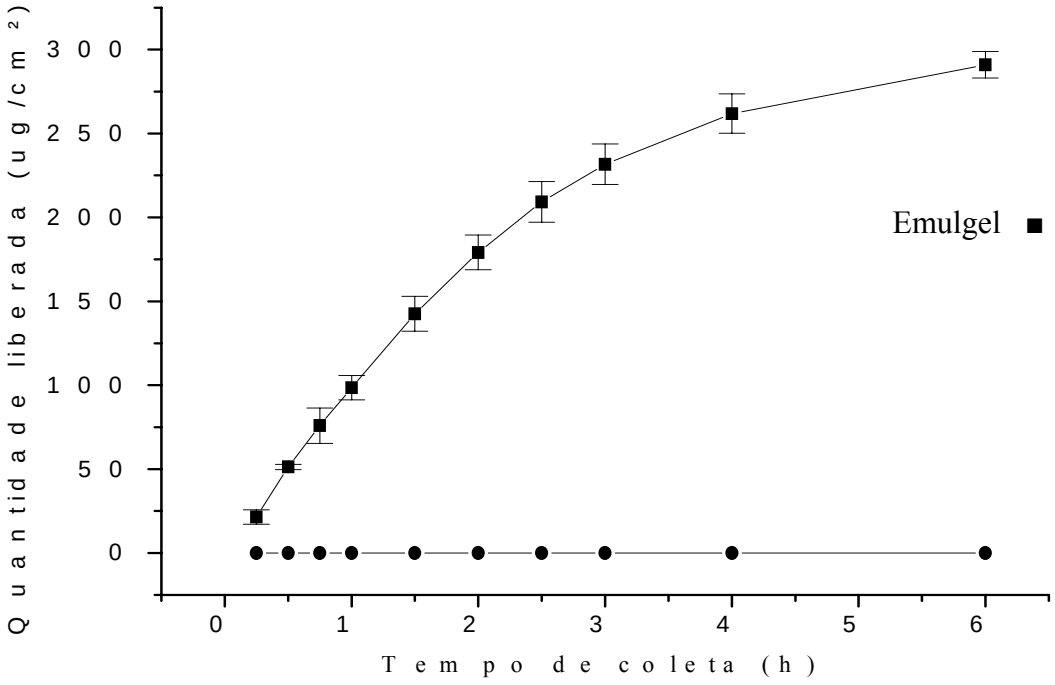


Figura 4. Cinética de difusão *in vitro* de emulgel de cetoprofeno com seus respectivos desvios padrão para n = 3 experimentos.

O fluxo das cinéticas (*J*) e o coeficiente de difusão (*K*) foram calculados através do coeficiente linear do gráfico de quantidade permeada (µg/mL) versus tempo (horas) Figura 4, obtidos a partir da equação de regressão linear de cada replicata conforme sugerido por (Llópes *et al.*, 2005). O fluxo médio ($J_{médio}$) obtido foi de 26,46 ± 1,21 (µg/cm².h^{-1}), com um coeficiente de difusão (*K*) de 0,797 ± 0,0251 cm.h^{-1}. Os ensaios mostraram-se reprodutíveis, pois foram obtidos nas replicatas um pequeno desvio padrão em relação à média em cada

ponto de coleta. A quantidade liberada após 6 horas foi de 290,95 ± 7,88 $\mu g.cm^{-2}$. A Figura 4, mostra, ainda, que no intervalo de até 02 horas ocorre um aumento contínuo da quantidade liberada de fármaco, e este fenômeno pode ser atribuído a impregnação e saturação de fármaco na membrana já que nos próximos pontos de coletas os valores liberados são mais próximos.

Foi constatado, neste estudo, que o cetoprofeno apresenta afinidade pelo sistema proposto, pois houve um retardo na sua liberação, como visualizado na Figura 4. Com isso, a formulação estudada é uma promissora alternativa para um maior controle da liberação do cetoprofeno, fato constatado, por Bentley *et al.*, 1999, quando utilizou um fármaco lipofílico, como o cetoprofeno em um sistema de poloxamer e lecitina de soja. Com isso as micelas de lecitina formadas mudam o equilíbrio do fármaco na matrix do gel de poloxamer (fase externa) com aumento da solubilidade do fármaco na preparação, alterando o fluxo de liberação do mesmo.

Conclusão

O método desenvolvido e validado mostra-se simples, rápido, exato e preciso para determinação de cetoprofeno em emulgel, além de ser específico para a quantificação de amostras oriundas de estudos de cinética de difusão *in vitro* sem a necessidade de utilização de técnicas adicionais de extração. Este método será importante para o desenvolvimento e otimização de formulações de emulgel de cetoprofeno com lecitina de soja em poloxamer® 407 e para promover a elucidação do seu mecanismo de permeação, na qual são livremente usados em Farmácias Magistrais.

ABSTRACT

The ketoprofen is a nonsteroidal antiinflammatory agent (NSAID) used in the symptomatic treatment of the reumatic arthritis. Its oral administration, for a long period, can cause gastric complication, as abdominal irritation, pains and ulcer. Emulgel studied is based on PLO (Pluronic® Lecithin Organogel) and its porpuose was to reach the systemic circulation and prevent the stomach passage. The objective of this study was to develop and validate a method for the ketoprofen assay in emugel by high peformance liquid chromatography (HPLC) and uses to quantify *in vitro* release kinetic. The analyses had been carried through by HPLC - UV, detection at 254 nm, with reverse phase column (C18; 150 mm and 5 x 4,6 μm). The isocratic mobile phase consist of pH 3 sodium phosphate buffer (20 mM) - acetonitrile (50:50). The linearity range of this study was 5 - 60 μg.mL-1 and r^2 = 0,99419. *In vitro* release kinetic specifity was evidenced. In conclusion, the method developed and validated for HPLC-UV revealed sensible, fast, precise, accurate and linear. Therefore, being able to be used for the ketoprofen quantification in emulgel galenic preparations.

Key words: ketoprofen, validation, *in vitro* release kinetic, emulgel

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como Fazer Experimentos.* Editora da Unicamp: Campinas, 2003.

BEMPONG, D. K.; BHATTACHARYYA, L. Development and validation of stability - incating high-performance liquid chromatographic assay for Ketoprofen topical penetrating gel. *J. Chomatog A* .Amsterdam, v.1073, p.341-346, 2005.

BENTLEY, M.V.L.B.; MARCHETTI, J. M.; NÁGILA, R.; ABI, Z. A.; COLLET, J. H. Influence of lecithin on some physucal chemical properties of poloxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies. *International Journal of Pharmaceutics.* London, v. 193, p. 49-55, 1999.

BRASIL. Resolução específica n° 899 de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanaliticos. ANVISA. *Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasilia DF, 02 de junho de 2003.*

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica estudo de caso. Determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. *Quím. Nova*. Brasil.vol. 24, n. 3, p. 374-380, 2001.

DVORÁK, J.; HÁJKOVÁ, R.;MATYSOVÁ, L.; NOVÁKOVÁ, L.; KOUPPARIS, M. A.; SOLICH, P. Simultaneous HPLC determination of Ketoprofen and its degradation products in the presence of preservatives in pharmaceutical. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.n° 36, p.625-629, 2004.

GARCIA, M. T. J. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA LÍPÍDEO / PROPILENOGLICOL PARA O CETOPROFENO: MECANISMO DE LIBERAÇÃO DE AÇÃO E ESTUDO DE PERMEABILIDADE "IN VITRO". Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da USP – Ribeirão Preto, 2001.

HOFFMANN, G.; MARKS, S. L.; TABOADA, J.; HOSGOOD,G. L.; WOLFSHEIMER, K. L . Transdermal methimazole tretment in cats with hyperthyroidism. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, USA, v.5, p.77-82, 2003.

ICH Q2(R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Disponível em: http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf. Acesso em: 01 dez. 2005.

JALÓN, E. G.; JOSA, M.; CAMPANERO, M. A, SANTOYO, S.; YAGARTUA, P. Determination by high performance liquid chromatography of Ketoprofen in vitro in rat skin permeation samples. . *J. Chomatog A* , Amsterdam, v.870, p. 143-149, 2000.

KUMAR, R.; KATARE, P. O. Lecithin Organogels as a potencial phospholipid-Structured System form Topical Drug Delivery: A Review. *AAPS Pharm SciTech.* v.06(2), p. E298 – E310, 2005.

LANZA, L.F.; CODISPOTI, J. R.; NELSON, E. B. An Endoscopic comparison of gastroduodenal injury with over-the-counter doses of Ketoprofen and acetaminophen. *The American Journal of Gastroenterology.* USA, v.93, n°07, p.1051-1054, 1998.

LENGER, I.; Kristl, A. Ph and energy dependent transport of Ketoprofen across rat jejunum in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. V.56, p.87-94, 2003.

LLÓPEZ-PINTO, J. M.; GONZÁLEZ – RODRIGUES, M. L.; RABASCO, A.M. Effect of cholesterol anda ethanol on dermal delivery from DPPC lipossomes. *International Journal of Pharmaceutics*.Spain, article in press, 2005.

MARTINDALE – 31ª EDIÇÃO – The extra pharmacopeia

MORAES, S. L.; REZENDE, M. O. O. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. *Quím. Nova*. Brasil, vol. 27, n. 5, p. 701-705, 2004.

MURDAN, S. A review of pluronic lecithin organogel as a topical and transdermal drug delivery system. *Hospital Pharmacist*, London,v.12, p.267-270, 2005.

NUNES, R. S.; SENNA, B. A. A.; SILVA, J. A.; SANTANA, D. P. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. *Revista Brasileira de Farmácia.* 2005; vol. 86, n. 3, p. 87-91.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Quím. Nova*. Brasil, v.27, n°05, p.771-780, 2004.

RODRÍGUEZ, L. A. G. Variability in risk gastrointestinal complications with differents nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American Journal of Medicine*.USA, v.104(3A), p.30S – 34S,1998

SCHMOLKA, I. R. Artificial skin.I. Preparation and properties of pluronic F127 gels for treatment of burns. *J.Biomed.Mater.Res*.v.06, p. 571-582, 1972.

SWARTZ M. E.; KRULL I. S. Analytical method development and validation. Marcel Dekker, New York, 1997.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de Métodos Cromatográficos. *Pharmaceutical Tecnology*. Boston, v. Junho, p.12-20, 1998.

THE MERCK INDEX; 12. ed. London: Whitehouse Station, p. 905, 1996.

WINGATE, G. Transdermal Methimazole in the treatment of cats with hyperhtyroidism. *International Journal of Pharmaceutical Compounding,* USA, v.06, p. 345-346, 2002.

5.0 Artigo II:

"Cinética de Difusão *in vitro* e atividade antiinflamatória de preparações magistrais de cetoprofeno".

Artigo a ser submetido.

Cinética de Difusão *in vitro* e atividade antiinflamatória de preparações magistrais de cetoprofeno

André Luis Menezes Carvalho[1], José Alexsandro da Silva[1], Aldo César Passilongo da Silva[3], José Homero de Souza Filho[1], Ivone Antônia de Souza[3], Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito[2], Davi Pereira de Santana[1].

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosméticos (NUDFAC), Universidade Federal de Pernambuco, UFPE-Recife, Brasil.
[2]Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID), departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil.
[3]Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

O Cetoprofeno é antiinflamatório não esteroidal (AINEs) utilizado no tratamento de artrite reumatóide, osteoartrite, espondilite anquilosante, gota e quando usado por via oral, por um período prolongado, associa-se a diversos distúrbios gastrintestinais sendo considerado de alto risco quando comparado a outros AINEs, de acordo com Lanza, 1998 e Rodriguez, 1998, sendo portanto, um excelente candidato à ser veiculado por via tópica, para uma ação local ou transdérmica (MARTINDALE, 1996; GOODMAN & GILMAN, 1996 , RODRIGUEZ, 1998)

A utilização de formas tópicas que veicule AINEs para ação local ou transdérmica tem suscitado interesse na pesquisa cientifica, visto que diversos sistemas fosfolipídicos, promotores de absorção percutânea, foram desenvolvidos com o intuito de ultrapassar a barreira cutânea, principalmente o estrato córneo, e atingir sítios específicos ou a circulação sistêmica de forma sistemática e constante, como lipossomas, microemulsões e emulsões (FRESTA, 2002; LÓPEZ- PINTO, 2005; DEGIM, 2006). A eficácia terapêutica de uma aplicação tópica depende da habilidade de penetração do fármaco através das camadas da pele

e a extensão da absorção depende das características do agente penetrante e do veículo (BONINA, 1994).

O Poloxamer 407® associado à lecitina granulada de soja é utilizada em Farmácias Magistrais como veículo de diversos fármacos para uso humano e veterinário, sendo denominados Pluronic Lecithin Organogel® (PLO). Diversas classes de medicamentos (antiinflamatórios, hormônios, anti histamínicos) têm sido veiculadas nestes sistemas, porém poucos estudos científicos sobre características físicas, reológicas, cinética de difusão *in vitro* e atividade farmacológicas têm sido reportados na literatura (WINGATE, 2002; HOFFMANN *et al*., 2003; MURDAN, 2005).

Desse modo, os objetivos deste trabalho foram estudar a cinética de difusão *in vitro* e atividade farmacológica *in vivo* de formulações galênicas de cetoprofeno baseadas em PLO e avaliar a influência da concentração da lecitina granulada de soja, do Poloxamer® e do Transcutol CG® utilizando-se a ferramenta estatística de planejamento fatorial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Cetoprofeno (DEG Farmacêutica–Brasil); Carragenina (Sigma-Aldrich-St. Louis, MO-EUA); Poloxamer 407®, lecitina granulada de soja, palmitato de isopropila, sorbato de potássio, ácido sórbico (Embrafarma); Profenid® Gel (Aventis Pharma); Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker-Phillipsburg, NJ - EUA); Etanol (Vetec – Brasil); Fosfato hidrogenado de sódio e o ácido orto-fosfórico (Sigma-Aldrich-St. Louis, MO-EUA); Água purificada Milli-Q® (Milipore - Molsheim); Membranas hidrofílicas de 0,45 μm da S&S (Brasil).

Quantificação de Cetoprofeno nas cinéticas de difusão *in vitro*

A técnica de quantificação utilizada foi Cromatografia a líquido de alta eficiência – CLAE/UV. A separação cromatográfica isocrática foi realizada com uma coluna C18 Gemini® (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) com 150 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel constituída de tampão fosfato hidrogenado de sódio 20 mM pH 3,0 e acetonitrila (50:50, v/v) que foi filtrada, degaseificada e bombeada a um fluxo de 1,5 mL/min. A temperatura do forno foi de 40 ºC e o volume de injeção de 20 µl (CARVALHO, 2006).

Modelo experimental

As formulações do emulgel de cetoprofeno foram preparadas de acordo com um planejamento fatorial de 2 níveis (-1 e +1), totalizando 8 experimentos (Tabela 1), os quais foram executados aleatoriamente. Na Tabela 2 estão expressos os valores reais e os níveis dos fatores estudados nos experimentos. As variações estudadas neste planejamento fatorial foram definidas tendo como base valores comumente descritos na literatura e usado em farmácias magistrais. Nos testes antiinflamatórios, os dados foram expressos em média ± erro padrão da média (e.p.m) e teste de "t" de Student para avaliar as diferenças entre os grupos tratados e controle com nível de significância de $p < 0,5$.

Tabela 1. Composição centesimal das formulações de emulgel de cetoprofeno % (p/p) de acordo com a matriz do planejamento fatorial 2^3

Componentes	***F1***	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**	**F7**	**F8**
Cetoprofeno	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Lecitina de soja	8	8	11	11	8	8	11	11
Ácido sórbico	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
Sorbato de potássio	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Transcutol ®	-	-	-	-	10	10	10	10
Propilenoglicol	1	1	1	1	1	1	1	1
Palmitato de Isopropila	11	11	11	11	11	11	11	11
Poloxamer gel 20% qsp	100	-	100	-	100	-	100	-
Poloxamer gel 30%qsp	-	100	-	100	-	100	-	100

Tabela 2. Valores reais e os níveis dos fatores estudados para o planejamento fatorial 2^3

Variáveis	Nível -1	Nível +1
Poloxamer 407® (%)	20	30
Lecitina de soja (%)	8,0	11
Transcutol GC® (%)	0	10

Preparo do emulgel de Cetoprofeno

As formulações dos emulgeis foram preparadas 48 horas antes dos ensaios, para que ocorresse a estabilização termodinâmica das micelas à temperatura ambiente (MORAES, 2004), as quais foram manipuladas através de uma farmacotécnica de preparo simples, a frio, com a dispersão do polímero (Poloxamer 407) e conservante em água destilada (2 a 8ºC) correspondente a fase aquosa do emulgel. Esta solução polimérica foi mantida sob refrigeração por 24 horas para aumentar a sua taxa de solubilização (SCHMOLKA, 1972; BENTLEY *et al.,* 1999). A fase oleosa foi obtida pela mistura (1:1) espontânea de lecitina granulada de soja e palmitato de isopropila e mantidas por 24 horas em repouso para facilitar a solubilização da lecitina. O cetoprofeno foi incorporado, sob agitação constante, com quantidades de fase oleosa 19% ou 22%, na qual foi adicionada a fase aquosa (solução de poloxamer 407® - 20% ou 30%) em quantidade suficiente para 100 % da formulação. Posteriormente, foi adicionado 10 g de Transcutol CG® nas formulações que utilizaram o promotor de absorção de acordo com a tabela 1. Manteve-se sob agitação constante por 30 minutos com o auxílio de um agitador mecânico.

Caracterização Físico-Química das formulações

Análise Macro e Microscópica das Formulações

As características organolépticas (aspecto, cor) foram avaliadas visualmente, sendo registrada qualquer mudança significativa durante o período de estudo. Já a análise microscópica foi realizada medindo-se o diâmetro de 100 gotículas em ocular micrométrica Remari PCR. Para tanto, a amostra foi diluída em uma solução de propilenoglicol em água (1:1), na proporção de uma parte de amostra para vinte partes de solução (COELHO, 2005). A lâmina foi preparada e observada em microscópio óptico Coleman com objetivas de 10, 40 ou 100x de magnitude e uma ocular de 10 aumentos.

Teste de Centrifugação

As formulações foram centrifugadas em centrífuga Excelsa Baby II, Fanem – 206R, durante 30 min a 3500 rpm e no final foi observado a ocorrência ou não de separação de fases. O produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação (BRASIL, 2004).

Determinação do pH

O pH das formulações foi avaliado utilizando um potenciômetro digital com eletrodo de vidro e sensor de temperatura da marca Analion PM 608, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de 25 ^{o}C.

Determinação da espalhabilidade dos emulgéis

A espalhabilidade foi determinada à 25 ^{o}C seguindo a metodologia adotada por ALVES (1996), ZANIN (2001) e COELHO (2005), na qual os valores da espalhabilidade é realizado em triplicatas e calculados a partir da equação 1.

$$Ei = \frac{d^2 . \pi}{4}$$

(Equação 1)

Onde:

Ei = espalhabilidade da amostra para peso i (mm^2);

d = diâmetro médio (mm).

$\pi = 3,14$

Reologia das formulações

O comportamento reológico das formulações foi determinado a partir das análises de viscosidade aparente e relativa, utilizando-se Viscosímetro Rotacional da marca Rheology International, usando "spindle 7", o qual permite medir eletronicamente a força de torção já convertida em viscosidade. Foram coletados dados de força de cisalhamento e taxa de cisalhamento num intervalo de 1 a 37 r.p.m para construção e caracterização reológicas das formulações. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Cinética de difusão *in vitro*

As cinéticas de difusão *in vitro* foram conduzidas utilizando células de difusão tipo Franz com área difusional de 1,15 cm^2, volume de ± 6 mL e usando membranas artificiais hidrofílicas de acetato de celulose S&S de 0,45 μm. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato 20 mM em pH = 7,2 num sistema composto de seis células individuais conectados a um banho termostatizado à 37 ± 0,5 ^oC sob agitação constante de 100 rpm em agitador magnético por um período de 6 horas. As membranas foram colocadas cuidadosamente no compartimento doador de forma que ficassem em contato com a solução receptora. Todas as membranas foram umedecidas no tampão fosfato por uma hora, antes do início dos experimentos. No compartimento doador, foram aplicados 100 mg de cada

formulação diretamente sobre a membrana artificial de cada célula, o que corresponde a 2500 µg de cetoprofeno. As amostras da solução receptora foram coletadas nos seguintes tempos: 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 e 6,0 horas. O volume total da fase receptora de cada célula (≈ 6 mL) foi substituído a cada amostragem com tampão fosfato na mesma temperatura (37 ± 0,5 ^{o}C) para manutenção das condições "sink" do sistema. A quantidade de fármaco liberada no compartimento receptor foi quantificada por CLAE-UV através do método analítico desenvolvido e validado previamente (CARVALHO, 2006).

Atividade antiinflamatória do emulgel de cetoprofeno

Neste ensaio foram utilizados ratos divididos em 05 grupos com 05 animais do mesmo sexo. Os animais foram privados de alimentação por um período de 18 horas antes do início dos experimentos, com água *ad libitum*. Foi utilizado o modelo de inflamação aguda, conhecido como edema de pata induzido por carragenina (WINSTER *et al*, 1962) por ser um método rápido e estável (MASCOLO *et al*, 1997). Inicialmente, foi realizada a mensuração da pata traseira direita dos animais, para posterior indução do edema na respectiva pata de todos os animais por injeção subplantar de 0,1 mL de carragenina a 0,1 %. Em seguida, após trinta minutos, foi realizada uma nova mensuração das patas edemaciadas utilizando plestiômetro adaptado. Foram administrados por via tópica, no dorso de cada animal, a formulação placebo F3 e F8 (sem fármaco – grupo controle), o gel de Profenid® 2,5 % (grupo padrão) e as formulações testes F3 e F8 com cetoprofeno (grupo teste). O gel de Profenid® foi escolhido, por ter uma baixa biodisponibilidade tópica e praticamente nenhuma possibilidade de absorção sistêmica significativa (BRASIL, 2007). A mensuração, em cada animal, foi efetuada a cada 60 minutos durante 06 horas e o percentual da inibição foi calculado através da equação: Vc – Vt / Vc x 100, onde Vc é a média do aumento do volume das patas dos animais controle e Vt média do aumento do volume das patas do grupo tratado.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As formulações do emulgel de Cetoprofeno foram produzidas em escala de bancada e os lotes mostraram-se reprodutíveis de cor amarelada; opacas e com sensorial de forma farmacêutica tipo gel; não houve separação de fases no teste de centrifugação; pH final em torno de 6 , sendo as formulações F3 e F8 as escolhidas para o estudo farmacológico, por apresentarem melhores fluxos nas cinéticas de liberação *in vitro* conforme descrição da Tabela 3.

Tabela 3. Resultados dos testes físico-químicos e parâmetros da cinética de difusão *in vitro* (Valores médios de triplicatas (n = 03, repetições)).

Testes	***F1***	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**	**F7**	**F8**
Cor	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM
Microscopia (μm)	1,620 ± 0,174	1,733 ± 0,020	1,843 ± 0,035	1,926 ± 0,025	1,816 ± 0,076	1,820 ± 0,036	1,813 ± 0,116	1,873 ± 0,025
Centrifugação	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP
Viscosidade aparente *	6,683 ± 0,936	10,033 ± 0,340	12,876 ± 0,480	16,400 ± 0,953	18,800± 0,435	21,600± 1,676	17,906 ± 0,585	19,640 ± 0989
Fluxo ($\mu g/cm^2.h^{-1}$)	8,05 ± 3,02	32,21 ± 0,69	50,59 ± 3,42	17,77 ± 1,86	37,41 ± 3,49	19,42 ± 0,49	26,46 ± 1,21	46,17 ± 3,81
Q ($\mu g.cm^{-2}$)**	264,83 ± 8,17	256,61± 25,44	398,81± 31,59	168,31± 19,26	346,13± 25,44	221,42± 5,69	290,95± 7,88	260,71± 14,38

AM = amarela; AP = aprovado

*velocidade do "spindle 7" de 0,1 r.p.m

** Q = quantidade de cetoprofeno liberada após 06 horas de ensaio de difusão.

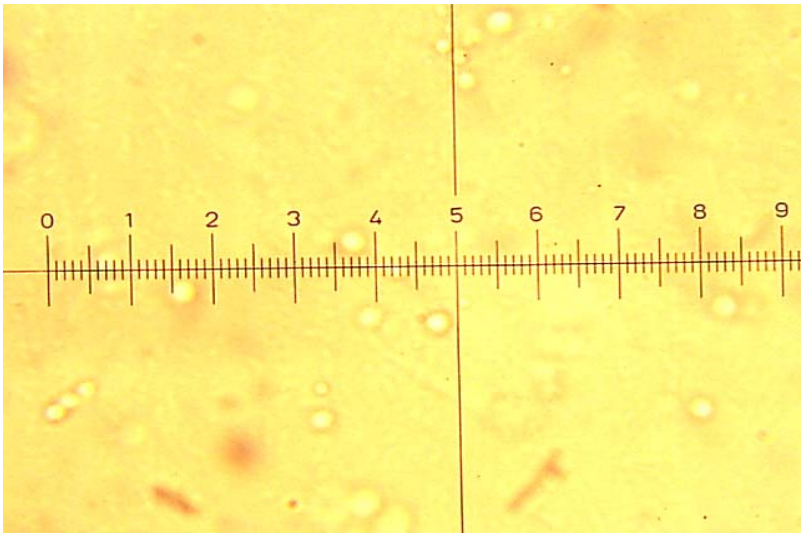


Figura 1. Microfotografia da formulação F3 de emulgel de cetoprofeno na lente ocular micrométrica com aumento de 100x

Além disso, o tamanho das gotículas micrométrico comprova que as formulações podem ser classificadas como sistemas macroemulsionados, de acordo com a tabela 3 e figura 1. Diferindo, assim, das informações que o fornecedor Embrafarma, que disponibiliza ao setor magistral os componentes do PLO, o qual afirma ser um sistema microemulsionado.

A reologia consiste no estudo do escoamento, ou deformação do material em estudo quando submetido a uma tensão**.** O método é aplicável na caracterização de sistemas emulsionados, pois o comportamento do fluido esta diretamente relacionada com o tipo e grau de organização do sistema, além de poder ser usado para checar a qualidade durante o processo de produção, permitindo um estudo do efeito da adição do cetoprofeno nas formulações.

Observa-se que nas formulações em que o Poloxamer 407® encontra-se no nível -1 obtêm-se uma viscosidade aparente menor e isto pode ser explicado pelo fato de que a malha polimérica do hidrogel (Poloxamer®), em concentrações maiores, cria uma resistência maior às rotações do splindle que o viscosímetro impõe aos sistemas, por isso temos viscosidades maiores nas formulações que possuem poloxamer no nível +1 (LACHMAN *et al*, 2001; BARRY, 2005).

O comportamento reológico observado nas formulações é típico de fluidos não - newtonianos, pseudoplásticos conforme expressado na Figura 3, pois o aumento da velocidade de cisalhamento é acompanhado pelo crescimento da força de cisalhamento, porém a relação entre a velocidade e a força de cisalhamento não é linear, não obedecendo, portanto, a segunda lei de Newton (lei fundamental do movimento). A Figura 2 mostra que a viscosidade diminui em função do aumento da taxa de cisalhamento e este fenômeno é atribuído ao fato de que existe uma malha polimérica formada pelo poloxamer 407® (SCHRAMM, 1998; ALMEIDA, 2003; FERREIRA, 2005).

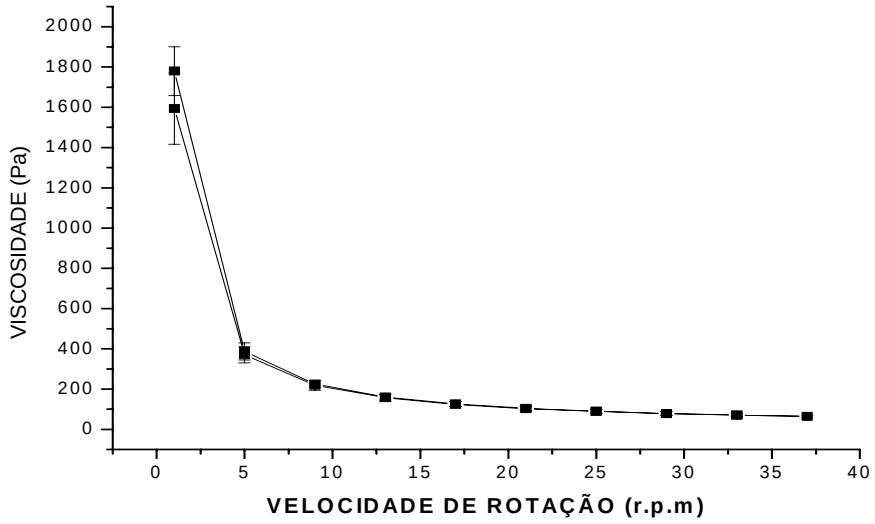


Figura 2. Viscosidade relativa de emulgel de cetoprofeno em fluxo de rampa ascendente e descendente de 1 a 37 rpm.

O comportamento tixotrópico pseudoplástico foi evidenciado nas formulações estudadas, pois foi observada uma deformação dos sistemas, ou seja, houve uma diferença entre a curva ascendente e descendente formando uma área de histerese que é típico de fenômenos tixotrópicos, Figura 3. A literatura descreve que a viscosidade muda em função do cisalhamento e que os produtos tópicos, após cisalhamento, tornam-se menos viscosos melhorando a sua espalhabilidade, contribuído com o aumento da absorção cutânea (BRUMMER, 1999; CORRÊA, 2005).

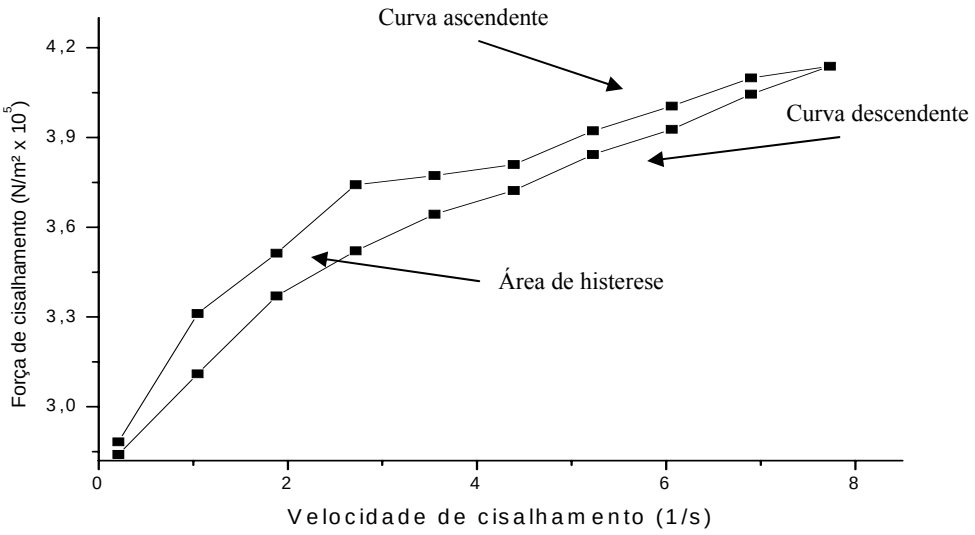


Figura 3. Comportamento reológico da amostra F3 de emulgel de cetoprofeno submetido a fluxo de rampa ascendente e descendente de 1.0 a 37 r.pm.

Espalhabilidade das formulações

A espalhabilidade é definida como a capacidade de escoamento do semi-sólido frente a um peso padronizado (ALVES, 1996). É um importante parâmetro de caracterização, pois mimetiza o desempenho das formulações quando aplicadas topicamente. A Figura 4 mostra que as formulações que possuem o Transcutol®, agente promotor de permeação, possui uma maior espalhabilidade (F7; F5; F6 e F8, respectivamente), ou seja, o Transcutol® promove maior emoliência para os sistemas emulsionados, facilitando o deslocamento das amostras submetidas aos pesos das placas.

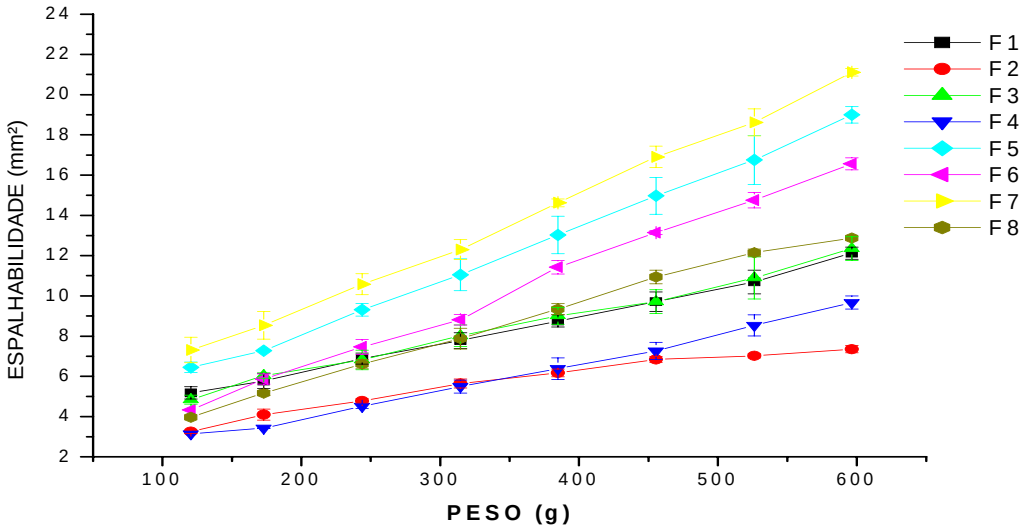


Figura 4. Espalhabilidade das formulações após 48 horas de preparo, em função do peso (g) aplicado sobre as amostras.

Cinética de difusão

O fluxo das cinéticas (*J*) foi calculados através do coeficiente angular do gráfico da quantidade liberada (µg/mL) versus tempo (horas) descrito na Figura 5, o qual foram obtidos a partir da equação de regressão linear de cada replicata conforme descrito por (LLÓPES *et al.*, 2005). Após 6 horas de ensaio, de cada formulação, foram calculados o fluxo no estado de equilíbrio e a quantidade liberada de cetoprofeno. Para construção das retas de regressão, foram utilizados os 5 últimos pontos de cada cinética das formulações estudadas.

A Tabela 3 mostra que os melhores fluxos médios obtidos foram das formulações F3 e F8 e a maior quantidade liberada de cetoprofeno foi à preparação sem o Transcutol CG (F3). Apesar disso, o fluxo entre as duas formulações foram semelhantes (50,59 ± 3,42 e 46,17 ± 3,81 µg/cm².h^{-1} respectivamente), mostrando, portanto, que a ação do Transcutol CG® não foi evidenciada neste estudo *in vitro*.

Um das estratégias de aumento de permeação pelo Transcutol CG® é a capacidade de aumentar a hidratação cutânea e diminuir a resistência da barreira epidérmica à penetração de

substâncias (GANEM-QUITAMAR, 1997). Como neste estudo de difusão *in vitro* a membrana utilizada foi artificial, não foi possível avaliar o aumento do fluxo pela presença do referido agente de permeação Transcutol CG®.

A Figura 5 mostra os perfis de todas as cinéticas de difusão *in vitro* na qual se observa, após 2 horas, um comportamento semelhante entre todas as formulações, ou seja, elas tendem a entrar em equilíbrio ocorrendo uma diminuição na quantidade liberada de cetoprofeno por intervalo de tempo. Verifica-se que houve, também, uma maior quantidade liberada e maior fluxo no estado de equilíbrio para a formulação F3. Atualmente, essa formulação F3, é utilizada em Farmácia Magistral para veicular diversos fármacos, principalmente os AINEs, com intuito de alcançar a via sistêmica.

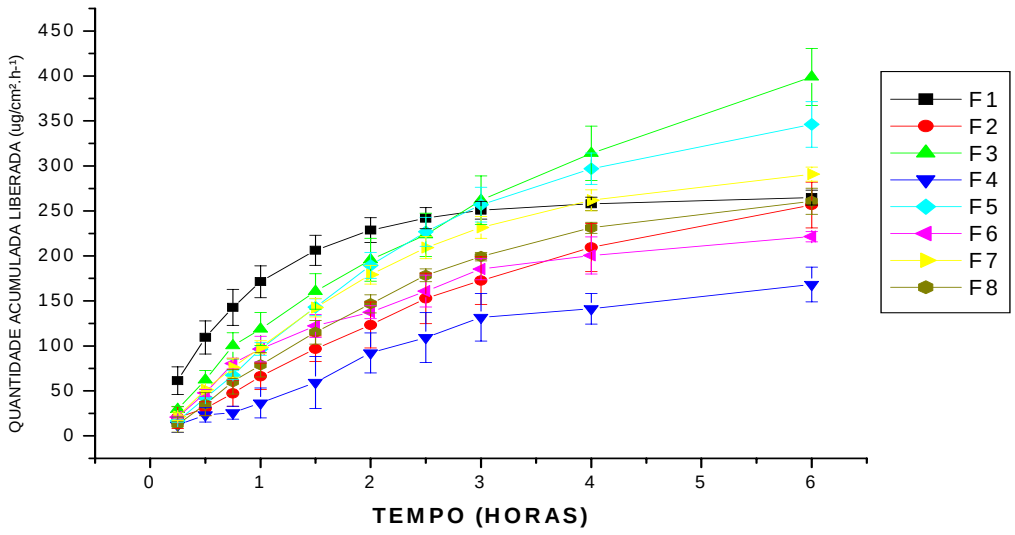


Figura 5. Cinética de difusão *in vitro* das 8 formulações de emulgel de cetoprofeno do planejamento fatorial 2^3.

De acordo com a ferramenta estatística de planejamento fatorial, obtiveram-se os efeitos individuais e de interações, como está descrito na Tabela 5. Esse modelo foi obtido a partir da regressão linear dos dados experimentais para a variável resposta fluxo. Observa-se que com o aumento da concentração de lecitina de soja, nível -1 para o nível +1, ocorre um aumento de no fluxo ($\mu g/cm^2.h^{-1}$) de cetoprofeno. Esse fato pode ser explicado pelo aumento

da solubilidade do cetoprofeno na fase oleosa do emulgel. Com o aumento da concentração de Poloxamer 407®, nível -1 para nível +1, ocorre uma diminuição de fluxo ($\mu g/cm^2.h^{-1}$) do cetoprofeno, e isso pode ser atribuído ao fato de que a malha do polímero (hidrogel) impõe uma resistência no fluxo do referido fármaco. RICCI, 2005, verificou que o aumento da concentração de poloxamer 407 de 20 a 30% reduziu quase a metade da liberação do fármaco modelo (lidocaína).

O efeito de interação das três variáveis de entrada (Poloxamer 407®; lecitina de soja e Transcutol CG®) foi de 99,84 ± 0,19. Por isso, faz-se necessária maior investigação nessas formulações com estas combinações já que existe um significativo impacto na liberação *in vitro* do cetoprofeno através das referidas proporções de excipientes.

Tabela 5. Resultados do planejamento fatorial 2^3 para o fluxo de liberação *in vitro* de cetoprofeno (%)

Efeitos Principais:	(%)
1 (Poloxamer®)	- 11,22 ± 0,19
2 (Lecitina de soja)	10,84 ± 0,19
3 (Transcutol CG®)	5,70 ± 0,19
Interações de dois fatores	
12	-4,40 ±0,19
13	3,605 ± 0,19
23	- 2,71 ± 0,19
Interação de três fatores	
123	99,84 ± 0,19
Média global dos efeitos	30,75 ± 0,095

Para decidir se os efeitos calculados do planejamento fatorial são significativamente diferentes de zero, emprega-se o teste "t". No nível de 95% de confiança, o valor de t correspondente a 8 graus de liberdade é 2,306 (t crítico). De acordo com BARROS NETO, 1995, os resultados obtidos dos efeitos serão estatisticamente significativos quando o valor absoluto exceder a seguinte expressão: *t x erro padrão (2,306 x 0,19)*. Portanto, todos os

efeitos estudados estão acima do resultado (0,4381) da expressão, o erro padrão está descrito na tabela 5.

Atividade antiiflamatória

O estudo de atividade *in vivo* foi realizado para avaliar a diferença de duas formulações que obtiveram os melhores perfis *in vitro*, em relação ao fluxo médio no estado de equilíbrio ("steady state") das cinéticas *in vitro*. Foram comparados os perfis das Formulações F3 e F8 com uma forma farmacêutica gel industrializado (Profenid®). O referido gel é utilizado para ação tópica e possui uma baixa biodisponibilidade plasmática após aplicação na pele (BRASIL, 2007). A Figura 6 mostra que as formulações (placebo F3, Teste F3 e Profenid®) nas concentrações aplicadas no dorso do animal (25mg de cetoprofeno), apresentaram uma reação comportamental semelhante ao da redução do edema. Não houve diferenças significativas, a partir do tratamento estatístico (T student, $p < 0,05$), entre os grupos avaliados, ou seja, foi obtido o mesmo comportamento das formulações placebo e F3 com 2,5 % de cetoprofeno, e esta concentração não foi suficiente para alcançar níveis sanguíneos que reduzissem o edema.

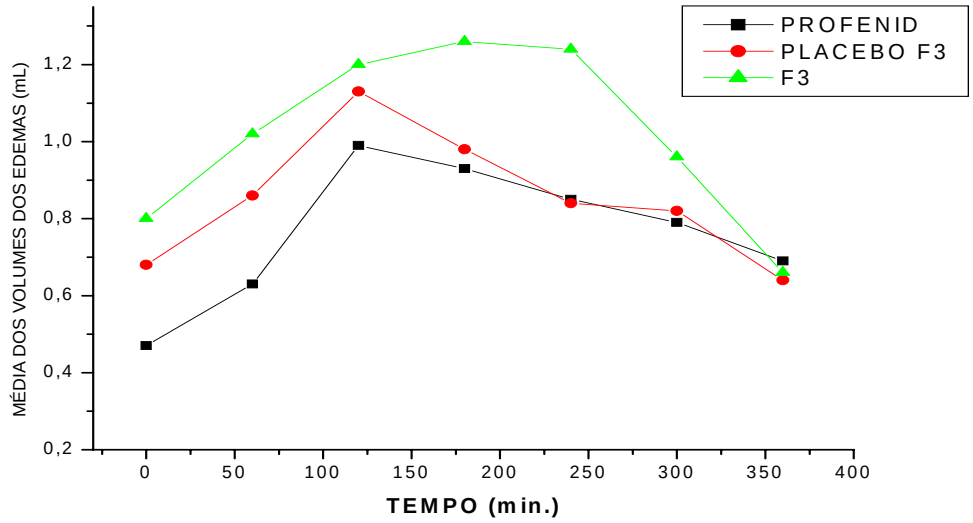


Figura 6. Efeito das formulações F3, Profenid® (25 mg/cm²) por via tópica sobre o modelo edema de patas induzido por carragenina em ratos Wistar adultos. *P <0,05 comparado com o controle que recebeu apenas o placebo F3 (formulação sem fármaco). Teste "t" de student.

A Figura 7 mostra que para a formulação F8, obteve-se uma diminuição significativa do edema quando comparado com a formulação placebo F8 (sem fármaco) após 05 horas de ensaio. Além disso, neste momento do ensaio, foi observado que o volume do edema foi menor que a formulação comercial Profenid®. Provavelmente, essa diferença de resposta da formulação F8, deve-se à presença do promotor de permeação percutânea (Transcutol CG®) em sua composição (nível +1). Comparando-se com a F3 (nível -1 / ausência de Transcutol CG®), pode-se afirmar que quando o Transcutol CG® na concentração utilizada (nível +1), a F8 possui provável absorção sistêmica, pois possui diferenças significativas na resposta em relação ao placebo. Entretanto, a atividade *in vivo* foi baixa quando comparada com as respostas de outros antiinflamatórios usualmente avaliados pelo método de redução de edema em pata de rato. Provavelmente, a concentração de cetoprofeno nas formulações do emulgel não foi suficiente para permear e alcançar a circulação sistêmica em níveis terapêuticos. Sendo assim, torna-se necessária à realização de novos estudos que envolvam doses diferentes do fármaco nas preparações, por exemplo, uma curva de dose resposta para certificarmos um possível efeito farmacológico sistêmico após aplicação tópica no dorso do animal.

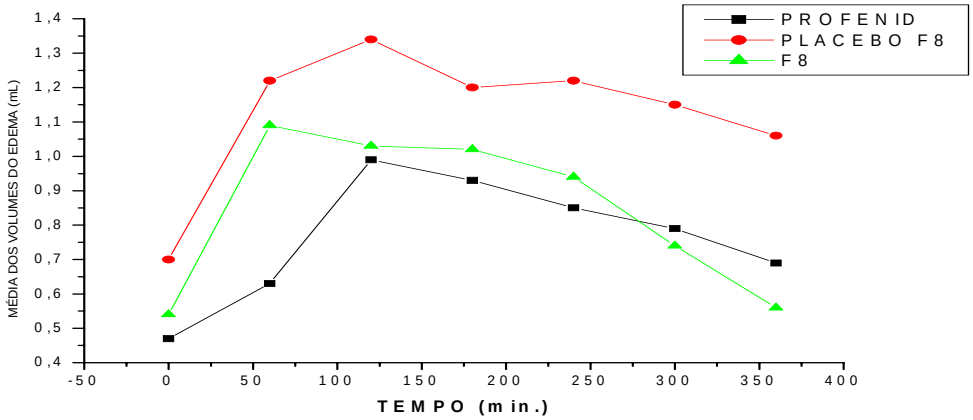


Figura 7. Efeito das formulações F8, PROFENID® (25mg/cm²) por via tópica sobre o modelo edema de patas induzido por carragenina em ratos Wistar adultos. *P <0,05 comparado com o controle que recebeu apenas o placebo F8 (formulação sem fármaco). Teste "t" de student.

4.0 CONCLUSÃO

Face às considerações expostas, conclui-se que as amostras de emulgel avaliadas possuem tamanhos de gotículas micrométricas, aspecto macroscópico característico de sistemas emulsionados. O comportamento reológico verificado foi de fluido não-newtoniano pseudoplástico com tixotropia e que todas as preparações avaliadas foram resistentes ao stress da centrifugação. Em relação à cinética de difusão, a maioria das formulações possuiu fluxo semelhante e que as formulações F3 e F8 apresentaram maiores fluxos médios. No estudo *in vivo*, a formulação F3 não possui diferença em relação ao placebo quanto à resposta de redução do edema de pata de rato, já a formulação F8 reduziu o edema em até 47,17 % com diferença significativa do placebo. Portanto, frente aos resultados obtidos, pode-se afirmar que a F3 não possui absorção percutânea e a F8 teve uma pequena redução do edema em função da presença do promotor de permeação cutânea Transcutol CG®.

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I. F; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético - farmacêutica. ***Cosmetic& Toiletries*** (edição em português), vol. 15, p. 97 – 100, 2003.

ALVES, M. P. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de bases dermatológicas. Influência de promotores de absorção na permeação transdérmica de piroxicam.Santa Maria, UFMS, 1996. 148p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E.R. Planejamento e otimização de experimentos. Editora Unicamp, Campinas, p.69- 70, 1995.

BENTLEY, M. V. L. B.; MARCHETTI, J. M.. Influence of lecithin on some physical chemical properties of polaxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studes***. International Journal of Pharmaceutics*** .v.**193**, p. 49-55, 1999.

BONINA, F. P.; MOTENEGRO, L. Veicle effects on in vitro heparin release and skin penetration from different gels. ***International Journal of Pharmaceutics***.v. 102. p. 19-24, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos.Brasília, 46p, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.In : Bulário eletrônico. Brasília. Disponível em http://bulario.bvs.br/index.php?action=search. Acessado em: 02 de Janeiro de 2007.

BRUMMER, R; GODERSKY, S. Rheological studies to objectify sensations occurring when cosmetic emulsions are applied to the skin. ***Colloids and surfaces*** *A: Physicochemical and Engineering aspects*, v.152,p. 89-94, 1999.

CARVALHO, A. L. M.; SOUZA, C. E. M. S.; BEDOR, D. C. G.; SILVA, J.A..; EGITO, E. S. T.; SANTANA, D. P. Desenvolvimento e validação de método analítico de emulgel de cetoprofeno e aplicação em cinética de difusão *in vitro*. ***Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.*** Submitted, 2006.

COELHO, L. C.S. Protetor solar: desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da eficácia e segurança. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas.Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2005.

CORRÊA, N. M. C.; JÚNIOR, F.B. C.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. ***Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas***, v.41, p.73-78, 2005.

Embrafarma, <www.embrafarma.com.br>, disponível em 10 de dezembro de 2006.

FERREIRA, E. E.; BRANDÃO, P.R.G; KLEIN, B; PERES, A. E. C. Reologia de suspensões minerais: uma revisão. ***R. Esc.Minas, Ouro Preto***, v.58(1), p.83-87, 2005.

GANEM – QUINTAMAR, A.; LAFFORQUE, C.; FALSON-RIEG, F.; BURI, P. Evaluation of the transepidermal permeation of diethylene glycol monoethyl ether and skin water loss. ***International Journal Of Pharmaceutics***, v.147, p.165-171, 1997.

GOODMANL, L. S.& GILMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9ª Ed. Rio de Janeiro.McGraw – Hill, 1996.536p.

HOFFMANN, G.; MARKS, S. L.; TABOADA, J.; HOSGOOD,G. L.; WOLFSHEIMER, K. L . Transdermal methimazole tretment in cats with hyperthyroidism. ***Journal of Feline Medicine and Surgery***, USA, v.5, p.77-82, 2003.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica.editora calouste gulbenkian,v. I, p.212-214, 2001.

LANZA, L.F.; CODISPOTI, J. R.; NELSON, E. B. An Endoscopic comparison of gastroduodenal injury with over-the-counter doses of Ketoprofen and acetaminophen. ***The American Journal of Gastroenterology.*** USA, v.93, n°07, p.1051-1054, 1998.

LLÓPEZ-PINTO, J. M.; GONZÁLEZ – RODRIGUES, M. L.; RABASCO, A.M. Effect of cholesterol anda ethanol on dermal delivery from DPPC lipossomes. ***International Journal of Pharmaceutics***.Spain, article in press, 2005.

MASCOLO, N. Biological screening of Italian medicinal plants anti-inflammatory. *Phytotherapy Research*.1, p.28-32, 1997.

MORAES, S. L.; REZENDE, M. O. O. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. ***Quím. Nova***. Brasil, vol. 27, n. 5, p. 701-705, 2004.

MURDAN, S. A review of pluronic lecithin organogel as a topical and transdermal drug delivery system. *Hospital Pharmacist*, London,v.12, p.267-270, 2005.

RICCI, E. J.; LUNARDI, L. O.; NANCLARES, D. M. A.; MARCHETTI, J . M. Sustained release of lidocaine from poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics*. v.288. p.235-244, 2005.

RODRÍGUEZ, L. A. G. Variability in risk gastrointestinal complications with differents nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American Journal of Medicine*.USA, v.104(3A), p.30S – 34S,1998.

SCHMOLKA, I. R. Artificial skin.I. Preparation and properties of pluronic F127 gels for treatment of burns*. Journal Biomed. Mater. Res.* v. 6, p.571-582, 1972.

SCHRAMM, G. A Pratical Approach to Rheology and Rheometry, 2.ed, Alemanha, p.22, 1998.

WINGATE, G. Transdermal Methimazole in the treatment of cats with hyperhtyroidism. *International Journal of Pharmaceutical Compounding,* USA, v.06, p. 345-346, 2002.

WINTER, C. A. Carragenin – induced dema in hind paw of the rat as assay for anti-inflammatory drug. Proceeding of the Society for Eperimental Biology and Medicine 111, 544 – 547.

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; CHINELLI, M.; DALMAZ, A . C. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. Revista Visão Acadêmica, Curitiba, v.2, n° 2,p.47-58, 2001.

6.0 Conclusões

6.0 CONCLUSÕES

De acordo com as metodologias utilizadas e com os resultados obtidos, pode-se concluir:

- O método desenvolvido por CLAE – UV é rápido, linear, preciso e exato para quantificação de cetoprofeno em amostras de emulgel baseadas em PLO;

- A aplicação do método de quantificação de cetoprofeno em amostras derivadas de estudos de cinética de difusão *in vitro* foi evidenciada;

- As amostras obtidas de emulgel foram caracterizadas como sistemas emulsionados opacos, tamanhos de gotículas micrométricas e com os melhores perfis de espalhabilidade nas formulações que possuíam a presença de Transcutol CG;

- O comportamento reológico do emulgel é pseudoplástico e com fenômenos comprovados de tixotropia;

- A metodologia utilizada na cinética de difusão *in vitro* foi reprodutível devido aos baixos desvios padrões obtidos na maioria das cinéticas. As formulações F3 e F8 conseguiram obter maiores fluxos de liberação *in vitro,* utilizando membranas artificiais de acetato de celulose (hidrofílicas). A presença de transcutol não propiciou grandes aumentos de fluxo em relação às formulações que não possuíam o promotor de permeação. Visto que não existiu diferença estatística em relação às duas formulações que obtiveram os maiores fluxos (F3 e F8);

- De acordo com o planejamento fatorial, o aumento da concentração de lecitina de soja promove um efeito positivo no aumento da liberação *in vitro* de cetoprofeno, isso ocorre pelo aumento da solubilidade do fármaco na fase oleosa do emulgel. O aumento da concentração de poloxamer diminui a liberação do cetoprofeno. Tal fato é atribuído a resistência que a malha do hidrogel impõem as gotículas do emulgel;

- O efeito de interação das três variáveis de entrada é alto. Por isso, faz-se necessária maior investigação nessas formulações com estas combinações já que existe um significativo impacto na liberação *in vitro* do cetoprofeno através das referidas proporções de excipientes. Isso demonstra a possibilidade do desenvolvimento de sistemas de liberação de fármaco com alto fluxo percutâneo, utilizando essas combinações como veículo;

- A formulação F3, usualmente preparada em Farmácia Magistral, não possui diferença em relação ao placebo quanto à resposta de redução do edema de pata de rato. A formulação F8, após 06 horas reduziu o edema em até 47,17% e existiu diferença significativa do placebo. Portanto, frente aos resultados obtidos, afirma-se que a F3 não possui absorção percutânea e a F8 teve uma pequena redução do edema, provavelmente, em função da presença de um promotor de permeação cutânea (Transcutol CG);

- As Farmácias Magistrais que preparam o PLO devem rever a utilização deste veículo de alta penetração cutânea, com a finalidade transdérmica. Visto que não existe comprovação da penetração tópica e a manutenção dos níveis plasmáticos constantes de algum fármaco capaz de alcançar níveis terapêuticos.

7.0 Referências Bibliográficas

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetic & Toiletries** (edição em português). v.15. p. 96-100, 2003.

ANSEL, H.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. JR. Farmacotécnica. São Paulo. Editora Premier, 2000. 398-403 p

AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. Editora Artmed, Porto Alegre, 2ª edição, p 506-507, 2005.

BEMPONG, D. K.; BHATTACHARYYA, L. Development and validation of stability - incating high-performance liquid chromatographic assay for Ketoprofen topical penetrating gel. **J. Chomatog A** .Amsterdam, v.1073, p.341-346, 2005.

BENTLEY, M. V. L. B.; MARCHETTI, J. M..; RICARDO,N.; ALI-ABI, Z.; COLLET, J.H. Influence of lecithin on some physical chemical properties of polaxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studes. **International Journal of Pharmaceutics.** v.193, p. 49-55, 1999.

BENY, M.G. Fisiologia da pele. **Cosmetic & Toiletries**, v.12 Mar / Abr, p.44-50, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC n° 214, de 18 de dezembro de 2006. Brasília, Diário oficial da União de 18 de dezembro de 2006.

DOWLING, T. C; ARJOMAND, M.; LIND, E. T.; ALLEN, L. V.; MC PHERSON, M. L. Relative bioavailability of Ketoprofen 20% em poloxamer lecithin organogel. **Am J Health – Sys Pharm**, EUA, vol 61, p. 2541 – 2544, 2004.

DVORÁK, J.; HÁJKOVÁ, R.;MATYSOVÁ, L.; NOVÁKOVÁ, L.; KOUPPARIS, M. A.; SOLICH, P. Simultaneous HPLC determination of Ketoprofen and its degradation products in the presence of preservatives in pharmaceutical. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.**n° 36, p.625-629, 2004.

Embrafarma http://www.embrafarma.com.br/noticias.asp?nCod=30 referente aos conceitos

Embrafarma http://www.embrafarma.com.br/noticias.asp?nCod=33 referente a preparação

FERREIRA, E. E; BRANDÃO, P. R. G; KLEIN, B.; PERES, A.E. C. Reologia de suspensões minerais: uma revisão. **R. Esc. Minas**, Ouro Preto, vol. 58 (1), p. 83-87, 2005.

GANEM – QUINTANAR, A.; LAFFORGUE, C.; FALSON-RIEG, F.; BURI, P. Evaluation of the transepidermial permeation of diethylene glycol monoethyl ether and skin water loss. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 147, p.165-171, 1997.

GARCIA, M. T. J. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA LÍPÍDEO / PROPILENOGLICOL PARA O CETOPROFENO:

MECANISMO DE LIBERAÇÃO DE AÇÃO E ESTUDO DE PERMEABILIDADE *IN VITRO*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da USP – Ribeirão Preto, 2001.

HOFFMAN, G; MARKS, S. L.; TABOADA, J.; WOLFSHEIMER, K. L. Transdermal methimazole treatmente in cats with hypertyroidism. **Journal of Feline**. EUA, vol 05, p. 77-82, 2003.

http://www.galenotech.org/reologia2.htm

JALÓN, E. G.; JOSA, M.; CAMPANERO, M. A, SANTOYO, S.; YAGARTUA, P. Determination by high performance liquid chromatography of Ketoprofen in vitro in rat skin permeation samples. . **J. Chomatog A** , Amsterdam, v.870, p. 143-149, 2000.

JÚNIOR, A. S. C.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica**. Arq Bras Oftalmol**. Brasil, vol 66, p. 385-391, 2003.

KANDAVILLI, S; NAIR, V.; PANCHAGNULA, R. Polymers in transdermal drug delivery systems. **Pharmaceutical,** may, p. 62-80, 2002.

KIBBE, A. H. Handbook of Pharmaceutical excipinets. 31ª edição, 1999.

KNOW, J. W.; HAN, Y.K.; LEE, W.J.; CHO, C. S.; PAIK, S. J.; CHO, D.I.; LEE, J.H.; WEE, W.R. Biocompatibily of poloxamer hydrogel as an injectable intraocular lens. **J. Cataract Refract Surg.**v.31. p. 607-613, 2005.

LACHMMAN, H.A.; LIBERMAN, H. A.; KANING, J.L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa. Calouste Gulbekian, 2001.v I.. 211 – 224p.

LANZA, L.F.; CODISPOTI, J. R.; NELSON, E. B. An Endoscopic comparison of gastroduodenal injury with over-the-counter doses of Ketoprofen and acetaminophen. **The American Journal of Gastroenterology.** USA, v.93, n°07, p.1051-1054, 1998.

LIRA, A. A. M. ESTUDO DE PERMEAÇÃO *IN VITRO* E AVALIAÇÃO TÉRMICA DE EMULGEL TÓPICO A BASE DE LAPACHOL. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFPE, Recife, 2003.

LLÓPEZ-PINTO, J. M.; GONZÁLEZ – RODRIGUES, M. L.; RABASCO, A.M. Effect of cholesterol anda ethanol on dermal delivery from DPPC lipossomes**. *International Journal of Pharmaceutics***.Spain, article in press, 2005.

LOPES, P. S.; KANEKO, T. M. Membranas no estudo de permeação cutânea. **Cosmetic & Toiletries** *(Edição em Português)*.v.12. p. 62 – 65, 2000.

MARTINDALE – The Extra Pharmacopoeia . Evaluated information on the world's drugs and medicines. The Royal Pharmaceutical Society. Thirty-first edition.p., 1999.

MURA, P; FAUCCI, M. T.; BRAMANTI, G.; CORTI, P. Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. **European Journal of Pharmaceutical sciences**.vol. 9, p.365-372, 2000.

MURDAN, S. A review of pluronic lecithin organogel as a topical and transdermal drug delivery system. **Hospital Pharmacist**, London,v.12, p.267-270, 2005.

OLIVEIRA, A.G. O; SCARPA, M.S; CORREA, M. A; CERA, L. F. R; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. Brasil, vol 27 (n°01), p.131-138, 2004.

PEREIRA, G. R. ESTUDO DA MONOLEÍNA COMO PROMOTOR DE ABSORÇÃO CUTÂNEA PARA A PROGESTERONA: PROPOSIÇÃO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA. Dissertação de mestrado da faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.São Paulo, 1999.

PRISTA, L. N; BAHIA, M. F. G; VILAR, E. Dermofarmácia e Cosmética.vol I, ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS FARMÁCIAS, p. 18-19, 1992.

RANADE, V. V. Drud delivery Systems.6.Transdermal drug delivery. **J. Clin Pharmacol.**v.31. p.401 – 418, 1991.

RODRÍGUEZ, L. A. G. Variability in risk gastrointestinal complications with differents nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American Journal of Medicine**.USA, v.104(3A), p.30S – 34S,1998.

SANTANA, D. P. Evaluation biopharmacéutique de differentes formulation galénique de l' isotretinoine em gel – Université Joseph Fourier – Guenoble I – UFR de Pharmacie – 1992.

SCHIPUNOV, Y.A. Lecithin Organogel a micellar system with unique properties**. Coloids and surfaces**, v.181-185, p.541-554, 2001.

SCHMOLKA, I. R. Artificial skin.I. Preparation and properties of pluronic F127 gels for treatment of burns. **Journal Biomed. Mater. Res**. v.6. p.571-582, 1972.

SCHRAMM, G. A Pratical Approach to Rheology and Rheometry Gebhard C, 2 edição Germany.1998. p 22.

SESTER, E. A. AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DO LAPACHOL TÓPICO: ENSAIOS IN VITRO E IN VIVO. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFPE – RECIFE, 1996.

TENJARLA, S. Microemulsions: An Overview and Pharmaceutical Application. Theraupeutic Drug Carrier Systems.Wisconsin, vol 16(5), p.461-521, 1999.

THE MERCK INDEX; 12. ed. London: Whitehouse Station, p. 905, 1996

WERTZ, P. W. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. **Advanced drug delivery reviews.**vol 18, p.283-294, 1996.

WILLIAMS, A. C.; DARRY, D. W. Skin Absorption Enhancers. **Crit. Rrev. Therap. Drug Carrier Syst,** v.9,n3/4, p. 305-353, 1992.

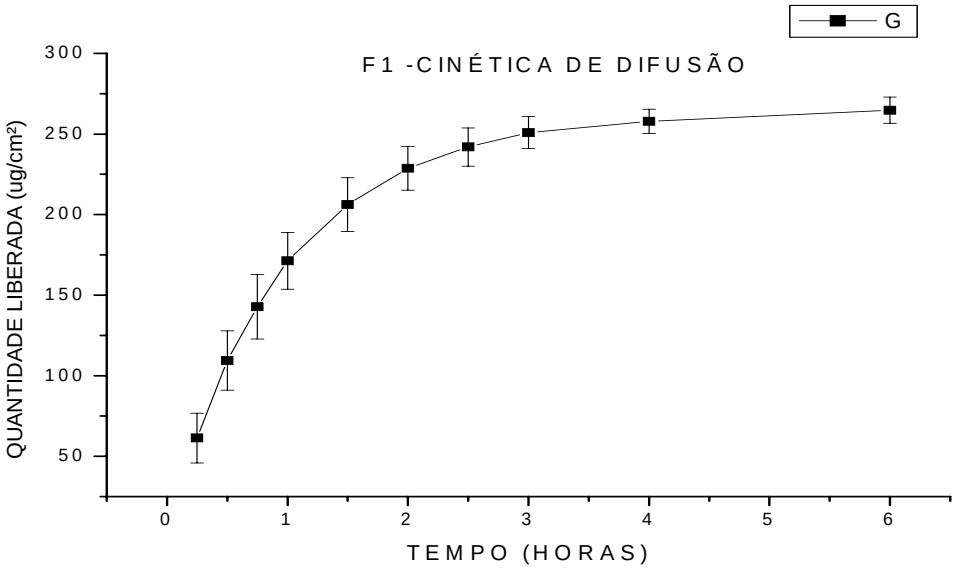
WILLIMANN, H.; WALDE,P.; LUISI, P.L.; GAZZANIGA, A.; STROPPOLO, F. Lecithin Organogel as Matrix for Transdermal transport of drugs. **Journal of Pharmacetical Sciences.** V.81. n° 9. p. 871 – 874, 1992.

WINGATE, G. Transdermal Methimazole in the treatment of cats with hyperhtyroidism. **International Journal of Pharmaceutical Compounding,** USA, v.06, p. 345-346, 2002.

8.0 Anexos

ANEXO I

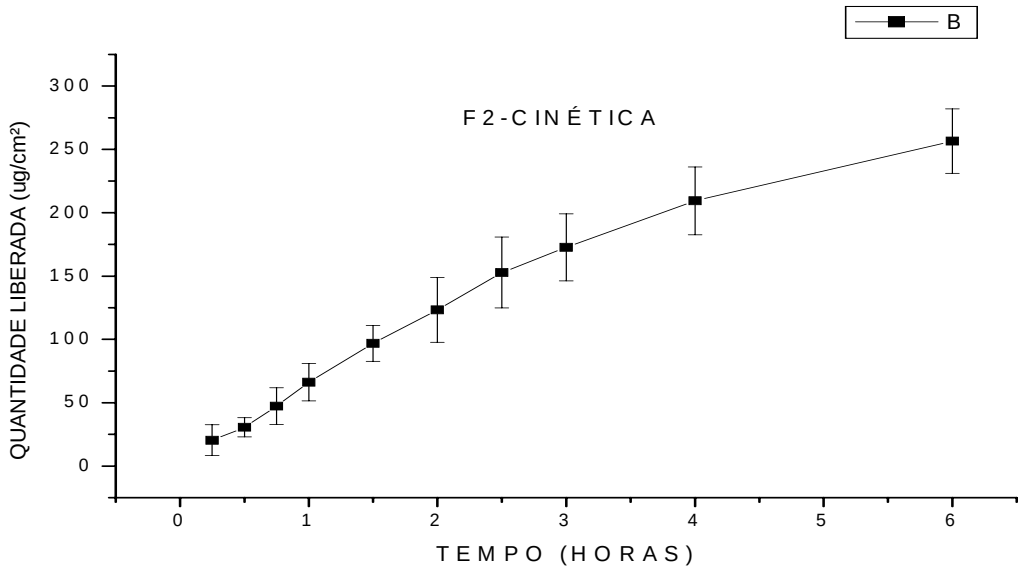
Cinéticas de difusão *in vitro* das formulações de emulgel de cetoprofeno



F1

TEMPO	C1	C2	C3	MÉDIA	DP
0,25	76,636	45,801	61,782	61,40633	15,42093
0,5	129,58	93,622	105,188	109,4633	18,35629
0,75	165,951	131,031	131,667	142,883	19,98001
1	191,146	165,426	157,46	171,344	17,6055
1,5	224,441	202,873	191,513	206,2757	16,72564
2	243,888	224,868	217,468	228,7413	13,62924
2,5	255,171	238,59	232,103	241,9547	11,89638
3	262,201	247,105	243,365	250,8903	9,97223
4	265,511	257,646	250,474	257,877	7,52116
6	267,122	271,617	255,753	264,8307	8,17645

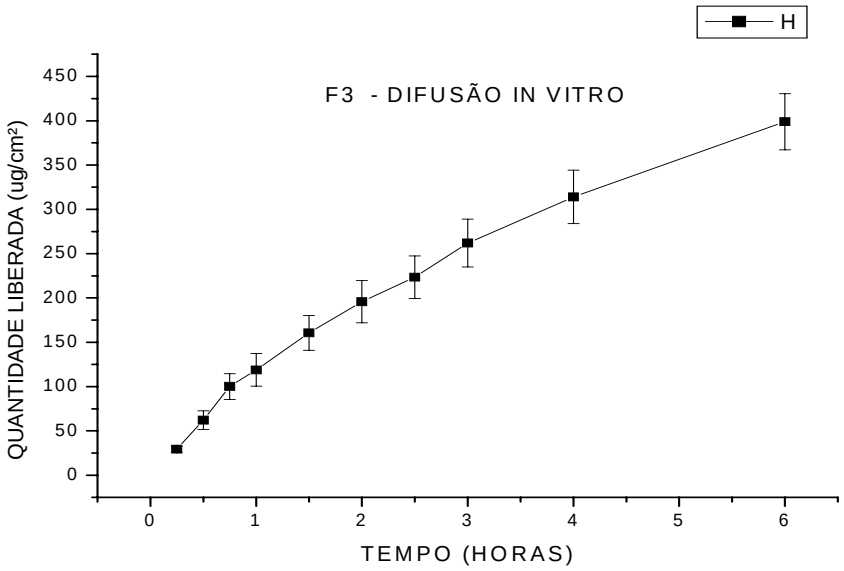
Cinéticas de difusão *in vitro* das formulações de emulgel de cetoprofeno



F2

TEMPO	C1	C2	C3	MÉDIA	DP
0,25	31,433	22,413	7,391	20,41233	12,14522
0,5	39,268	25,251	27,173	30,564	7,5989
0,75	60,783	49,14	31,965	47,296	14,49722
1	79,384	68,834	50,434	66,21733	14,65131
1,5	109,869	98,704	81,869	96,814	14,09536
2	143,095	132,373	94,452	123,3067	25,55747
2,5	172,756	164,878	120,747	152,7937	28,03136
3	190,652	185,2	142,295	172,7157	26,48573
4	223,165	226,426	178,521	209,3707	26,7663
6	274,173	268,217	227,434	256,608	25,44033

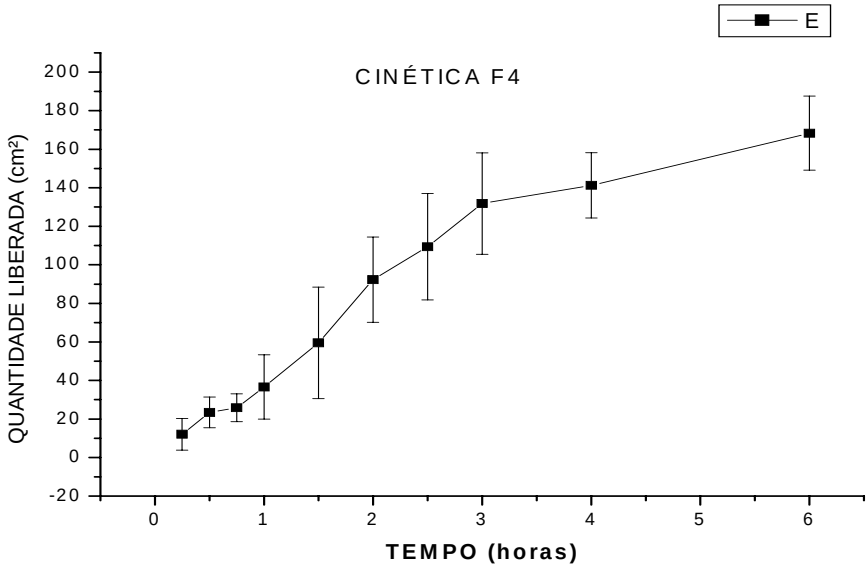
Cinéticas de difusão *in vitro* das formulações de emulgel de cetoprofeno



F3

TEMPO	C1	C2	C3	MÉDIA	DP
0,25	32,566	30,098	25,891	29,51833	3,37504
0,5	74,361	57,112	55,056	62,17633	10,60219
0,75	116,652	94,46	89,26	100,124	14,54789
1	139,782	111,147	105,521	118,8167	18,37313
1,5	183,33	148,939	149,417	160,562	19,71911
2	222,956	179,2	185,06	195,7387	23,75231
2,5	251,339	209,965	209,278	223,5273	24,08806
3	293,156	247,565	245,139	261,9533	27,04951
4	348,313	302,234	291,591	314,046	30,14944
6	433,652	390,739	372,043	398,8113	31,5878

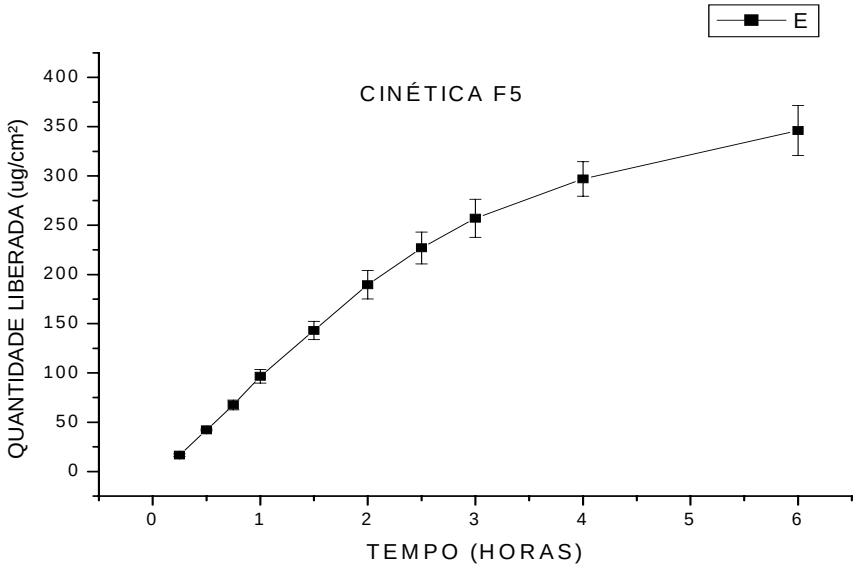
Cinéticas de difusão *in vitro* das formulações de emulgel de cetoprofeno



F4

TEMPO	C1	C2	C3	MÉDIA	DP
0,25	16,78957	16,88435	2,54	12,0713	8,25449
0,5	32,59739	18,14609	19,59	23,44449	7,95945
0,75	33,9687	23,52696	20,12	25,87188	7,216
1	55,76348	28,39217	25,66	36,60522	16,64768
1,5	86,7913	29,22	62,56	59,52377	28,9055
2	116,1235	72,27652	88,51	92,30334	22,16824
2,5	140,8191	98,56174	88,77	109,3836	27,66067
3	160,0052	127,4348	107,9	131,78	26,32298
4	160,2557	127,6496	135,83	141,2451	16,96412
6	189,9565	153,0826	161,88	168,3064	19,25864

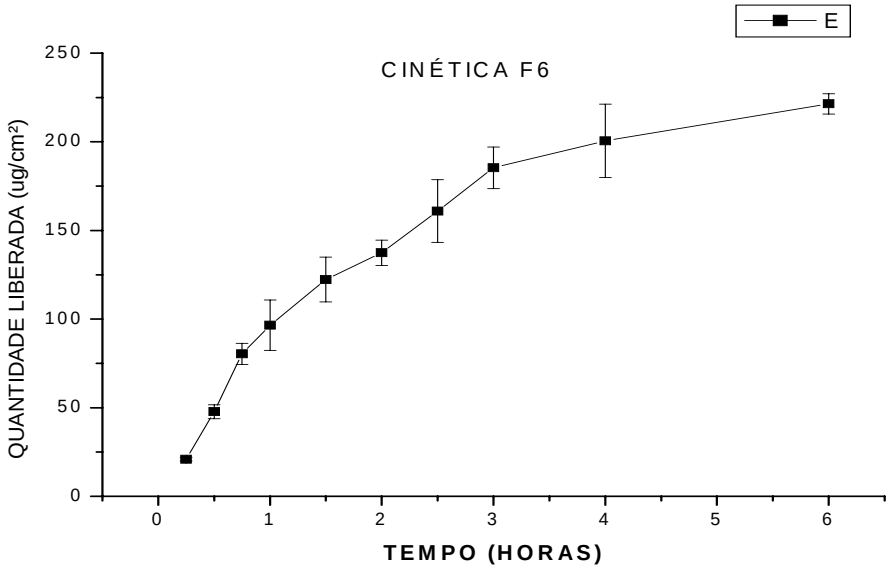
Cinéticas de difusão *in vitro* das formulações de emulgel de cetoprofeno



F5

TEMPO	C1	C2	C3	MÉDIA	DP
0,25	17,54522	17,21	15,06087	16,60536	1,34803
0,5	41,75391	43,07	41,43652	42,08681	0,86613
0,75	66,12435	63,43	72,99217	67,51551	4,93055
1	94,37652	90,83	104,2983	96,50159	6,98108
1,5	138,7817	136,67	153,7696	143,0738	9,32282
2	180,6722	181,73	206,1922	189,5315	14,4383
2,5	218,3183	216,87	245,527	226,9051	16,14327
3	246,5939	245,07	279,3713	257,0118	19,37894
4	284,8635	289,01	316,9974	296,957	17,47892
6	321,5922	344,41	372,3765	346,1262	25,43564

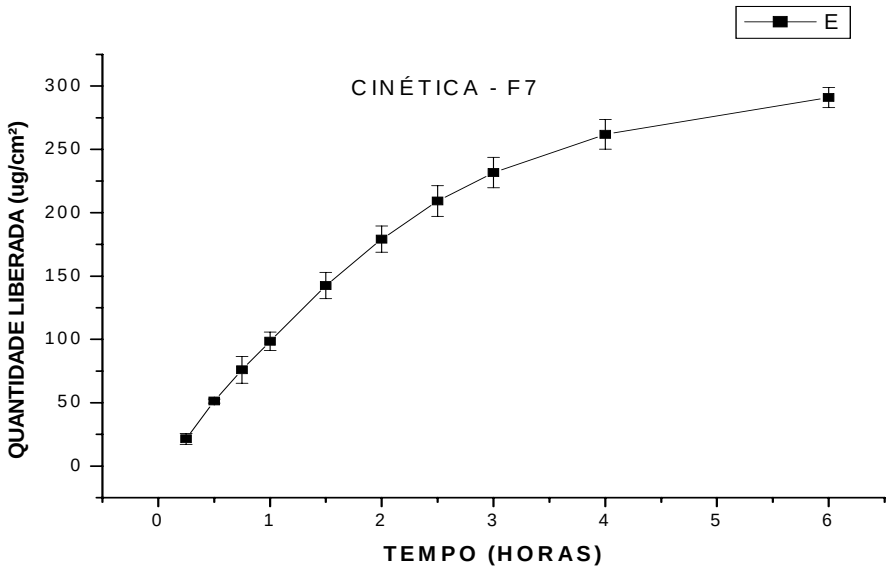
Cinéticas de difusão *in vitro* das formulações de emulgel de cetoprofeno



F6

TEMPO	C1	C2	C3	MÉDIA	DP
0,25	19,90696	21,90174	21,11565	20,97478	1,00482
0,5	47,2513	51,86783	44,06087	47,72667	3,92513
0,75	75,16522	86,91913	79,02087	80,36841	5,9917
1	98,5287	109,5852	81,42174	96,51189	14,18964
1,5	134,7304	122,6035	109,4522	122,262	12,64259
2	144,242	129,8896	138,0817	137,4044	7,20015
2,5	171,9052	170,3739	140,4983	160,9258	17,70733
3	192,9704	191,18	171,7991	185,3165	11,74058
4	221,9748	198,96	180,7461	200,5603	20,66088
6	225,1948	224,2017	214,8722	221,4229	5,69478

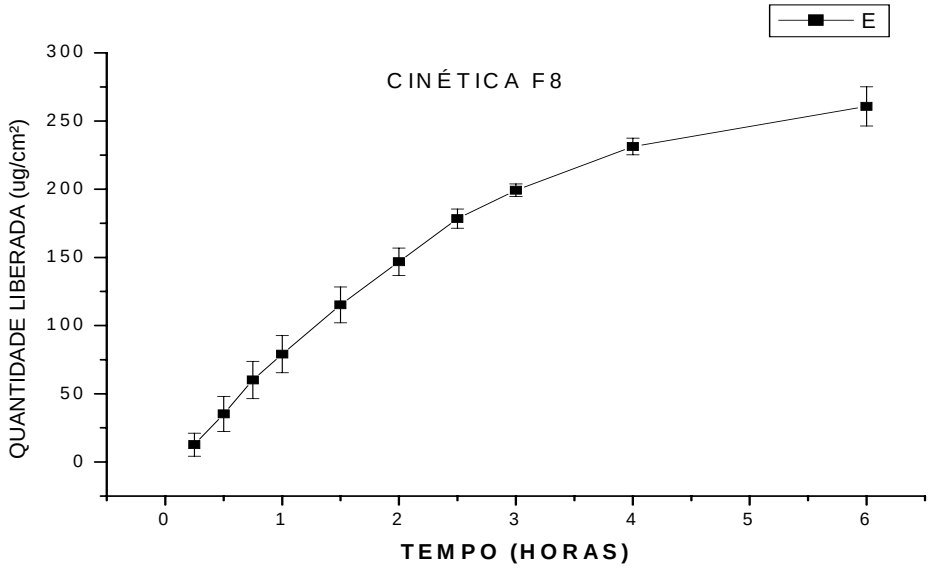
Cinéticas de difusão *in vitro* das formulações de emulgel de cetoprofeno



F7

TEMPO	C1	C2	C3	MÉDIA	DP
0,25	26,09	20,809	17,565	21,488	4,30287
0,5	52,826	49,704	51,253	51,261	1,56102
0,75	71,784	87,784	68,008	75,85867	10,4988
1	106,66	95,98	92,891	98,51033	7,22484
1,5	154,465	138,286	134,998	142,583	10,42061
2	190,973	174,286	172,048	179,1023	10,34102
2,5	223,332	202,132	202,223	209,229	12,21364
3	245,546	223,124	226,453	231,7077	12,09939
4	273,851	250,38	261,38	261,8703	11,74318
6	299,836	284,813	288,213	290,954	7,87765

Cinéticas de difusão *in vitro* das formulações de emulgel de cetoprofeno



F8

TEMPO	C1	C2	C3	MÉDIA	DP
0,25	22,39739	6,52009	9,26087	12,72612	8,48694
0,5	46,70348	37,76609	21,35478	35,27478	12,85667
0,75	67,25043	68,66435	44,39652	60,10377	13,62123
1	88,98696	84,55217	63,50522	79,01479	13,61348
1,5	129,4339	112,6339	103,5296	115,1991	13,14131
2	158,2922	141,1617	140,967	146,807	9,94697
2,5	186,6165	174,727	174,1035	178,4823	7,05132
3	204,5696	195,8496	197,4861	199,3017	4,63487
4	234,9417	234,6583	224,1991	231,2664	6,12206
6	261,3513	274,753	246,0157	260,7067	14,37954

ANEXO II – ANÁLISE ESTATISTICA – (PLACEBO F3X PADRÃO - PROFENID) E (PLACEBO F3 X TRATADO – F3)

Tempo zero

F3 X padrão

22/12/06 14:42

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,68	0,027	5
B	0,47	0,06325	5

t = -1,56308
p = 0,15666

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

F3 X T1

22/12/06 14:44

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,68	0,027	5
B	0,8	0,015	5

t = 1,30931
p = 0,22678

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

tempo uma hora

F3 X padrão

22/12/06 14:47

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,86	0,248	5
B	0,63	0,02825	5

t = -0,9785
p = 0,35649

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

F3 X T1

22/12/06 14:48

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,86	0,248	5
B	1,02	0,047	5

t = 0,65871
p = 0,52858

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

Tempo duas horas

F3 X PADRÃO

22/12/06 14:56

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,98	0,317	5
B	0,93	0,01825	5

t = -0,19309
p = 0,8517

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

F3 X T1

22/12/06 14:57

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,98	0,317	5
B	1,26	0,028	5

t = 1,06594
p = 0,31756

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

TERCEIRA HORA

T3 X PADRÃO
2/12/06 15:07

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,98	0,317	5
B	0,93	0,01825	5

t = -0,19309
p = 0,8517

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

F3 X T1

22/12/06 15:10

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,98	0,317	5
B	1,26	0,028	5

t = 1,06594
p = 0,31756

At the 0,05 level,

the two means are NOT significantly different.

QUARTA HORA

T3 X PADRÃO

22/12/06 14:58

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,84	0,243	5
B	0,85	0,01375	5

t = 0,04413
p = 0,96588

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

T3 X T1

22/12/06 14:59

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,84	0,243	5
B	1,24	0,063	5

t = 1,6169
p = 0,14456

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

QUINTA HORA

T3 X PADRÃO

22/12/06 15:01

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N

A	0,82	0,217	5
B	0,79	0,01675	5

t = -0,13875
p = 0,89308

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

T3 X T1

22/12/06 15:03

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,82	0,217	5
B	0,96	0,023	5

t = 0,63901
p = 0,54068

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

SEXTA HORA

T3 X PADRAO

22/12/06 15:04

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,64	0,133	5
B	0,69	0,04425	5

t = 0,26556
p = 0,79729

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

T3 X T1

22/12/06 15:05

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,64	0,133	5
B	0,66	0,023	5

t = 0,11323
p = 0,91264

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

ANEXO III – ANÁLISE ESTATISTICA – (PLACEBO F8 X PADRÃO - PROFENID) E (PLACEBO F8 X TRATADO – F8)

TEMPO ZERO

F8 X PADRAO
22/12/06 15:15

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,7	0,095	5
B	0,47	0,06325	5

t = -1,29283
p = 0,23216

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

F8 X T2

22/12/06 15:17

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	0,7	0,095	5
B	0,54	0,013	5

t = -1,08866
p = 0,30801

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

TEMPO UMA HORA

F8 X PADRÃO

22/12/06 15:19

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	1,22	0,152	5
B	0,63	0,02825	5

t = -3,10742
p = 0,0145

At the 0,05 level,
the two means are significantly different.

F8 X T2

22/12/06 15:21

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	1,22	0,152	5
B	1,09	0,0205	5

t = -0,6999
p = 0,50383

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

SEGUNDA HORA

F8 X PADRÃO

22/12/06 15:22

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	1,34	0,053	5
B	0,99	0,01925	5

t = -2,91162
p = 0,01954

At the 0,05 level,
the two means are significantly different.

F8 X T2

22/12/06 15:23

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N

A	1,34	0,053	5
B	1,03	0,0095	5

t = -2,77272
p = 0,02419

At the 0,05 level,
the two means are significantly different.

TERCEIRA HORA

F8 X PADRÃO

22/12/06 15:24

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	1,2	0,085	5
B	0,93	0,01825	5

t = -1,8789
p = 0,09707

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

F8 X T2

22/12/06 15:24

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	1,2	0,085	5
B	1,02	0,012	5

t = -1,29232
p = 0,23232

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

QUARTA HORA

F8 X PADRÃO

22/12/06 15:25

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	1,22	0,152	5
B	0,85	0,01375	5

t = -2,03217
p = 0,0766

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

F8 X T3

22/12/06 15:25

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	1,22	0,152	5
B	0,94	0,008	5

t = -1,56525
p = 0,15616

At the 0,05 level,
the two means are NOT significantly different.

QUINTA HORA

F8 X PADRÃO

22/12/06 15:26

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	1,15	0,0975	5
B	0,79	0,01675	5

t = -2,38155
p = 0,04444

At the 0,05 level,
the two means are significantly different.

F8 X T2

22/12/06 15:27

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	1,15	0,0975	5
B	0,74	0,033	5

t = -2,53784
p = 0,03483

At the 0,05 level,
the two means are significantly different.

SEXTA HORA

F8 X PADRÃO

22/12/06 15:30

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	1,06	0,068	5
B	0,69	0,04425	5

t = -2,46941
p = 0,03875

At the 0,05 level,
the two means are significantly different.

F8 X T2

22/12/06 15:31

Independent t-Test on Data1 col(A) and col(B):

Data	Mean	Variance	N
A	1,06	0,068	5
B	0,56	0,063	5

t = -3,08901
p = 0,01491

At the 0,05 level,
the two means are significantly different.

ANEXO IV– Atividade antiinflamatória.

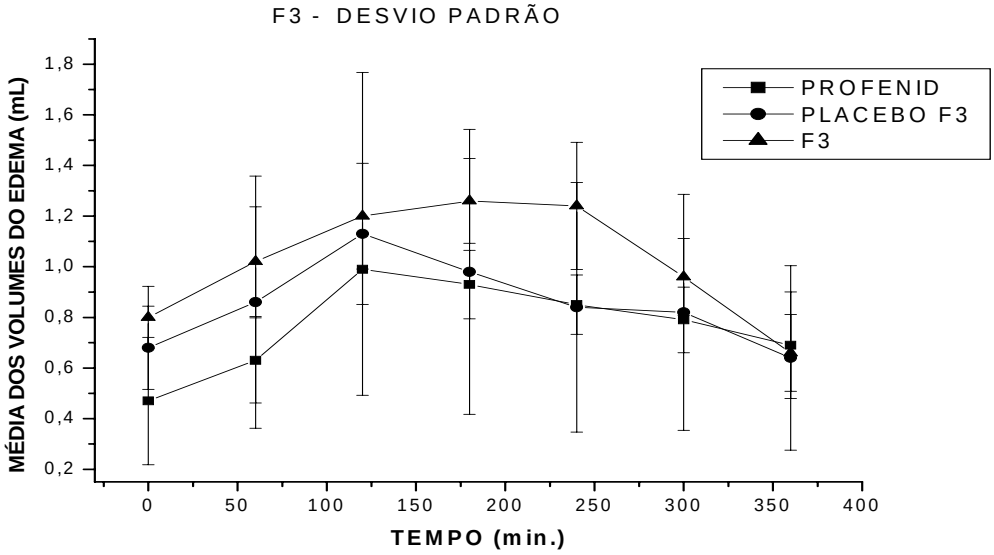


FIGURA 1 - Efeito das formulações F3, Profenid® (25 mg/cm²) por via tópica sobre o modelo edema de patas induzido por carragenina em ratos Wistar adultos. *P <0,05 comparado com o controle que recebeu apenas o placebo F3 (formulação sem fármaco). Teste "t" de student.

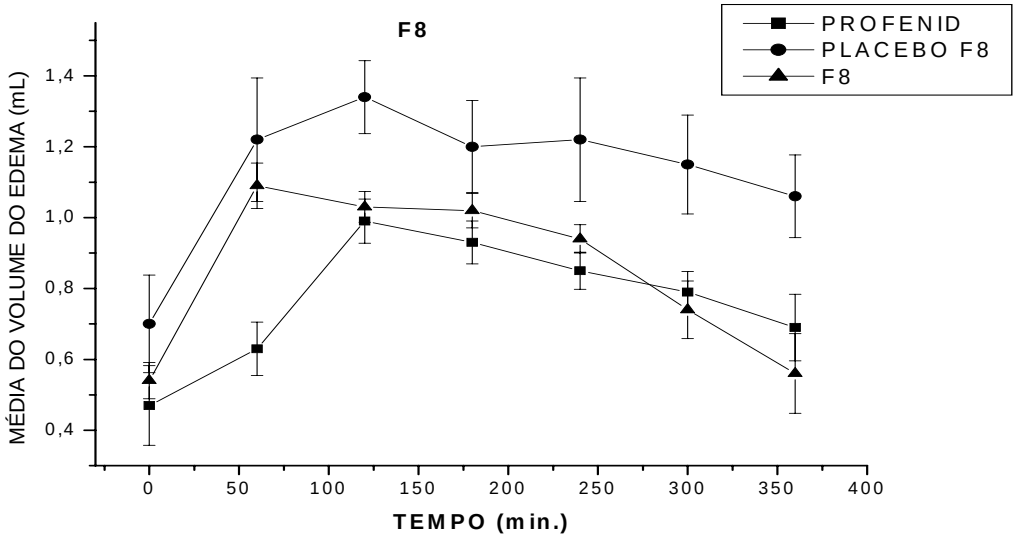


Figura 2 - Efeito das formulações F8, PROFENID® (25mg/cm²) por via tópica sobre o modelo edema de patas induzido por carragenina em ratos Wistar adultos. *P <0,05 comparado com o controle que recebeu apenas o placebo F8 (formulação sem fármaco). Teste "t" de student.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Escopo e política
- Forma e preparação de manuscritos
- Envio dos manuscritos

A **REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**/***Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*** tem por finalidade publicar os seguintes tipos de publicação: **Artigos originais** relacionados com as áreas de conhecimento das Ciências Farmacêuticas, **Trabalhos de atualização ou de revisão**, que serão incluídos quando solicitados a especialistas pela Comissão de Publicações ou quando submetidos em forma de Abstract para avaliação quanto ao interesse. Ressalta-se a necessidade de se incluir visão crítica dos autores, inserindo os seus trabalhos no tema e avaliando em relação ao estado de arte no País. **Notas Prévias** relativas a novas metodologias e resultados parciais, cuja originalidade justifique a publicação rápida. Nesse caso, o limite é de 2.000 palavras, excluindo-se tabelas, figuras e referências. Pode-se incluir, no máximo, uma figura, tabela e 10 referências. **Resenhas** elaboradas por especialistas segundo sugestão da Comissão de Publicações. Suplementos temáticos e aqueles relativos a eventos cientiíficos podem ser publicados mediante aprovação prévia da Comissão de Publicações. Os trabalhos elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros podem ser apresentados em língua portuguesa, inglesa ou espanhola. Devem ser originais e inéditos e destinar-se exclusivamente à **REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**/ ***Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences***.

Escopo e política

Os manuscritos submetidos à Revista, que atenderem as "Instruções aos autores", são encaminhados ao Editor Científico, que indicará dois revisores especialistas no tema abordado (veja Relação dos Consultores - 2003 e gráfico 10). Após a revisão, cujo caráter anônimo é mantido durante todo o processo, os manuscritos são enviados à Comissão de Publicação, que decidirá sobre a publicação. Manuscritos recusados, passíveis de reformulação, poderão ser re-submetidos após reestruturação, como novo trabalho, iniciando outro processo de avaliação. Manuscritos condicionados à reestruturação serão reavaliados pelos revisores. Manuscritos enviados aos autores para revisão devem retornar à Editoria dentro de, no máximo, dois meses, caso contrário terão o processo encerrado.

Forma e preparação de manuscritos

Instruções para apresentação dos trabalhos

1. Estrutura dos originais

1.1.Cabeçalho: constituído por:

- Título do trabalho: deve ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho.

- Autor(es) por extenso, indicando a(s) instituição(ões) a(s) qual(is) pertence(m) mediante números. O autor para correspondência deve ser identificado com asterisco, fornecendo o endereço completo, incluindo o eletrônico. Estas informações devem constar em notas de rodapé.

1.2 Resumo (em português): deve apresentar a condensação do conteúdo, expondo metodologia, resultados e conclusões, não excedendo 200 palavras. Os membros da Comissão poderão auxiliar autores que não são fluentes em português.

1.3 Unitermos: devem representar o conteúdo do artigo, evitando-se os de natureza genérica e observando o limite máximo de 6(seis) unitermos.

1.4 Introdução: deve estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos no mesmo campo. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

1.5 Material e Métodos: a descrição dos métodos usados deve ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho. Processos e Técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, devem ser apenas referidos por citação. Estudos em humanos devem fazer referência à aprovação do Comitê de Ética correspondente.

1.6 Resultados e Discussão: deverão ser acompanhados de tabelas e material ilustrativo adequado, devendo se restringir ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados. É facultativa a apresentação desses itens em separado.

1.7 Conclusões: Quando pertinentes, devem ser

fundamentadas no texto.

1.8 Resumo em inglês (ABSTRACT): deve acompanhar o conteúdo do resumo em português.

1.9 Unitermos em inglês: devem acompanhar os unitermos em português.

1.10 Agradecimentos: devem constar de parágrafos, à parte, antecedendo as referências bibliográficas.

1.11 Referências bibliográficas: devem ser organizadas de acordo com as normas da ABNT NBR-6023, ordenadas alfabeticamente no fim do artigo incluindo os nomes de todos os autores.

A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores.

2. Apresentação dos originais

Os trabalhos devem ser apresentados em lauda padrão (de 30 a 36 linhas com espaço duplo) em três vias e disquete 31/2" alta densidade. Utilizar Programa Word for Windows. Os autores devem encaminhar o trabalho acompanhado de ofício.

No caso de apresentação de cópia impressa, a versão definitiva do trabalho aceito deverá ser enviada em qualquer suporte eletrônico, que poderá ser encaminhado em três vias impressas ou via eletrônica (http//:www.rbcf.br).

3. Infomações adicionais

3.1 Citação bibliográfica: As citações bibliográficas devem ser apresentadas no texto pelo(s) nome(s) do(s) autor(es), em letras maiuscúlas e seguida do ano de publicação. No caso de haver mais de três autores, citar o primeiro e acrescentar a expressão et al.

3.2 Ilustrações: As ilustrações (gráficos, tabelas, fórmulas químicas, equações, mapas, figuras, fotografias, etc) devem ser incluídas no texto, o mais próximo possível das respectivas citações. Mapas, figuras e fotografias devem ser, também, apresentados em arquivos separados e reproduzidas em alta resolução(800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif. e/ou bmp. No caso de não ser possível a entrega do arquivo eletrônico das figuras, os originais devem ser enviados em papel vegetal ou impressora a

laser.

Ilustrações coloridas somente serão publicadas mediante pagamento pelos autores.

As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos romanos e as figuras em algarismos arábicos, seguidos do título. As palavras TABELA e FIGURA devem aparecer em maiúsculas tanto na apresentação.

3.3 Nomenclatura: pesos, medidas, nomes de plantas, animais e substâncias químicas devem estar de acordo com as regras internacionais de nomenclatura. A grafia dos nomes de fármacos deve seguir, no caso de artigos nacionais, as Denominações Comuns Brasileiras (DCB) em vigor, podendo ser mencionados uma vez (entre parênteses, com inicial maiúscula) os registrados.

Envio de manuscritos

Os trabalhos devem ser remetidos para o seguinte endereço:
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas / *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*
Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 950
Caixa Postal 66083
05315-970 - São Paulo - SP - Brasil
Contato telefônico: Fone: (011) 3091.3804 FAX: (011) 3097.8627
E-mail: rbcf@usp.br

[Home] [Sobre a revista] [Corpo editorial] [Assinaturas]

© 2007 Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

Av. Prof. Lineu Prestes, n.950 - Cidade Universitária - Caixa Postal 66083
05315-970 São Paulo SP Brasil
Tel.: +55 11 3091.3804
Fax: +55 11 3097.8627

e-Mail
rbcf@usp.br

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo