



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Dissertação de Mestrado

**Estudo de Permeação *In Vitro* e Avaliação
Térmica de Emulgel Tópico a Base de
Lapachol**

ANA AMÉLIA MOREIRA LIRA

Recife – PE
2003

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

**Estudo de Permeação *In Vitro* e Avaliação Térmica de Emulgel
Tópico a Base de Lapachol**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Controle e Produção de Medicamentos

Profº Dr. Davi Pereira de Santana
Orientador

Ana Amélia Moreira Lira
Mestranda

Recife – Pe
2003

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

**Estudo de Permeação *In Vitro* e Avaliação Térmica de Emulgel
Tópico a Base de Lapachol**

BANCA EXAMINADORA:

Membro Externo Titular

Prof. Dr. Fernanda Nervo Raffin

Membros Internos Titulares

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Membros Suplentes

Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo

Profa. Dra. Almir Gonçalves Wanderley

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR

Geraldo José Marques Pereira

VICE-REITOR

Yonyr de Sá Barreto Sampaio

PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Paulo Roberto Freire Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Silvana Cabral Maggi

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Davi Pereira de Santana

VICE-COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dalci José Brondani

Este trabalho é dedicado aos meus pais, os quais me acompanharam, me confortando e amparando nos momentos difíceis e que tudo fizeram para a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido uma vida maravilhosa, luz e proteção na minha jornada, força, coragem e vontade de crescer profissionalmente, pessoalmente e espiritualmente.

A minha família que sempre me incentivou e apoiou minhas decisões, estando do meu lado em todos os instantes me fortalecendo, amparando e orientando em qualquer circunstância da minha vida.

Ao Prof. Dr. Davi Pereira de Santana pela orientação e amizade, estando sempre ao meu lado, ensinando não apenas conhecimentos científicos, mas a lutar e conquistar meus ideais.

A Prof. Miracy Muniz de Albuquerque, pelo apoio, colaboração e uso das dependências de seu laboratório, e a todos os integrantes do NCQMC, Ruth, Rosário, Ana Cristina, Márcia, Dani, Júnior-Ceará e Breno.

Ao Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto pelo apoio, incentivo e colaboração para realização deste trabalho, e a todos do LAFEPE, em especial a Flávia.

Ao Prof. Dr. Rui Macedo e a todos da UDEN pelo apoio, orientação e uso das dependências de seus laboratórios, em especial a Irinaldo.

Ao Prof. Dr. Haroldo Xavier, Prof. Almir Wanderley e demais Professores do Departamento de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio, colaboração e uso das dependências de seus laboratórios.

A todos do NUDFAC pela amizade, compreensão e apoio, em especial a Tereza Raquel e Líbia, minhas amigas, por toda a ajuda, apoio e os vários momentos de alegria, os quais continuarão em minha memória como lembranças de uma amizade leal e sincera.

A todos da Bioequivalência, principalmente Renato e Felipe, sempre tão prestativos e atenciosos, e Leila, que com toda paciência me orientou e auxiliou.

A todos da Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade.

A toda equipe do LTM, Deborah, Zênia, Danilo, Luciana, Márcílio e Lamartine e aos demais que formam o grupo de pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica, Gláucia e Bruno, que se empenharam bastante para a realização deste trabalho, sempre trazendo alegria, tranquilidade e amizade a todos.

A minha amiga Rogéria por todos os ensinamentos, amizade e incentivo, e que mesmo distante me apoiou e serviu de exemplo nos momentos de dúvida.

A minha amiga Iguaci, secretária do mestrado, pela compreensão, dedicação e apoio nos momentos de dificuldades e de alegria, e pela amizade sincera a qual retribuo com todo carinho.

A todos os colegas do mestrado, principalmente a Chico, Risonildo, Cristiano, Cristiane, Lúcia, Thiago, Duda, Simone, Raquel, Roseane, Rosiel e Valderes.

As minhas amigas Sabrina, Juliana, Andreza, Jussara, Marcinha, Suzi, Simone, Ceça, Karina e Lela, as quais eu sei que estão presentes em todos os instantes da minha vida, pelos vários anos de amizade, consideração e carinho.

A todos os meus amigos e familiares que mesmo não convivendo comigo na faculdade, me apoiaram e trouxeram alegria a minha vida.

A todos da BONAMIL, onde eu conheci pessoas que além do conhecimento técnico, me mostraram que ainda é possível uma vida mais humana e justa, e que a paciência, a confiança e a perseverança são qualidades imprescindíveis em um vencedor.

Em fim, a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz!

Onde houver ódio que eu leve o amor,

Onde houver ofensa que eu leve o perdão,

Onde houver discórdia que eu leve a união,

Onde houver dúvidas que eu leve a fé,

Onde houver erro que eu leve a verdade,

Onde houver desespero que eu leve a esperança,

Onde houver tristeza que eu leve a alegria

Onde houver trevas que eu leve a luz...

Francisco de Assis

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 – LAPACHOL	
2.1.1 – Aspectos Gerais	3
2.1.2 – Farmacologia do Lapachol	4
2.1.3 – Toxicidade do Lapachol	6
2.2 – VIA CUTÂNEA	
2.2.1 – Aspectos Gerais	8
2.2.2 – Camadas que Compõem a Pele e Órgãos Anexos	9
2.2.3 – Vias de Penetração Cutânea	10
2.2.4 – Aplicação Teórica da Difusão Percutânea	12
2.2.5 – Cinética de Difusão	13
2.3 – FORMAS FARMACÊUTICAS TÓPICAS	
2.3.1 – Formas Farmacêuticas do Tipo Gel	17
2.3.2 – Formas Farmacêuticas do Tipo Emulgel	18
2.3.3 – Permeação do Lapachol a partir de Formas	19

Tópicas

2.4 – ANÁLISE TÉRMICA: CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E SUA UTILIZAÇÃO EM ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO	22
3.0 – OBJETIVOS	
3.1 – GERAL	26
3.2 – ESPECÍFICOS	26
4.0 – ENSAIO EXPERIMENTAL	
4.1. – PARTE I - Desenvolvimento Farmacotécnico de emulgel tópico a base de lapachol	27
4.2 – PARTE II – ARTIGO I: Estudo de compatibilidade entre o lapachol e excipientes farmacêuticos para o desenvolvimento de formulações tópicas usando calorimetria exploratória diferencial	30
4.3 – PARTE III – ARTIGO II: Otimização de formulações tópicas de lapachol utilizando ensaios de difusão in vitro através de células de Franz	39
5.0 – CONCLUSÕES	51
6.0 – PERSPECTIVAS	53
7.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

BREVIATURAS E SIGLAS

±	Mais ou menos
A	Área do pico
AINES	Drogas antiinflamatórias não esteroidais
°C	Grau Celsius
ΔC	Gradiente de concentração
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cm ²	Centímetro quadrado
COX	Ciclooxigenase
CV	Coefficiente de Variação
D	Coefficiente de difusão da molécula em seu veículo
DA/Dt	Velocidade de fusão
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
E	Espessura da membrana
EC	Etrato córneo
G	Fator de calibração, depende da geometria do material
G/Kg	Gramas por kilogramas
H	Espessura da membrana
ΔH	Variação da entalpia
I.V.	Infravermelho
J	Fluxo
K	Constante relativa à condutividade térmica do mesmo
Kp	Diferença de concentração através da membrana
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LTM	Laboratório de Tecnologia de Medicamentos
Log P	Coefficiente de partição
Mg	Miligramas
mg/dia	Miligrama por dia
mg/mL	Migramas por mililitro
NCQMC	Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos
NUDFAC	Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético
P	Constante de permeabilidade
PH	Potencial hidrogeniônico
S	Superfície de aplicação
T	Temperatura
T _{Lat}	Tempo de latência
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

Lista de Figuras

FIGURA 1.	Estrutura Química do Lapachol	03
FIGURA 2.	Representação esquemática das diversas vias de penetração na pele	11
FIGURA 3	Representação esquemática de uma célula de difusão estática e fotografia de uma célula de Franz	14

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Parâmetros de solubilidade Hildebrand-Scott do lapachol	4
Tabela 2.	Densidade e tamanho dos folículos pilosos em cinco tipos de pele	15
Tabela 3.	Formulações em gel testadas <i>in vitro</i> quanto a cedência	20
Tabela 4.	Formulação base para o desenvolvimento do gel-creme de lapachol	27
Tabela 5.	Modificação dos excipientes para obtenção de uma formulação estável	28

Resumo

O lapachol é uma naftoquinona extraída de várias espécies de árvores da família Bignoniaceae, nos representantes dos gêneros *Tecoma* e *Tabebuia*, que apresenta como ações farmacológicas, dentre outras: a atividade antimalárica, antitumoral, antimicrobiana, antiviral, analgésica e antiinflamatória. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação dermofarmacêutica do tipo emulgel, utilizando o lapachol como princípio ativo devido a sua ação antiinflamatória e analgésica e comparar esta formulação com um gel anteriormente desenvolvido no mesmo laboratório. Primeiramente foi feita uma caracterização físico-química da droga através de análise calorimétrica para avaliação da pureza. A partir dos resultados obtidos partiu-se para a formulação de um emulgel a base de lapachol, no qual foram utilizadas diferentes concentrações diferentes de lapachol e de sistema solvente (20% e 40% de glicerina: etanol – 70:30) assim como modificações na fase emulsificante.

A caracterização térmica dos excipientes e formulações, como um dos primeiros parâmetros no estudo de estabilidade, foi realizada. A compatibilidade droga-excipientes de lapachol foi feita por análise das misturas binárias, preparadas nas mesmas proporções das formulações, por DSC acoplado a sistema fotovisual. Foram realizados curvas de DSC também das formulações e placebos. Os resultados mostraram que apenas o álcool cetosteárilico apresentou modificação do comportamento térmico do lapachol caracterizando uma incompatibilidade do lapachol com o álcool cetosteárilico.

Desta forma, partiu-se para um estudo de liberação do fármaco a partir das bases estudadas, utilizando células de Franz e membranas sintéticas de mistura de ésteres de celulose, onde, primeiramente, foram avaliadas algumas características físico-químicas do lapachol que tornaram viável o estudo, assim como coeficiente de partição octanol/ tampão pH 7,0 e um estudo de solubilidade do fármaco em soluções de tampão de fosfatos pH 7,0. Assim a droga foi então incorporada nas duas bases anteriormente citadas, em concentrações diferentes (0,4% e 0,3%) e um gel anteriormente desenvolvido em nosso laboratório. Os perfis de liberação foram avaliados e otimizados através de um estudo de permeação, onde foi confirmada a capacidade permeante do fármaco nas preparações estudadas, sendo observado que a base contendo monoestearato de glicerila, apresentou permeação superior à primeira nas concentrações estudadas. Assim, esta base foi comparada ao gel através de

um ensaio de permeação utilizando pele de orelha de porco, onde foi visto que a permeação do fármaco foi bastante superior no gel. Ao final do experimento, foi realizado um estudo de retenção cutânea, onde observou-se que a quantidade de fármaco retida no estrato córneo e restante do tecido (epiderme sem EC e derme), viabiliza sua utilização como produto de ação tópica.

Abstract

Lapachol is a naphthoquinone that can be isolated from the lapacho tree (*Tabebuia avellanedae*), a member of the catalpa family (Bignoniaceae). Researchers have found that this compound has promising antimicrobial, antimalarial, anticancer, antiviral, analgesic and antiinflammatory properties.

The aim of this work was to develop an emulgel dermopharmaceutical formulation, using lapachol as active, mainly due to its antiinflammatory and analgesic effects. First of all, the physico-chemical characterization of the drug through the thermal analysis assays were performed to access the purity level of the compound. After the careful analysis of the obtained data, we selected an emulgel formulation in which different concentrations of lapachol and solvent system (20% and 40% of glycerin: ethanol – 70:30) as well as different emulsifying agent was evaluated.

The thermal analysis was used to evaluate the stability of the excipients and formulations. The drug-excipient compatibility of lapachol was performed using DSC coupled to the photo visual system, by analyzing the binary mixtures prepared at the same formulation proportions. The DSC curves of the formulations e placebos were also performed. The results showed that only the cetostearyl alcohol presented changes in the thermal behavior of lapachol stating the incompatibility between lapachol and cetostearyl alcohol.

After that, the lapachol release assay was performed, using Franz cells and synthetic membranes based in cellulose ester mixtures in which, some physico-chemical characteristics of lapachol were evaluated, such as the partition coefficient n-octanol / buffer pH 7,0 as well as the solubility of the drug in phosphate buffer pH 7,0. Then the drug was incorporated in the two bases studied using different concentrations (0,4% e 0,3%) and in one gel developed previously in our laboratory. The release profiles were performed and optimized through the permeation study, where the permeating capacity of the drug in the studied formulations was confirmed. The base containing glyceryl monostearate presented higher permeation at the studied concentrations, so this base was compared to the gel through the permeation assay using pig ear skin an the gel showed superior permeation.

At the end of the study, the assay of cutaneous retention was performed. In this study we can observe that the amount of drug retained at the corneous extract and at the remained

tissue (epidermis without CE and dermis), made it possible the utilization as a topic use product.

...Ó mestre,
Fazei que eu procure mais:
Consolar que ser consolado,
Compreender que ser compreendido,
Amar que ser amado,
Pois é dando que se recebe
É perdoando que se é perdoado
E é morrendo que se vive para a vida eterna...

Francisco de Assis

Introdução

A inflamação é considerada como uma resposta de defesa do organismo, geralmente localizada, transitória e auto-limitada. Os sinais clássicos de um processo inflamatório agudo são : rubor, tumor, calor, dor e perda da função; já o processo crônico, além da duração por um período indeterminado, não apresenta um padrão tão estereotipado, variando de acordo com os tipos de mediadores celulares e humorais envolvidos. Dessa forma, uma variedade de substâncias, os mediadores da inflamação que podem ser de origem plasmática (sistema de coagulação, sistema das cininas e sistema de complemento) ou de origem celular (aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), eicosanóides, citocinas, radicais livres superóxidos, óxido nítrico e neuropeptídeos), são formados e liberados concomitantemente ou sequencialmente no local da inflamação (SESTER *et al.*, 1997; FLORIO & TASAKA, 2000).

Dentre os antiinflamatórios usados para este fim, os classificados como não-esteróideais tem despertado interesse crescente nos últimos anos, podendo ser administrados por via oral ou por via tópica. Estes terão como função aliviar a dor, reduzir o edema e diminuir o tempo para o retorno das funções normais. O protótipo desta classe de antiinflamatórios não-esteróideais é a aspirina. Esses compostos atuam por inibição da biossíntese das prostaglandinas, inibindo a ação das enzimas ciclo-oxigenase (COX) de origem constitucional (COX-1) e induzida (COX-2), que degradam o ácido araquidônico. Os antiinflamatórios tópicos são muito usados tanto como alternativa, como complemento de outras vias, e encontram-se nas formas: gel, emulsão, emulgel ou spray, sendo o diclofenaco tópico bastante procurado para esta finalidade. A quantidade de diclofenaco absorvida através da pele é proporcional ao tempo de contato e à área da pele coberta e depende da dose tópica total e da hidratação da pele (GOODMAN *et al.*, 1996; www.novartis.com.br).

O lapachol [2-hidróxido-3-(3-metil-2-butenil)-1,4] é uma naftoquinona que possui atividade antiviral, antimicrobiana, antiinflamatória e principalmente anticancerígena. Nos estudos clínicos descritos na literatura, seja utilizando pacientes portadores de cervicites e cérvico-vaginites crônicas (WANICK *et al.*,1970) ou utilizando pacientes portadores de

bursite, otite, tendinite e sinusite (CORREIA *et al.*, 1988), a atividade antiinflamatória da droga é ressaltada.

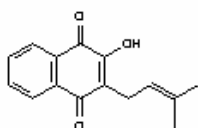
Neste mesmo contexto, um estudo preliminar de desenvolvimento galênico e difusão *in vitro* do lapachol incorporados na forma farmacêutica gel realizado por SANTOS *et al.* (1991) e posteriormente por SESTER *et al.* (1997), demonstrou a viabilidade da incorporação do lapachol em formas tópicas.

A administração tópica é conhecida como uma via alternativa da administração oral de ativos medicamentosos e oferece muitas vantagens como a ausência de efeito de primeira passagem (GUY & HADGRAFT, 1985; GWAK & CHUN, 2002). A habilidade de um fármaco presente em formulações tópicas permear a pele depende da capacidade de libertação da droga deste veículo para a pele, e da difusão por esta barreira para seu sítio de ação. São poucos os compostos de interesse terapêutico que possuem propriedades físico-químicas adequadas para penetrarem rapidamente a epiderme viável e principalmente o extrato córneo constituído por células ricas em queratina envolvidas em múltiplas camadas lipídicas que representam a principal barreira a permeação (YOKOMIZO, 1996; SHOKRI *et al.*, 2001). Neste trabalho, pretende-se desenvolver uma formulação dermofarmacêutica do tipo emulgel, utilizando o lapachol como princípio ativo devido a sua ação antiinflamatória e analgésica e comparar o perfil cinético de liberação com o gel de lapachol já formulado.

LAPACHOL:

◆ Aspectos Gerais

O lapachol é uma 2-hidróxido-3-(3-metil-2-butenil)-1,4 naftoquinona que possui ação antimicrobiana, antimalárica, antiinflamatória, além de possuir atividade antineoplásica e potencial terapêutico na Doença de Chagas (ALMEIDA *et al.*, 1999).



FORMULA: $C_{15}H_{14}O_3$
MOL. WEIGHT: 242,26
CAS: [84 - 79 - 7]

Figura 1: Estrutura Química do Lapachol.

Foi primeiramente evidenciado no cerne do pau d'arco roxo, *Tabebuia* sp., por Gonçalves de Lima e colaboradores (1956), que observaram a existência de um composto de coloração amarela com atividade antimicrobiana, principalmente para o gênero *Brucella*. Sua presença foi constatada posteriormente também em várias outras espécies e diferentes famílias.

A forma de extração da droga mais empregada foi descrita por Paternó: que a partir de 1Kg de serragem do cerne do 'Pau d'Arco' obteve 80g de lapachol puro cristalizado (HOOKER, 1892).

O lapachol tem a forma de cristais prismáticos, ou folhas amarelas, de peso molecular 242,26, sendo sua fórmula química $C_{15}H_{14}O_3$, com ponto de fusão 139,5 – 140,2°C. A absorção máxima no Ultravioleta ocorre em 251,5; 278 e 331nm: Log ϵ 4,38, 4,28 e 3,43 respectivamente (THE MERK INDEX, 1996). É bastante solúvel em acetona, etanol, metanol, clorofórmio, benzeno e ácido acético; solúvel em éter etílico; insolúvel em água a frio, sendo ligeiramente solúvel em água em ebulição, promovendo uma coloração alaranjada. A solubilidade em água é marcadamente influenciada pelo pH, variando de 1,5 μ g/mL a pH 4,0 para 5mg/mL a pH 10,0, demonstrando comportamento típico de uma substância ionizável fracamente ácida. (LUI *et al.*, 1985).

A substância dissolve-se prontamente em soluções alcalinas; na presença de hidróxido de sódio, forma um sal sódico que confere às soluções aquosas uma coloração vermelha brilhante. Esta forma é extremamente ativa como corante (LIMA *et al.*, 1956).

LUI et al. (1985) determinaram a solubilidade deste fármaco em alguns solventes a 25°C: água a pH 5.0 - 0.002mg/mL, água a pH 8.0 - 1.1 mg/ mL, etanol - 16.0mg/mL, glicerol - 0.06mg/mL, PEG 400 - 31.0mg/mL, propilenoglicol - 4.4mg/mL, óleo de soja - 6.9mg/mL.

Os mesmos pesquisadores demonstraram haver uma relação matemática entre a concentração da mistura binária de solventes e a solubilidade do lapachol, através da equação semilogaritmica de Hildebrand-Scott : $\text{Log } y = \text{Log } a + bx$; onde y = concentração de droga na solução, a = concentração da droga quando o solvente é apenas a água; b = inclinação da reta que indica o grau de solubilidade do lapachol no solvente, x = concentração do solvente em água .

TABELA I - Parâmetros de Solubilidade Hildebrand-Scott do Lapachol por Mistura de Sistemas de Solventes a 25°C.

Sistema de solvente	(a)+	(b)	r^2 *
PEG 40/água	1,0	0,10	1,0
Etanol/água	7,6	0,08	0,99
Propilenoglicol/água	0,7	0,09	1,0
Glicerol/ Tampão pH 7.4	205,0	0,02	1,0

+ representa solubilidade em água (variável de acordo com pH)

* coeficiente de correlação

Neste mesmo trabalho foi determinada a estabilidade das soluções de Lapachol em PEG 400, PEG 400/água (50:50), propilenoglicol, propilenoglicol/água (50:50), etanol, etanol/água (50:50), glicerol, glicerol/água (50:50), tampão pH 7,4, no escuro sob refrigeração, a temperatura ambiente (25°C) sem proteção e com proteção da luz, todos por um período de 48 e 164 horas. As soluções que apresentaram instabilidade foram as soluções aquosas não tamponadas e soluções não aquosas quando expostas à luz. O coeficiente de partição octanol/água é descrito como sendo 2,69 (log P).

◆ Farmacologia do Lapachol

O Lapachol possui absorção rápida através do trato gastrointestinal após administração oral em ratos com tumor de Walker 256 e distribui-se por todos os tecidos, exceto o cerebral e células sanguíneas. É rapidamente metabolizado e parcialmente transformado em β -Lapachona. Quando administrado por via intra-venosa em camundongos e cães, na dose de 40mg/Kg, apresenta tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de respectivamente, 33 e 75 minutos. A excreção é prioritariamente pelas fezes e apresenta baixa toxicidade, verificando-se apenas em alguns pacientes efeitos como anorexia, náuseas, raramente vômitos e um aumento do tempo de protrombina. A administração de doses de 100mg/Kg proporcionou uma grande incidência de ação blastocística-antizigótica e uma atividade abortiva, levando a malformações (NAYAK *et al.*, 1968; SESTER *et al.*, 1997).

Em estudos sobre sua farmacodinâmica, aproveitando-se de modelos propostos em 1961 e 1962, respectivamente por Smith & Lester (1961) e Redfarm & Whitaker (1962), Santana e colaboradores propuseram que o Lapachol tem mecanismo de ação semelhante a outras quinonas (benzoquinonas) como inibidor da oxidação e fosforilação mitocondriais e inibidor da oxidase succínica. (SANTANA *et al.*, 1968)

A atividade antibiótica é estudada desde 1956, onde foi verificada uma importante seletividade contra microrganismos Gram-positivos e ácido-resistentes e uma ação fraca contra Gram-negativos com exceção do gênero *Brucella* (LIMA *et al.*, 1956).

Na dose de 100mg/Kg, o Lapachol apresentou inibição de 82% e 50%, respectivamente, no sarcoma de Yoshida e carcinosarcoma de Walker 256 em animais de laboratório. Em ensaios clínicos em humanos portadores de neoplasias malignas observou-se regressão do volume tumoral e diminuição e até desaparecimento das dores produzidas pelo tumor. Devido a esta propriedade e sua baixa toxicidade por via oral, admite-se que o composto pode ser empregado sozinho ou associados a outros antineoplásicos (BLOCK, 1974).

O lapachol apresentou ação antiedematogênica em animais de laboratório de 76% a 85% para doses de 100 a 500mg/Kg por via oral, 4 horas após a indução de edema de pata por carragenina. Na dose de 150mg/Kg, uma inibição de 57% no peso de abscesso induzido por carragenina foi apresentada, em relação a 48% de inibição apresentada pela

fenilbutazona (ALMEIDA *et al.*, 1990). Pôde-se constatar que formulações tópicas do lapachol mantêm suas propriedades antiinflamatórias e analgésicas, após testes clássicos de indução de edema em ratos e algesia induzida por ácido acético em camundongos (SESTER *et al.*, 1997).

Ensaio clínico em humanos portadores de bursite, otite, tendinite e sinusite administrados por via oral sob a forma de cápsulas e por via tópica, foi observada uma ação antiinflamatória numa faixa entre 92 a 95% dos casos (CORREIA, 1988; FONSÊCA *et al.*, 2000).

◆ Toxicidade do Lapachol

A toxicidade aguda (DL₅₀) em ratos albinos via intraperitonal do lapachol foi de 1600mg/Kg (SANTANA *et al.*, 1968). Em estudos posteriores, MORRISON *et al.* (1970) utilizando ratos e camundongos, encontraram valores de DL₅₀ por via oral, maiores que 2400mg/Kg para os primeiros e de 621mg/Kg para os segundos, sendo os machos mais suscetíveis à ação do lapachol, com DL₅₀ de 487mg/Kg, enquanto as fêmeas apresentaram 792mg/Kg. Em doses mais elevadas (1200 a 2400mg/Kg) dadas a camundongos, a morte ocorre após 1 a 6 dias e os sinais de toxicidade foram diarreia, edema e eritema nas pálpebras. Apesar de sua baixa toxicidade, o lapachol apresenta alguns efeitos como anorexia, náuseas e mais raramente vômitos, que pode ser facilmente controlado com antieméticos (SANTANA *et al.*, 1968).

A toxicidade crônica em ratos Sprague Dowley, usando via oral, não produziu alterações nos animais que receberam lapachol na dose de 150mg/Kg diariamente, durante 30 dias. Os que receberam dose diária de 500mg/Kg morreram na 10ª dose. Estudos patológicos não revelaram alterações de grande importância nos diversos órgãos desses animais, nem modificaram os níveis tensionais nem a mecânica respiratória dos ratos anestesiados com nembital. Diferente de alguns agentes antitumorais, lapachol exibe atividade altamente significativa com pouco efeito relativo sobre o peso da população (SANTANA *et al.*, 1968).

Em estudos com macacos *cynomolgus*, grupos de 2 macacos cada um recebendo diariamente 0,25 e 0,5 g de lapachol/Kg e 1 macaco recebendo 1g/Kg, a morte ocorreu depois de 6 dias de tratamento com 0,5g de lapachol/Kg e depois de 5 dias com

1,0g de lapachol/Kg. O macaco que recebeu 0,25g/Kg apresentou emese, anorexia, palidez das mucosas, anemia moderada e reversível, reticuloses, proteinúria, bilirrubinemia e descoloração da urina depois de 1-2 semanas de tratamento. Concluiu-se, portanto, que a dose de 0,25g/Kg de lapachol é considerada a máxima dose tolerada em macacos (MORRISON et al., 1970).

Ensaio de sensibilização cutânea de cobaias com diferentes naftoquinonas demonstraram que o lapachol só apresenta efeito sensibilizante quando aplicado sobre a pele animal pré-sensibilizado com desoxilapachol, atuando apenas como sensibilizante secundário (SCHULTZ et al., 1977).

Um ensaio de teratogenicidade da droga realizada em ratas prenhas indicaram que a administração oral de 100mg/Kg de lapachol mostrou uma grande incidência de reabsorção do ovo por ação blastocistotóxica-antizigótica e uma atividade abortiva, levando a malformação. A ação do lapachol ocorre no início do período da divisão do ovo, assim como durante o período de implantação através de mecanismos ainda desconhecidos (ALMEIDA et al., 1988).

A administração de lapachol (4 doses semanais de 20mg com intervalo de 1 semana a cada 6 de tratamento) por via parenteral a ratos adultos da raça Sprague-Dawley com peso de aproximadamente 150g, concomitantemente a um carcinógeno químico (20-metilcolantreno, 8 doses semanais de 10mg) administrado por via oral, demonstrou que o lapachol além de ser um potente promotor oncogênico se comportou como um produto hepato e nefrotóxico, produzindo notáveis alterações histopatológicas nestes órgãos (SANDOVAL et al.,1996).

A administração parenteral de vitamina K a pacientes que receberam lapachol por via oral faz com que o efeito de prolongamento do tempo de protrombina seja eliminado, mesmo com dose única da vitamina e o tratamento permanecendo durante um total de 5 semanas (MORRISON et al., 1970).

VIA CUTÂNEA

◆ Aspectos Gerais

A pele representa um dos órgãos mais extensos do corpo, cobrindo uma superfície de aproximadamente $1,73\text{m}^2$ sendo banhada por 1/3 do sangue, além de corresponder a 5% do peso corporal (BARRY, 1983)

Está localizada na superfície corporal separando órgãos vitais do meio exterior, protegendo assim o organismo de toda substância estranha (de natureza química, física e microbiológica) e impedindo a saída de compostos fisiológicos, tais como a água, além de executar um importante papel termostático na manutenção da temperatura corporal e na regulação da pressão sanguínea (JEANMOUGIN, 1984; CLEMESSEY *et al.*, 1988; SANTANA, 1992).

Constitui uma via potencial de aplicação de medicamentos devido a seu fácil acesso e sua grande superfície. A aplicação transdérmica de medicamentos não é invasiva e a liberação das drogas pode ser feita de forma prolongada por vários dias, mantendo constantes os níveis plasmáticos, evitando assim flutuações típicas de administrações múltiplas (SANTI, 1999).

As limitações desta via de administração estão principalmente associadas com a função de barreira da pele que impõe grandes limites à absorção de drogas. Desta forma é importante que o fármaco administrado por esta via seja de grande potência, pois as doses diárias possíveis de serem absorvidas pela pele são de 10mg/dia. Além disso, um bom fármaco para administração transdérmica deve possuir baixo peso molecular, boa solubilidade na água e no óleo e não deve ser irritante ou sensibilizante cutâneo (SANTI, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2000).

No entanto, são poucas as substâncias que atravessam o estrato córneo em quantidade suficiente para expressar sua ação. Por isso há um crescente interesse em encontrar promotores de absorção que são substâncias ou métodos físicos que modificam temporariamente e reversivelmente a barreira do estrato córneo, auxiliando a penetração dos fármacos (BARRY, 1983; MARTIN, 1993; BLOCK, 1990). A iontoforese, eletroporação e ultra-som, além de diversos outros promotores de absorção químicos, têm como finalidade a viabilização desta via como alternativa à administração de

fármacos(HUANG et al., 1996; SANTI & GUY, 1996; VANBEVER et al., 1996; ZHANG et al., 1996).

Para estudar como as substâncias penetram esta barreira foi realizado um Workshop em 1986 onde foram estabelecidas as normas de procedimento para realização de estudos *in vitro*, além de definir a terminologia empregada (SKELLY et al., 1987).

◆ **Camadas que compõem a pele e órgãos anexos**

A pele possui uma alta resistência que é essencial para sua função de proteção e é constituída de três camadas, do exterior para o interior, epiderme, derme ou cório e tela subcutânea ou hipoderme.

A epiderme é recoberta pela camada córnea, possui espessura média de 0,1 a 0,2 mm, representa a principal barreira à penetração, não contém vasos sanguíneos e é formada basicamente por tecido epitelial estratificado, queratinizado ou não. Possui uma película de material emulsificado composto por complexo de sebo, suor e lâmina córnea descamativa e uma capa gasosa, chamada manto gasoso, constituída principalmente por vapores de água provenientes da volatilização corporal (MOSER et al., 2001).

A epiderme é dividida em epiderme morta ou estrato córneo e epiderme viva, sendo esta última subdividida em quatro camadas *Stratum lucidum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* e *Stratum germinativum*. O estrato córneo é formado por células achatadas, sem vitalidade e heterogêneas (corneócitos), possui uma estrutura pluri-estratificada hidrófila-lipófila de modo que apenas as substâncias que possuem propriedades hidrófilas e lipófilas podem atravessá-lo, utilizando a via intercelular. A epiderme viva é separada da derme pela junção dermo-epidérmica e suas quatro camadas traduzem do interior para a superfície, a transformação de um queratinócito basal ou germinativo em um queratinócito córneo ou morto (SANTANA,1992; SESTER *et al.*, 1997; ANSEL *et al.*, 2000).

A derme, segunda camada, possui espessura média de 2 a 4mm, constituída de uma matriz de proteínas fibrosas, banhada num tecido coloidal amorfo. Apresenta-se rica em vasos sanguíneos, canais linfáticos e nervos, além de conter os segmentos inferiores das glândulas sebáceas e folículos pilosos. Executa um papel de sustentação e nutrição e divide-se em duas partes: derme papilar ou tecido conjuntivo frouxo e derme reticular ou tecido

conjuntivo denso, constituído por fibras de colágeno e elastina (SESTER *et al.*, 1997, MOSER *et al.*, 2001).

A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo contendo células adipócitas que fabricam e estocam lipídeos, sendo responsável pelo isolamento térmico e proteção mecânica contra os choques externos a que se submete o corpo (SESTER *et al.*, 1997).

A pele contém, ainda, dois tipos de órgãos anexos:

- ◆ As glândulas sudoríparas- constituídas de longo tubo que entra na hipoderme enrolando-se.
- ◆ aparelho pilossebáceo- constituído por uma depressão cutânea, o folículo piloso, no qual o pêlo insere-se; uma bainha que circunda o pêlo, onde vem escoar o sebo secretado pela glândula sebácea, preenchendo os espaços livres da bainha (LE HIR, 1997).

◆ **Vias de Penetração Cutânea**

A pele tem a função essencial de proteger o organismo da desidratação e das agressões exteriores. Ela é, desta forma, mais ou menos permeável às substâncias químicas e permite a passagem de medicamentos em certas condições, podendo ser considerada uma interface terapêutica. Assim, embora a pele represente uma barreira à penetração de substâncias, existem várias formas farmacêuticas de uso tópico que sofrem absorção, inclusive algumas de uso sistêmico.

A permeação das camadas que formam a pele ocorre por difusão através de duas vias : a via transepidérmica, que compreende a penetração transcelular (através das células) e a penetração intercelular (entre as células), e via transanexal (através dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e dispositivo pilossebáceo) (figura 1).

Se a pele estiver intacta, a principal via de administração são as camadas epidérmicas e não os folículos pilosos, pois sua área superficial é bastante pequena em comparação com a da pele que não contém nenhum desses elementos anatômicos. Então a absorção percutânea corresponde à penetração direta do fármaco através do estrato córneo, passando os tecidos epidérmicos mais profundos e atingindo a derme que é vascularizada e onde o fármaco torna-se disponível para a absorção (ANSEL *et al.*, 2000).

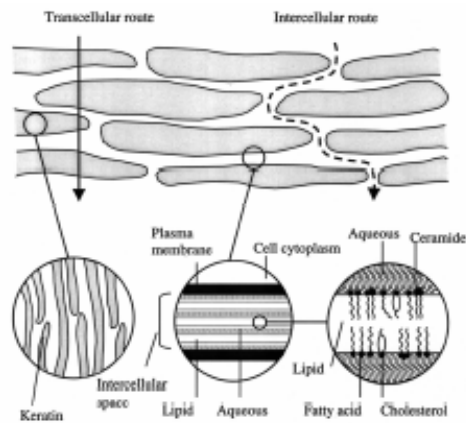


Figura 2: Representação esquemática das diversas vias de penetração na pele (MOSER et al., 2001).

Segundo RITSCHER *et al.* (1988), a absorção percutânea pode ser influenciada por vários fatores divididos em dois grupos:

Fatores fisiológicos e patológicos da pele:

- ✓ Estado da pele
- ✓ Idade
- ✓ Local de aplicação
- ✓ Variação inter-espécies
- ✓ Metabolismo cutâneo

Fatores físico-químicos:

- ✓ Hidratação cutânea
- ✓ Temperatura
- ✓ Princípio ativo
- ✓ Concentração inicial
- ✓ Relação coeficiente de partição/atividade termodinâmica
- ✓ Viscosidade
- ✓ pH
- ✓ Promotores de absorção

A escolha do veículo e dos excipientes devem ser bastante analisadas. Veículos que se espalhem facilmente sobre a superfície da pele, misturem-se rapidamente com o sebo ou aumentem a hidratação da pele (como veículos oleosos e/ou os curativos oclusivos que agem como barreiras a umidade), aumentam a absorção (ANSEL *et al.*, 2000).

Então a pele constitui uma barreira muito eficaz, mas pode ser atravessada por pequenas quantidades de substâncias lipófilas capazes de penetrar nas camadas córneas e podendo até chegar a uma absorção sistêmica. Nesse processo, o estrato córneo constitui a principal barreira, enquanto, a epiderme e a derme se comportam como um gel aquoso e não apresentam função significativa de barreira, sendo marcantes seus efeitos reservatórios. É importante conhecer exatamente o grau de penetração, pois para determinados princípios ativos, uma penetração profunda pode provocar intoxicações (BONNABRY, 1999; LE HIR, 1997).

◆ **Aplicação Teórica da Difusão Percutânea**

A maioria das moléculas químicas são absorvidas através da pele por difusão passiva. A velocidade de absorção ao atravessar o tegumento não é imediatamente constante, ela é marcada por um tempo de latência (SANTANA, 1992). O tempo de latência traduz o prazo necessário para a penetração da substância na pele estabelecer o gradiente de concentração. Este tempo é variável de um composto para outro. O tempo de latência é determinado pela extrapolação da parte linear da curva sobre o eixo das abcissas (T), expresso pela equação (I):

$$T = \frac{E}{6D} \quad \text{onde:} \quad (I)$$

T = tempo de latência

E = espessura da membrana

D = coeficiente de difusão da molécula em seu veículo

Quando o equilíbrio é alcançado (steady-state), a quantidade de substância penetrante na membrana a nível de derme é igual aquela que penetra na epiderme (SANTANA, 1992), e a difusão é regulada pela lei de Fick (II):

$$\frac{dA}{dT} = \frac{D \cdot K_p \cdot C}{h} \quad (\text{II})$$

Onde:

dA/dT = velocidade de difusão

D = coeficiente de difusão através da membrana

K_p = Coeficiente de partição veículo/membrana

h = espessura da membrana

A equação III permite definir constante de permeabilidade, P.

$$P = \frac{D \cdot K_p}{h} \quad (\text{III})$$

Assim o fluxo pode ser definido pela equação (IV):

$$J = S \cdot P \cdot \Delta C \quad (\text{IV})$$

J = fluxo

S = superfície de aplicação

ΔC = gradiente de concentração

P = constante de permeabilidade

Desta forma, a velocidade de difusão de um princípio ativo se relaciona matematicamente com a concentração, o coeficiente de difusão, o coeficiente de partição das substâncias e com a área da membrana contactada pelos permeantes (BONNABRY, 1999).

◆ Cinética de Difusão

Medicamentos destinados à via cutânea são anteriormente avaliados biofarmaceuticamente por estudos de liberação do princípio ativo, através de métodos “in vitro” e “ex vivo”, para verificação da eficácia e escolha a partir de diferentes formulações concebidas (SESTER *et al.*, 1997).

A utilização destes métodos tem como objetivo acompanhar o comportamento das drogas que entram em contato com a pele, podendo também ser utilizado para medir o

metabolismo cutâneo da droga se a pele apresentar condições viáveis (BRONAUGH & MAIBACH, 1985).

Dentre os modelos mais empregados para este fim, destaca-se as células do tipo FRANZ (Figura 2), compostas basicamente de: compartimento doador, onde o fármaco é depositado; compartimento receptor, solução na qual a droga será difundida, e a membrana, que tem papel de barreira na absorção (FRANZ, 1975). Estas células, quando controlados os parâmetros envolvidos nesta metodologia, como a natureza da membrana, a temperatura, a dose e a agitação, simulam ao máximo o fenômeno da passagem percutânea da droga *in vivo* (ALMEIDA *et al.*, 2000)

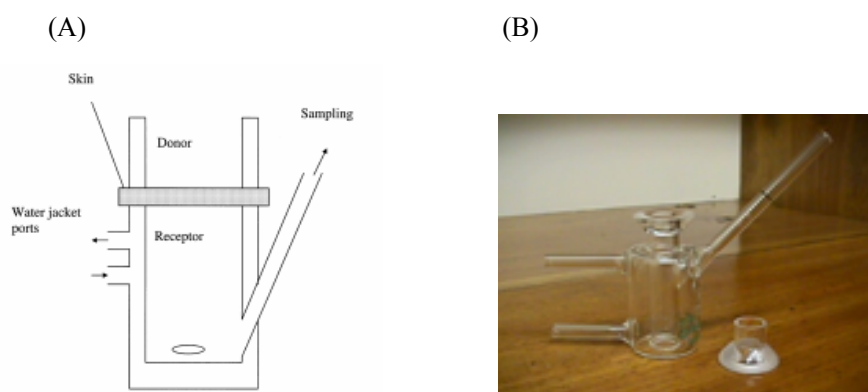


Figura 3 – Representação esquemática de uma célula de difusão estática (A) e uma foto de uma célula de Franz (B), para medir a permeação de drogas na pele (MOSER *et al.*, 2001).

Os estudos de permeação ditos *in vitro* são assim chamados pelo fato de se empregar membranas artificiais. Estas membranas podem ser polimerizadas porosas (celofane ou acetato de celulose) ou não porosas (de polidimetil-siloxane, nylon, acrílica).

O estudo *in vitro* permite apenas reproduzir a passagem quantitativa e qualitativa do princípio ativo a partir da forma farmacêutica, demonstrando limites evidentes quanto à complexidade biológica e físico-química da pele do homem (SESTER *et al.*, 1997).

Godwin *et al* desenvolveram pele artificial, constituída de uma camada dérmica contendo fibroblastos humanos dispersos em uma matriz de colágeno e uma camada epidérmica de queratinócitos humanos diferenciados e estratificados. Foi realizado um estudo comparativo entre esta pele artificial e peles de cadáver humano e ratos sem pêlo e

concluiu-se que a pele alternativa, ainda não pode ser considerada um modelo comprovadamente aceito para a pesquisa de transdérmicos e formulações tópicas, já que a permeabilidade mostrou ser 2 a 3 vezes maior que a pele de cadáver humano (GODWIN et al., 1997).

O estudos de permeação *ex vivo* se diferenciam do método *in vitro* por empregar fragmentos de pele e se encontram mais próximas de reproduzir as condições *in vivo* pois para determinar o efeito percutâneo de um fármaco aplicado na pele humana, o melhor modelo é o homem em si. Porém, existe uma dificuldade natural na obtenção deste tipo de pele, assim, como alternativa, muitos pesquisadores usam a pele animal como membrana, embora esta não tenha uma permeabilidade idêntica à pele humana (LOPES & KANEKO, 2000).

A permeabilidade varia não apenas de espécie para espécie, mas também com a idade e o sítio anatômico (PRIBORSKY & MUHLBACHOVÁ, 1990). A arquitetura básica do tegumento é similar em todos os mamíferos, no entanto, existem diferenças estruturais no arranjo e na densidade dos folículos pilosos entre eles.

Uma das causas da diferença de permeabilidade entre a pele humana e a animal pode ser a quantidade de apêndices como os folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas. A tabela a seguir pode dar uma idéia dessas diferenças:

Tabela II - Densidade e Tamanho dos folículos pilosos em 5 tipos de pele (MARZULLI & MAIBACH, 1996)

Espécie	Local da pele	Nº folículos/cm²	Diâmetro (mm)
Humana	abdômen	11 ± 1	97 ± 3
Porco	dorsal	11 ± 1	177 ± 4
Ratos	dorsal	289 ± 21	25 ± 1
Camundongos	dorsal	658 ± 38	26 ± 1
Camundongos sem pelos	dorsal	75 ± 6	46 ± 1

Os mais variados tipos de peles animais para os estudos de permeação cutânea são usadas pelos pesquisadores. A pele de coelho, apesar de ser comprovadamente mais permeável que a pele humana, foi utilizada por Naito e Tsai (1981) e posteriormente por Niazzy (1991).

A pele animal mais frequentemente empregada para estes estudos é a do camundongo sem pêlo embora Bond e Barry comprovaram que esta pele não é indicada, já que a super-hidratação altera drasticamente o estrato córneo fornecendo dados irreais aos experimentos, o mesmo não ocorrendo com a pele humana sob as mesmas condições (BOND & BARRY, 1988).

A pele de porco, principalmente quando jovem, também foi utilizada como modelo de membrana devido a sua semelhança com a pele humana em termos de densidade de folículos pilosos (REIFENRATH et al., 1991).

Uma outra alternativa é o uso de muda de pele de cobra que foi testado por Kuramoto et al. (1996).

Estudos comparativos entre peles de diversos animais, como pele de cobra com e sem escamas; pele de sapo, de camundongo sem pêlo, de rato, de porco, de humanos (prepúcio e coxa) além de uma membrana artificial foram conduzidos por Lin *et al.* Os pesquisadores concluíram que as peles de cobra, de porco e de prepúcio, seriam as mais indicadas para os estudos de permeação cutânea de fármacos, já que estas apresentaram menor fluxo no mesmo espaço de tempo, representando assim o passo limitante da absorção que é o papel do estrato córneo (LIN et al., 1992).

Atualmente há tendência de se usar pele humana obtida de cirurgia plástica, tanto pela fácil obtenção quanto pela maior reprodutibilidade das condições reais do organismo. Segundo o trabalho de Wester et al comprovou-se que a pele humana mantém-se viável por 8 dias sem danos a sua integridade se armazenada em meio de cultura que contenha aminoácidos e sais minerais balanceados (WESTER et al., 1998).

FORMAS FARMACÊUTICAS TÓPICAS

◆ Formas Farmacêuticas do Tipo Gel

O gel é uma pomada de consistência semi-sólida, composta por líquidos gelificados por agentes gelificantes apropriados. Ele pode ser classificado em gel hidrófilo ou gel hidrófobo. O primeiro é muito mais comum e utiliza excipientes como a água, o glicerol e o propilenoglicol gelificados por meio de gelificantes como a goma adragante, o amido, os derivados de celulose, polímeros carboxivinílicos ou silicatos de magnésio-alumínio. Os géis hidrófobos são géis cujos excipientes são compostos pela parafina líquida adicionada de polietileno, de óleos graxos gelificados pelo óxido de silício coloidal ou por sabões de alumínio ou de zinco (LE HIR, 1997).

Os géis têm em geral, um efeito emoliente e refrescante, mas a sua rápida secagem transforma-as numa película quebradiça quando aplicadas na epiderme, e por isso é freqüente a inclusão de glicerina, que faz com que as películas formadas fiquem elásticas e protejam melhor a pele. Possuem pouca penetrabilidade, já que seus excipientes formados por grandes moléculas coloidais, não podem atravessar a epiderme intacta e não mostram afinidade pelas proteínas da pele, não originando absorção (PRISTA *et al.*, 1995).

Assim, as vantagens dos géis são muito reduzidas: são bem tolerados e laváveis com água. Em compensação, apresentam inúmeros inconvenientes: são incompatíveis com numerosos princípios ativos, são instáveis e tendem a ressecar deixando um pó como resíduo, constituem excelentes meios de cultura e não possuem poder penetrante, por isso só podem ser utilizados para uma ação superficial (LE HIR, 1997).

Entretanto, os géis de Carbopol[®] são dotados de boa penetrabilidade cutânea, podendo esta ser aumentada pela adição de substâncias como a trietanolamina, álcool isopropílico, propilenoglicol e polietilenoglicol (PRISTA *et al.*, 1995).

Os ensaios utilizados para géis são os mesmos utilizados para pomadas em geral:

Homogeneidade- Doseamento do princípio ativo e avaliação macroscópica e microscópica.

Dureza- É feita com um penetrômetro e sua determinação é importante para que o espalhamento e a expulsão do tubo sejam feitas sem dificuldades.

pH- É bastante importante pois pode ter influência sobre a estabilidade e viscosidade dos géis, sobre a estabilidade dos princípios ativos, a compatibilidade com os excipientes, a atividade dos conservantes e sobre o pH da pele que pode modificar.

Esterilidade- Para casos onde o gel for aplicado sobre feridas abertas severas ou sobre uma pele gravemente atingida. Em géis aquosos não estéreis, a qualidade das fabricações pode ser verificada por determinação da contaminação microbiana.

Ensaio de atividade ou de biodisponibilidade- Ensaio *in vivo* e *in vitro*.

◆ **Formas Farmacêuticas do Tipo Emulgel**

Emulgéis são preparações relativamente novas, bem conhecidas em cosméticos mas que possuem poucas referências a respeito das suas propriedades físicas e sobre as propriedades de fluxo. A avaliação e interpretação das informações não têm sido padronizadas até agora e os autores e laboratórios diferentes tomaram abordagens individuais (MARQUARDT & SUCKER, 1997).

Estas preparações são sistemas óleo-água, contendo uma goma como espessante da fase aquosa externa e podem ser constituídas de uma preparação geleificada na qual incorpora-se um agente emulsificante ou um emulsificante em conjunto com uma fase oleosa que pode ser um óleo mineral ou vegetal (MARQUARDT & SUCKER, 1997; GOODRICH,1997). O uso de um espessante aumenta a viscosidade da fase contínua, reduzindo a frequência de colisão e a coalescência das gotas, aumentando, assim, a estabilidade da preparação. O Carbopol[®] é um espessante bastante utilizado nestes tipos de formulações, que possui em sua estrutura uma pequena porção lipofílica em adição a uma grande porção hidrofílica funcionando como emulsificantes óleo em água. A parte lipofílica deste polímero se localiza na interface óleo-água e a porção hidrofílica intumescer em presença de água formando o gel que envolve as gotículas de óleo (GOODRICH, 1997). Com isto, pode-se obter formulações com maior estabilidade e que não necessitam de grande quantidade de fase oleosa para obter boa viscosidade.

Os tensoativos são agentes emulsificantes essenciais para a fabricação de emulsões estáveis, mas podem causar irritações indesejáveis na pele e nos olhos, diminuição da atividade antimicrobiana ou um aumento indesejável na penetração através da pele por outros irritantes ou impurezas. Por esse motivo, tem crescido o interesse na segurança das

preparações cosméticas reduzindo as concentrações das misturas de tensoativos não iônicos, aniônicos ou catiônicos limitando-as, geralmente, em 2 a 15%, porém sem afetar a estabilidade da emulsão (LIN, 1991).

Os efeitos danosos dos tensoativos sobre a pele manifestam-se como ressecamento, aspereza e descamação podendo surgir sintomas de inflamação ou chegar à destruição total do tecido por necrose. A pele também perde as gorduras devido à propriedade (mais ou menos pronunciada) dos tensoativos de emulsificar os lipídeos e assim remover a sua película superficial. Uma das principais razões para o uso de tensoativos não iônicos em produtos para a pele é sua bem documentada segurança e sua excelente tolerância pela pele e pelos olhos (IDSON, 1997).

Os géis são preparações agressivas à mucosa, provocando sensações como pequena ardência, mas apresentam um tempo de conservação maior, já as emulsões, além das desvantagens citadas em relação à concentração dos tensoativos, apesar de serem extremamente suaves, são oxidados mais facilmente e possuem menor estabilidade. Os emulgéis superam algumas dessas desvantagens por serem preparações intermediárias entre as geleificadas e as emulsionadas (LEAL *et al.*, 1999).

A partir desse ponto, segue-se a escolha do espessante e da concentração destes espessantes que deverão dar uma consistência com fácil espalhamento sobre a pele e maior velocidade de absorção, deixando-a macia e sem oleosidade. Outro parâmetro para a escolha do espessante é a ausência de grumos e bolhas de ar no corpo da emulsão e, principalmente manter a estabilidade do sistema (BARRY & GRACE, 1971; VALERO *et al.*, 1997).

◆ **Permeação do lapachol a partir de forma tópicas**

Como o Lapachol tem apresentado atividade anti-inflamatória, SANTOS *et al.* (1991) realizaram ensaios *in vitro* de preparações dérmicas contendo Lapachol, tendo como objetivo concluir sobre a provável eficácia de penetração do referido princípio ativo. Foram testadas duas formulações:

TABELA III – Formulações de Lapachol em gel testadas *in vitro* quanto a cedência.

Componentes	Formulação A	Formulação B
Carbopol 934	0,50g	0,50g
Propilenoglicol	10g	-----
Glicerina	-----	6,7g
Álcool 95°	10g	10g
Alcalinizante	Trietanolamina q.s. (pH \pm 6,8)	Sol. NaOH a 10% q.s. (pH \pm 6,8)
Lapachol	0.10g	0.30g
Água destilada q.b.p.	50.0g	50.0g

O ensaio de difusão foi realizado após um período de 48 horas para o amadurecimento do gel. Ambas as formulações A e B possuíram a capacidade para atravessar as membranas artificiais utilizadas no ensaio, e também, a partir de um determinado período de latência, existiu relação linear entre a quantidade de fármaco difundido e a raiz quadrada do tempo. A formulação A apresentou o maior grau de cedência *in vitro* nas condições em que foram realizados os ensaios. Foi avaliado também o efeito do Tween 80 como agente promotor de absorção em ambas as formulações, a fim de se observar o possível aumento de cedência do referido fármaco. A formulação A com a concentração de 0,025% de Tween 80, apresentou maior grau de cedência do fármaco. No caso da formulação B a presença de tensoativo provocou sempre uma diminuição da cedência do princípio ativo nas concentrações de 0,1%, 0,5%, 0,025%, 0,0125%, 0,00625%. Apesar da concentração do Lapachol na formulação B ser três vezes superior à da formulação A, a sua difusão é significativamente mais lenta e a quantidade do fármaco difundido é cerca da metade da obtida com a formulação A (SANTOS *et al.*, 1991).

O estudo reológico mostrou terem as formulações comportamento pseudo-plástico com tixotropia, não apresentando alterações significativas, mesmo quando submetidas a duas temperaturas diferentes ($24 \pm 1^\circ$ e $37 \pm 1^\circ\text{C}$).

A partir dos resultados positivos *in vitro* das formulações de Lapachol desenvolvidas por SANTOS *et al.* (1991), SESTER *et al.* (1997) propuseram pesquisar a

passagem percutânea do Lapachol, otimizando a formulação de referência A, variando a concentração de Lapachol 0,2%, 0,5% e 1%, em diferentes valores de pH 5, 7 e 8, e Carbopol 934, 940 e 941, com e sem incorporação de Tween 80.

As respectivas formulações não apresentaram significativa alteração da viscosidade, pH ou aspecto macroscópico após 12 meses. Somente em pH 7, houve mudança na coloração, após submissão a variadas temperaturas (4°, 30° e 50°C). Nas demais formulações houve perda de volume quando submetidas a temperatura de 50°C. O estudo da difusão *in vitro* em células de Franz, mostrou que os melhores perfis difusionais ocorreram com os géis de Carbopol 934P a pH 8 com 0,5% e 1% de Lapachol e os de menores perfis foram verificados com Carbopol 941 em todas concentrações. No estudo *ex vivo* empregando pele de animal, as preparações utilizadas foram géis de Carbopol 934P e 941 (de maiores e menores perfis difusionais, no estudo *in vitro*) com 0,2, 0,5 e 1% de Lapachol com e sem Tween 80 e todas a pH 8. O emprego de Tween 80 confirmou seu poder promotor de absorção na maioria das formulações, exceto no caso do Carbopol 941 com 0,5% de Lapachol onde a presença de tensoativo não promoveu alteração significativa na liberação do princípio ativo.

SESTER *et al.* (1997) concluíram também que o emprego de tipos diferentes de Carbopol pareceu não influenciar a difusão do princípio ativo exceto a 1,0% de Lapachol, onde o Carbopol 934P apresentou valores de difusão superiores em relação ao Carbopol 941. Finalmente, através dos métodos *in vitro* e *ex vivo* empregados neste estudo, pode-se demonstrar a boa difusibilidade do Lapachol tópico a pH 8,0 a partir de géis de Carbopol, principalmente do tipo 934P e com 0,5% do princípio ativo. Então, pôde-se constatar que formulações tópicas do Lapachol mantêm suas propriedades antiinflamatórias e analgésicas, após testes clássicos de indução de edema em ratos e algesia induzida por ácido acético em camundongos.

ANÁLISE TÉRMICA: CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E SUA UTILIZAÇÃO EM ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Os métodos termoanalíticos permitem medir as mudanças de uma propriedade física ou química de um material, em consequência da temperatura, constituindo poderosas ferramentas para o desenvolvimento de medicamentos (Giron, 1998; Comuni, 1999). Mediante a análise térmica é possível avaliar a pureza, polimorfismo, incompatibilidades entre fármaco/fármaco, fármaco/excipientes, além de predizer a estabilidade de uma formulação (Venkataran et al., 1995; Matos et al., 1998; Comune, 1999).

A análise térmica diferencial foi desenvolvida por Le Chatelier em 1887. A indústria farmacêutica interessou-se pelo método apenas entre os anos de 1960 – 1970 com o aparecimento no mercado do primeiro DSC quantitativo (1).

No começo de um projeto, a caracterização adequada de ambos, drogas e excipientes, é um pré-requisito para minimizar problemas posteriores, como evitar polimorfismos que levariam a processos não robustos e modificações da biodisponibilidade requerendo a realização de estudos de bioequivalência.

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é um dos métodos termoanalíticos diferenciais, pelo qual mede-se a diferença de energia fornecida a substância e a um material de referência, submetidos a um programa controlado de temperatura. A área integrada sob a curva registrada é diretamente proporcional à entrada calórica diferencial total (Equação V), ou seja:

$$A = -G m \Delta H/k = -k' m \Delta H \quad (V)$$

Em que:

A = área do pico

G = Fator de calibração, depende da geometria da partícula

K = constante relativa à condutividade térmica do mesmo

ΔH = variação da entalpia, com sinal negativo para reações exotérmicas e positivos para reações endotérmicas (Canotilho et al., 1992; Van Dooren & Müller, 1984)

Dois fornos são linearmente aquecidos. Um forno contém a amostra numa panela fechada e o outro contém uma panela vazia como balança, chamada de panela referência.

Dois métodos de medidas são geralmente usados. Se a panela com a amostra e a panela referência são aquecidas linearmente, eles terão inicialmente a mesma temperatura. Se modificações, tais como fusão ocorre, a energia é usada pela amostra e a temperatura permanecerá constante na panela da amostra. Assim vai haver uma diferença de temperatura entre a panela amostra e referência.

Então, o primeiro método mede essa diferença de temperatura enquanto o segundo método possui um sistema de controle que regula a diferença de temperatura entre amostra e referência. Se alguma diferença é detectada o aquecimento individual será corrigido e o instrumento libera uma energia de compensação para manter a temperatura igual em ambas as panelas. No primeiro caso a medida primária é a temperatura, no segundo, a energia (GIRON, 1986).

As principais áreas de aplicação do DSC são (COMUNE, 1999):

- ❑ Determinação do ponto de fusão e de transição vítrea;
- ❑ Determinação da pureza relativa de compostos orgânicos e de medicamentos;
- ❑ Observação de polimorfismos;
- ❑ Pesquisa da influência de impurezas;
- ❑ Misturas de substâncias padrão;
- ❑ Investigação de processos de degradação de polímeros;
- ❑ Interações no estado sólido: detecção de água livre, formação de complexos, reações químicas, dispersões sólidas, estabilidade térmica e parâmetros cinéticos;
- ❑ Reação de um composto com um gás;
- ❑ Predição da solubilidade ideal e capacidade calórica molar diferencial;
- ❑ Estudo de compatibilidade fármaco-fármaco e fármaco-excipiente durante a pré-formulação;
- ❑ Controle de qualidade de formas farmacêuticas;
- ❑ Validação de metodologias analíticas.

Um estudo inicial conduzido durante uma pré-formulação inclui:

- A fabricação de formas polimórficas
- A detecção de solvatos e hidratos
- A determinação da modificação estável
- O conhecimento das relações termodinâmicas

Então, para um desenvolvimento racional de medicamentos é essencial caracterizar as propriedades físico-químicas, formas polimórficas e estabilidade da nova entidade química, tão bem quanto assegurar compatibilidade dele com excipientes durante processamento e estocagem. Assim, os métodos de análise térmica permitem um estudo de pré-formulação e desenvolvimento de drogas acelerado (GIRON, 1998).

Polimorfos, formas amorfas ou solvatos são diferentes fases sólidas que podem ocorrer durante cristalização ou processos galênicos. Uma recente revisão de análise térmica e métodos calorimétricos caracterizou mais de 300 ingredientes ativos como polimorfos e solvatos (GIRON, 1995).

As principais características físico-químicas afetadas no polimorfismo e pseudopolimorfismo são temperatura de fusão e sublimação, condutividade, volume, densidade, viscosidade, dureza do cristal, forma do cristal, cor, índice de refração, solubilidade, velocidade de dissolução, estabilidade, higroscopicidade e reações no estado sólido (DERSIRAJU et al., 1977). A detecção de polimorfos e pseudopolimorfos em medicamentos nas fases de fabricação e estocagem não é tão simples, o que poderia levar a riscos potenciais ao paciente, principalmente referindo-se a drogas onde a biodisponibilidade é mediada via dissolução (GIRON, 1988, GIRON, 1998).

No estudo de pré-formulação deve-se avaliar interações entre os diversos fármacos veiculados e adjuvantes farmacotécnicos, pois estes poderão promover várias reações químicas, que afetarão consequentemente, a estabilidade do produto final.

Assim, DSC é utilizado para prever a compatibilidade entre droga e excipientes. As curvas de DSC das misturas auxiliam no entendimento de interações físicas. Embora um comportamento eutético não signifique incompatibilidade, este pode explicar dificuldades com uma dada composição durante o processamento (GIRON, 1986).

O lapachol é uma naftoquinona extraída de várias espécies de árvores da família Bignoniaceae, nos representantes dos gêneros *Tecoma* e *Tabebuia*. Há poucos estudos térmicos com substâncias de plantas e seus produtos de fabricação. Assim, MACEDO & NASCIMENTO (2001) utilizaram TG e DSC acoplado a sistema fotovisual na caracterização térmica do lapachol como metodologia analítica no ensaio de pureza e determinação dos parâmetros de qualidade de cápsulas contendo lapachol. Os resultados mostraram ausência de impurezas na droga e adjuvantes, assim como uma boa

compatibilidade fármaco-excipiente, posteriormente confirmada por DSC fotovisual (MACEDO et al., 1998; MACEDO et al., 2000).

A utilização de DSC para desenvolvimento de formas farmacêuticas emulsionadas foi realizada por SHAW et al. (1999), que estudou as interações entre ivermectina e excipientes não iônicos utilizados na formulação de cremes, combinando a técnica de HPLC para confirmação das interações.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver uma forma farmacêutica tópica do tipo emulgel e comparar o seu perfil cinético com o do gel de lapachol já existente, desenvolvido em nosso laboratório em estudos anteriores;

Objetivos específicos

- Caracterização físico-química do fármaco;
- Estudo de pré-formulação;
- Compatibilidade droga-excipientes;
- Otimização das formulações utilizando ensaios de permeação do fármaco;
- Estudo comparativo da forma farmacêutica tópica do tipo emulgel e tipo gel através de ensaios de permeação *in vitro*;
- Estudo de retenção cutânea;

DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE EMULGEL TÓPICO A BASE DE LAPACHOL

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais:

Lapachol (LAFEPE)
Álcool cetosteárico (GALENA)
Álcool cetosteárico etoxilado (GALENA)
Monoestearato de glicerila (CRODA)
Oleato de isodecila (HENRIFARMA)
Trietanolamina (MERCK)
Carbopol ultrex[®] (GALENA)
Nipagin (HENRIFARMA)
Nipazol (HENRIFARMA)
EDTA (HENRIFARMA)
Etanol (QUIMIS)
Glicerina (GALENA)
Óleo mineral (GALENA)

Fomulação: Incorporou-se o lapachol nas formulação base do tipo emulgel especificada na Tabela IV. Em seguida, realizou-se modificações nas concentrações dos constituintes presentes e incorporação de novos excipientes, assim como mostra a Tabela V, para obtenção de uma formulação com melhor aspecto macro e microscópico e estabilidade.

TABELA IV – Formulação base para desenvolvimento do emulgel de lapachol.

Constituintes	Quantidade
Lapachol	0.50%
Álcool cetosteárico	6%
Álcool cetosteárico etoxilado	3%
Carbopol ultrex	0.30%
Metilparabeno	0.15%
Propilparabeno	0.05%
EDTA	0.10%
Óleo mineral	5%
Oleato de isodecila	5%
Trietanolamina	pH 8,0
Etanol/glicerina (70:30)	40%
Água destilada q.s.p.	100%

TABELA V: Modificação dos excipientes para obtenção de uma formulação mais estável

Constituintes	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Lapachol	0,50%	0,4%	0,4%	0,3%	0,4%	0,3%
Álcool cetosteárico	6%	6%	6%	6%	-	-
Álcool cetosteárico etoxilado	3%	3%	3%	3%	3%	3%
Monoestearato de glicerila	-	-	-	-	8%	8%
Carbopol ultrex	0,30%	0,30%	0,30%	0,30%	0,30%	0,30%
Metilparabeno	0,15%	0,15%	0,15%	0,15%	0,15%	0,15%
Propilparabeno	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
EDTA	0,10%	0,10%	0,10%	0,10%	0,10%	0,10%
Óleo mineral	5%	5%	5%	5%	5%	5%
Oleato de isodecila	5%	5%	5%	5%	5%	5%
Trietanolamina	pH 8,0	pH 8,0	pH 8,0	pH 8,0	pH 8,0	pH 8,0
Etanol/glicerina (70:30)	40%	40%	20%	20%	20%	20%
Água destilada q.s.p.	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Preparação dos emulgéis: O carbopol foi previamente disperso em água, em seguida adicionado todos os excipientes hidrossolúveis. Preparou-se a fase oleosa e aqueceu-se as duas fases até aproximadamente 70° C. Verteu-se a fase oleosa sobre a aquosa, neutralizou-se a preparação utilizando trietanolamina e incorporou-se o lapachol em solução glicerina: etanol, agitando até resfriamento. As formulações foram acondicionadas em frascos de vidro com tampas herméticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as preparações apresentaram um bom aspecto macroscópico mas quando observadas microscopicamente foi observada a presença bolhas e em alguns casos, a de cristais de lapachol. As formulações P1 e P2 preparadas com 40% de sistema solvente etanol:glicerina (70:30), foram as que apresentaram a maior quantidade de bolhas pois, devido a grande quantidade de solvente incorporado, ocorria uma admissão de ar na preparação. Assim, esta quantidade foi diminuída para 20%, presente nas demais preparações.

A quantidade de lapachol também foi diminuída para concentrações menores para evitar a formação de cristais de lapachol, o que representa, uma instabilidade decorrente de supersaturação do veículo. Assim, estes veículos supersaturados tendem a cristalizar com o decorrer do tempo modificando as características de permeação do fármaco a partir da base. Como o aumento do grau de saturação da droga na formulação está relacionada ao aumento

da atividade termodinâmica do sistema, dois veículos nos quais a droga está presente na concentração de saturação, apresentariam a mesma velocidade de permeação independente da solubilidade do fármaco no veículo mesmo que um deles apresentasse concentração de saturação muito mais elevada que o outro (MOSER et al., 2001).

Então ao final do experimento obteve-se quatro preparações do tipo emulgel, onde duas utilizavam uma combinação do álcool cetosteárico com o álcool cetosteárico etoxilado como base emulsificante, e as outras, onde o álcool cetosteárico foi substituído por monoestearato de glicerila, resultando em uma nova base com propriedades diferentes da primeira. Assim, estas preparações foram submetidas a ensaios de permeação *in vitro* descritos nas etapas posteriores.

ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE O LAPACHOL E EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS USANDO CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

LIRA AAM², BASÍLIO IDJ¹, SANTOS BLL², SANTANA DP² AND MACEDO RO¹.

¹Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Unidade de desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (UDEM)– Campus I – João Pessoa – PB – Brasil – CEP: 58059-900.

²Universidade Federal da Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Desenvolvimento farmacêutico e Cosméticos - NUDFAC, Recife PE, CEP 50740-521.

Abstract

Differential Scanning Calorimetry (DSC) study was used as an important and complementary tool during the preformulation to determine the compatibility drug-excipients of lapachol with the purpose of develop a lapachol gel-cream formulation. The DSC curves of the lapachol drug, lapachol gel-cream formulations, placebos, excipients and binary mixtures were obtained and the results showed that lapachol presented only an incompatibility in the binary mixtures lapachol-cetostearyl alcohol that could influence the stability of the product. The formulations 1 and 2 showed endotherms processes in the temperatures 117,57°C and 126,94°C corresponding probably to the lapachol fusion. This change toward lower temperatures characterizes a decreasing the formulations stability.

Resumo

O estudo de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi usado como uma importante e complementar ferramenta durante a pré-formulação para determinar a compatibilidade droga-excipientes do lapachol, com o propósito de desenvolver uma formulação gel-creme do lapachol. As curvas de DSC do lapachol, formulações gel-creme, placebos, excipientes e misturas binárias foram obtidas e os resultados mostraram apenas uma incompatibilidade na mistura binária lapachol-álcool cetosteárilico que poderia influenciar na estabilidade do produto. As formulações 1 e 2 mostraram processos endotérmicos nas temperaturas 117,57°C e 126,94°C, respectivamente, correspondendo provavelmente a fusão do lapachol. Este deslocamento para temperaturas inferiores caracteriza uma diminuição da estabilidade das formulações.

Keywords: Lapachol, DSC-Photovisual, Thermal analysis

Palavras-Chaves: Lapachol, DSC – fotovisual, análise térmica

Introdução

O desenvolvimento de formulações farmacêuticas requer prévio conhecimento das propriedades físico-químicas da droga, excipientes e uma instrumentação analítica com execução e obtenção rápida de resultados. A análise térmica é usada na indústria farmacêutica como uma técnica rápida e tem sido preconizada para o controle de qualidade

e desenvolvimento de novos medicamentos, sendo a caracterização térmica dos excipientes e formulações, o primeiro parâmetro no estudo de estabilidade [1-3]. Usando Calorimetria Exploratória Diferencial é possível obter dados significativos em curto período de tempo e embora não substitua o programa de estabilidade clássico, pode promover um alerta a problemas de compatibilidade, especialmente quando combinados com ensaios quantitativos [4-7];

Emulgéis, preparações relativamente novas, são sistemas óleo-água, contendo uma goma como espessante da fase aquosa externa e podem ser constituídas de uma preparação geleificada na qual incorpora-se um agente emulsificante ou um emulsificante em conjunto com uma fase oleosa que pode ser um óleo mineral ou vegetal [8-9]. O uso de um espessante aumenta a viscosidade da fase contínua, reduzindo a frequência de colisão e a coalescência das gotas, aumentando, assim, a estabilidade da preparação. O carbopol é um espessante bastante utilizado nestes tipos de formulações, que possui em sua estrutura uma pequena porção lipofílica em adição a uma grande porção hidrofílica funcionando como emulsificantes óleo em água. A parte lipofílica deste polímero se localiza na interface óleo-água e a porção hidrofílica entumece em presença de água formando o gel que envolve as gotículas de óleo [9]. Com isto, foram obtidas formulações com maior estabilidade e que não necessitam de grande quantidade de fase oleosa para obter boa viscosidade.

O objetivo deste estudo foi a utilização da técnica calorimétrica (DSC) na determinação de compatibilidade entre droga-excipiente do lapachol com a finalidade de desenvolver uma formulação tópica do tipo gel-creme.

Materiais e Métodos

As concentrações dos excipientes utilizados nas formulações foram:

Formulação 1

lapachol 0.5%, metilparabeno 0.15%, álcool cetosteárilico 6%, álcool cetosteárilico etoxilado 3%, propilparabeno 0.05%, glicerina 6%, etanol 14%, óleo mineral 5%, EDTA 0.1%, carbopol ultrex 0.3%, trietanolamina 1%, oleato de isodecila 5%.

Formulação 2

lapachol 0.5%, metilparabeno 0.15%, monoestearato de glicerila 8%, álcool cetosteárilico etoxilado 3%, propilparabeno 0.05%, glicerina 6%, etanol 14%, óleo mineral 5%, EDTA 0.1%, carbopol ultrex 0.3%, trietanolamina 1%, oleato de isodecila 5%.

O lapachol foi doado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE. Propilparabeno, metilparabeno, EDTA e oleato de isodecila foram obtidos da Henrifarma, a trietanolamina da Merck, o etanol da Quimis, monoestearato de glicerila da CRODA e os demais excipientes da Galena.

Estudo Calorimétrico

As misturas binárias e excipientes sólidos foram preparados nas mesmas proporções da formulação. As misturas binárias do lapachol e excipientes líquidos foram preparados nas proporções 1:1. As curvas de DSC do lapachol, formulações, e excipientes foram obtidos em um calorímetro Shimadzu, modelo DSC-50, acoplado a sistema fotovisual, consistindo de um microscópio Olympus conectado a uma câmera Sanyo, modelo VCC-D520, sob fluxo de nitrogênio de 50mL/min e velocidade de aquecimento de 10°C/min até 400°C. As temperaturas de transição foram registradas num gráfico de velocidade de aquecimento x tempo (30 - 400°C) e o pico de temperatura (Tp) de transição de fase foi determinado na

curva de DSC com software da Shimadzu. As amostras (2,00mg) foram pesadas e colocadas em placas de alumínio. As imagens foram capturadas por meio de DSC acoplado a sistema fotovisual sob condições similares ao DSC convencional. Os instrumentos foram calibrados utilizando os pontos de fusão dos padrões índio ($156,6^{\circ}\text{C} \pm 0,3$) e zinco ($419^{\circ}\text{C} \pm 0,3$).

Resultados

As curvas de DSC convencional e fotovisual do lapachol estão apresentadas na figura 1 (a) e (b) onde é possível observar um processo endotérmico característico de fusão a uma temperatura de $140,91^{\circ}\text{C}$, que reflete os dados mencionados na literatura. O DSC fotovisual mostra um processo de fusão a uma temperatura de 140°C (figura 1-b), o que confirma os dados obtidos no DSC convencional.

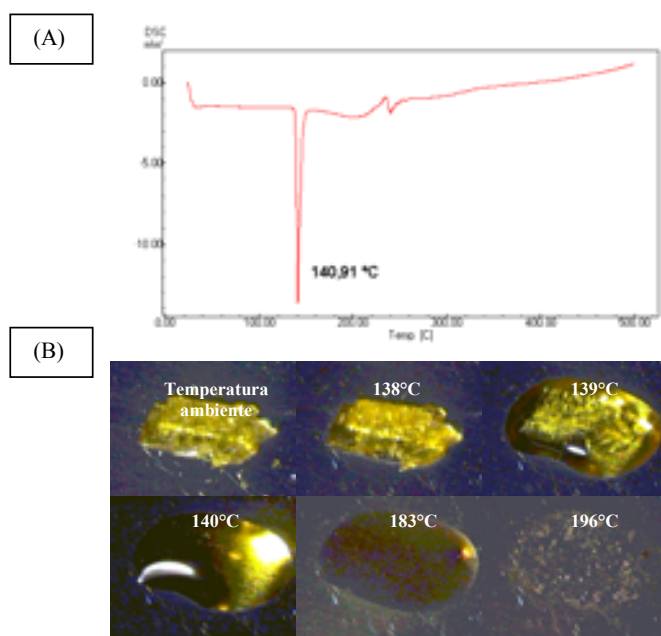


Figura 1 – DSC convencional do lapachol, apresentando um processo endotérmico característico de fusão a $140,91^{\circ}\text{C}$ (A) e DSC fotovisual onde é visualizado o processo de fusão seguido de degradação (B).

As curvas de DSC das misturas binárias e dos excipientes sólidos isolados estão apresentadas na Figura 2 (a) e (b). Observou-se compatibilidade do lapachol com a maioria dos excipientes, com exceção do metilparabeno, onde foi observado um deslocamento para temperaturas inferiores do processo endotérmico de fusão do lapachol. Nas curvas DSC das misturas binárias lapachol-álcool cetosteárico e lapachol-monoesteárico de glicerila não foi possível uma nítida visualização do processo de fusão característico do lapachol. Este fato deve-se à alta proporção destes excipiente em relação a droga.

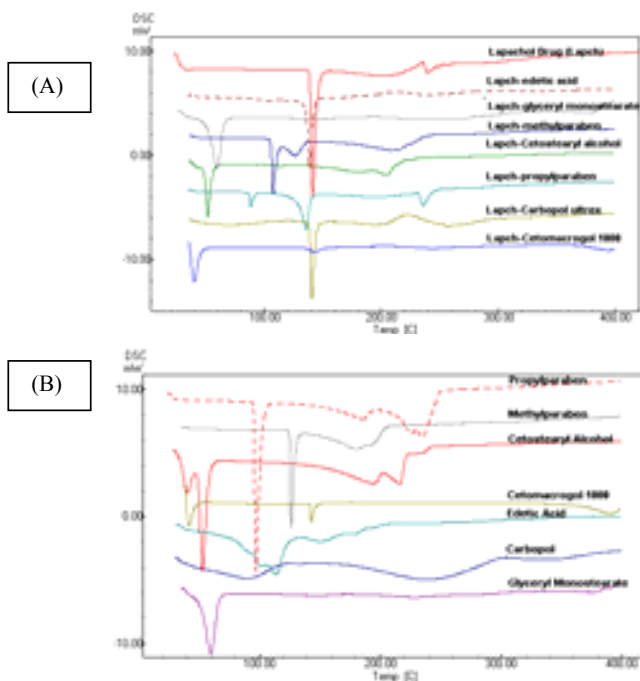


Figura 2 – Curvas de DSC das misturas binárias dos excipientes sólidos (A) e excipientes sólidos isolados (B)

Desta forma, foram realizados o DSC das misturas binárias álcool cetosteárilico-lapachol e monoestearato de glicerila-lapachol, nas proporções 1:1, onde se observou que nestas proporções, o lapachol interagiu com ambos os emulsificantes (Figuras 3 e 4), embora a interação com o álcool cetosteárilico tenha sido um pouco mais acentuada. Comparando as curvas de DSC destas misturas nas concentrações da formulação e na proporção 1:1, foi visto que nas concentrações das formulações, o lapachol tem uma maior interação com o álcool cetosteárilico devido a um maior deslocamento do ponto de fusão desta droga (Figura 3). Já, com o monoestearato de glicerila, não é verificada interação nestas proporções (Figura 4).

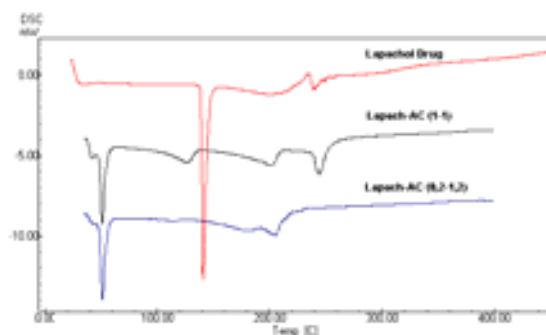


Figura 3 – Curvas de DSC do lapachol, excipiente álcool cetoestearílico e mistura binária lapachol-álcool cetoestearílico.

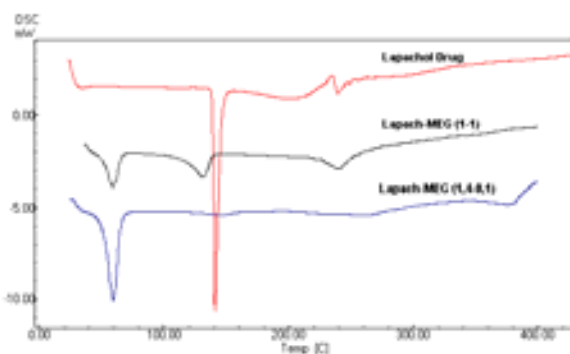


Figura 4 – Curvas de DSC do lapachol, excipiente monoestearato de glicerila e mistura binária lapachol- monoestearato de glicerila.

O lapachol apresentou também compatibilidade com todos os excipientes líquidos estudados, assim como está apresentado na Figura 5 (a) e (b).

O DSC acoplado a sistema fotovisual confirmou todos os dados obtidos com o DSC convencional, com exceção da mistura binária lapachol : metilparabeno, onde o sistema fotovisual não confirmou a incompatibilidade apresentada anteriormente. (Figura 6)

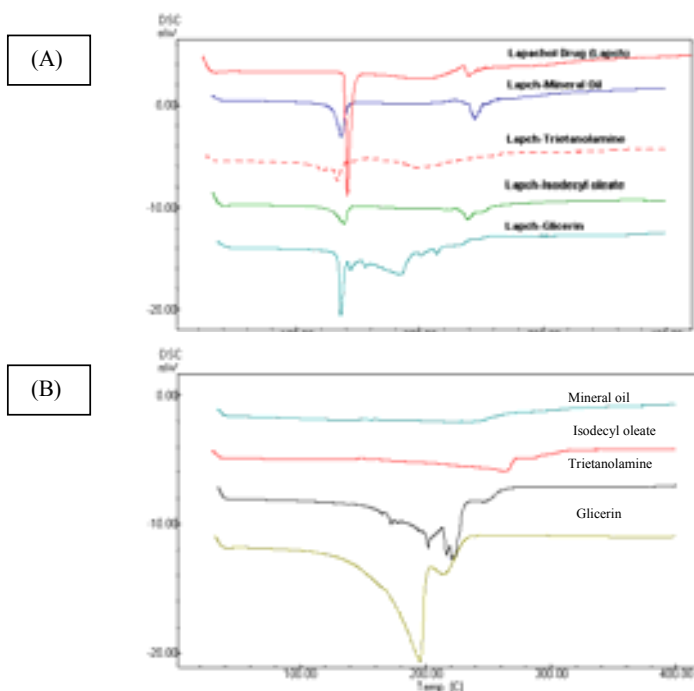


Figura 5 – Curvas de DSC das misturas binárias dos excipientes líquidos (A) e excipientes líquidos isolados (B)

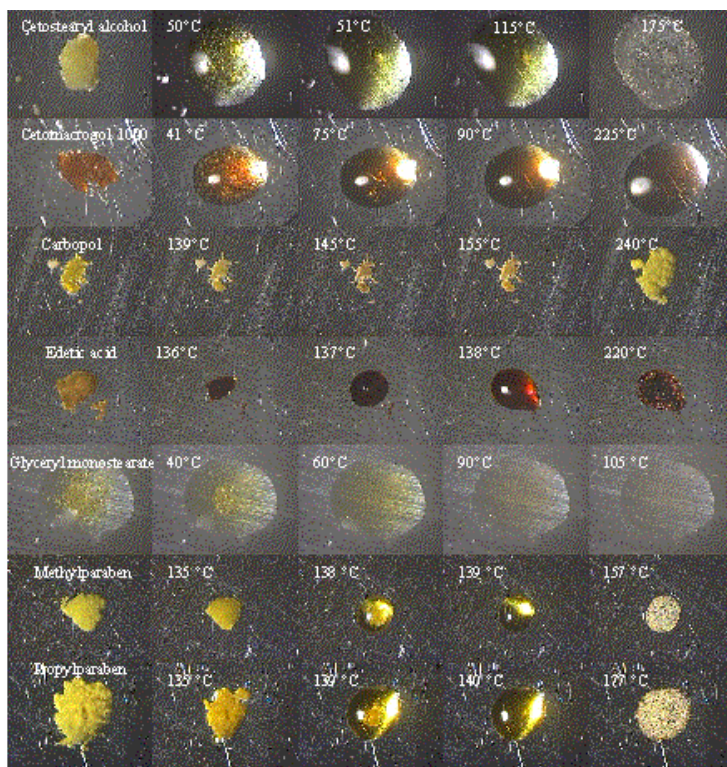


Figura 6 – DSC fotovisual das misturas binárias lapachol/excipientes, mostrando o processo de fusão e degradação característico destes.

Os resultados da Figura 6 mostraram também um processo de incompatibilidade do lapachol com o álcool cetosteárilico, onde o processo de fusão do lapachol ocorre na temperatura de 115°C, com um deslocamento bastante significativo. Para os excipientes cetomacrogol e monoestearato de glicerila, observa-se que a fusão destes ocorreu anteriormente ao lapachol, mascarando sua fusão e dando lugar provavelmente a um processo de solubilização.

Já para os excipientes líquidos, DSC fotovisual não detectou nenhuma incompatibilidade, confirmando os resultados do DSC convencional, assim como mostrado na Figura 7.

DSC também foi utilizado para caracterizar as preparações 1 e 2, onde foram também avaliados os placebos das referidas formulações, a nível de comparação. Observou-se que o DSC das preparações apresentaram um processo próximo a fusão do lapachol, como mostra a Figura 8, que apresenta uma endoterma nas formulações que não são verificadas nos placebos. Assim, houve um deslocamento da fusão do lapachol em ambas as formulações, tendo a formulação 1 um deslocamento maior que a formulação 2.

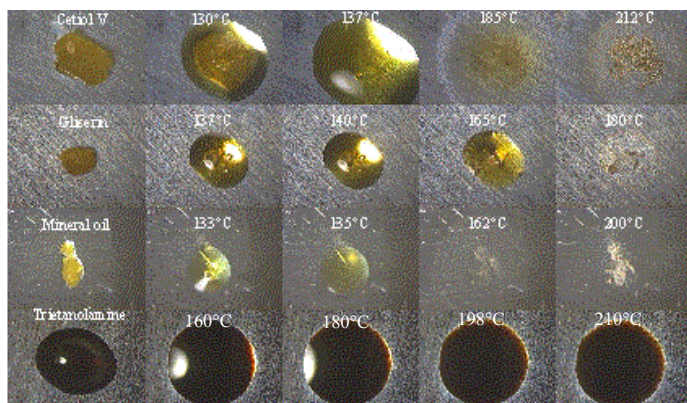


Figura 7 – DSC fotovisual das misturas binárias dos excipientes líquidos: lapachol nas proporções 1:1.

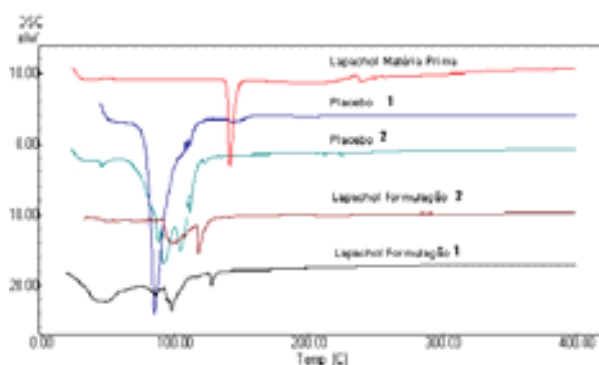


Figura 8 – Curvas de DSC do lapachol, das duas formulações e seus respectivos placebos.

Discussão

Lapachol apresentou compatibilidade com a maioria dos excipientes, todos confirmados por DSC fotovisual, com exceção da mistura binária lapachol : metilparabeno. Verificou-se uma interação do lapachol com o metilparabeno na análise de DSC convencional mas esta interação não foi visualizada no DSC fotovisual. Como DSC fotovisual é um método mais sensível que o convencional pode-se dizer que não há incompatibilidade entre lapachol e metilparabeno .

Os resultados também mostraram um processo de incompatibilidade do lapachol com o álcool cetosteárico, onde o processo de fusão do lapachol ocorre na temperatura de 115°C. Este excipiente presente na formulação 1 mas ausente na 2, pode interferir na estabilidade do produto final, o que é verificado quando analisou-se as formulações e placebos por DSC convencional.

A formulação 1 apresentou a endoterma característica da fusão do lapachol na temperatura de 117,57° C, ou seja, com um deslocamento bastante significativo em relação a fusão do lapachol. Já a formulação 2 apresentou um deslocamento menor que a formulação 2, sendo

a fusão observada a 126,94° C. Isto poderia ser um indicativo de que a segunda formulação teria uma maior estabilidade que a primeira levando em consideração apenas os resultados observados. Este deslocamento maior observado na formulação 1 pode ser devido à interação do álcool cetosteárilico com o lapachol na formulação.

Conclusão

Pode-se concluir que embora tenha se verificado algumas incompatibilidades dos excipientes com o lapachol, estas ainda não foram significativas a ponto de alterar a estabilidade das preparações. O DSC convencional para as preparações e placebos mostraram-se semelhantes com exceção da presença de uma endoterma característica de processo de fusão do lapachol em temperaturas inferiores a fusão deste. A formulação 1 apresentou maior deslocamento que a 2, acrescentando o fato que um dos excipientes presentes, interagiu com o lapachol. Este fato pode alterar a estabilidade das preparações que serão submetidas a um estudo de estabilidade para confirmação dos dados obtidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES, LAFEPE pelo suporte financeiro.

Referencias

- [1] Macêdo, R.O. Controle de Qualidade de Formas Farmacêuticas Sólidas Através de Dados Termogravimétricos, tese do concurso de Prof. Titular apresentado no DCF/CCS/UFPB, João Pessoa – Paraíba –Brasil, 1996
- [2] Macêdo, R.O.; Nascimento, T.G. Quality Control of Thiabendazole pre-formulation and Tablet by TG and DSC Coupled to the Photovisual System. *Thermochimica Acta* 6977, 1-8, 2002.
- [3] Macêdo, R.O.; Nascimento, T.G. (2001), Thermal characterization of lapachol by means of TG and DSC coupled to a photovisual system, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* , 64 (2): 751-756.
- [4] Shaw, N.O.; de Villiers, M.M.; Lotter, A.P. Preformulation Stability Screening of Ivermectin with Non-ionic Emulsion Excipients. *Pharmazie*, 54, 5, 372-376, 1999.
- [5] Carstensen, J.T.: *Drug Stability*. Marcel Dekker, New York, 1995.
- [6] Van Dooren, A.A.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 9, 43, 1983.
- [7] Wells, J.I.: *Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances*. Ellis Horwood, Chichester, UK, 1988.
- [8] GOOGRICH, B. F. Carbopol – High performance polymers for pharmaceuticals. *Bulletin* 14: 24, 1997.

[9] MARQUARDT, D.; SUCKER, H. Oil-in-water-emulsions gels: determination and mathematical treatment of flow properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 46, p. 115-124, 1997.

Optimização de Formulações Tópicas de Lapachol Utilizando Ensaio de Difusão *In Vitro* Através de Células de Franz

Ana Amélia M. Lira¹; Gláucia G. Figueiredo¹; Bruno Leonardo L. Santos¹; Leila B. Leal Silva¹; Miracy M. Albuquerque²; Davi P. Santana^{1*}

¹NUDFAC-Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

²NCQMC-Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

RESUMO

O lapachol, substância extraída de várias espécies de árvores da família Bignoniaceae que apresenta várias atividades farmacológicas, dentre elas: antimalárica, antitumoral, antimicrobiana, antiviral, analgésica e antiinflamatória, sendo estas últimas sistêmica e tópica. O objetivo do presente estudo foi desenvolver uma forma farmacêutica tópica com este princípio ativo, visando sua ação antiinflamatória e analgésica tópica. Desta forma, foram avaliadas algumas características físico-químicas do lapachol que tornaram viável o estudo e assim a droga foi então incorporada em duas bases do tipo emulgel e uma base gel em concentrações diferentes. Os perfis de liberação foram avaliados e otimizados através de um estudo de permeação utilizando células de Franz. Foi confirmado assim a capacidade permeante do fármaco nas preparações estudadas, sendo observado que a base emulgel tipo 2 apresentou permeação superior a primeira em todas as concentrações estudadas, o que pode ser explicado por uma menor solubilidade do fármaco nesta preparação. Assim a base tipo 2 foi comparada ao gel através de um ensaio de permeação utilizando pele de orelha de porco onde foi visto que a permeação do fármaco foi superior no gel. Também foi realizado um estudo de retenção cutânea onde o lapachol mostrou-se viável como fármaco para uso tópico.

Palavras-chaves: lapachol, permeação *in vitro*, emulgel, gel

*Corresponding Author: Davi P. Santana, NUDFAC - Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Av. Professor Arthur de Sá s/n, Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil, CEP: 50740-520, Tel. (081) 3271 8511, Fax: (081) 3272 2284, Email: d-santana@bol.com.br.

INTRODUÇÃO

A administração tópica representa uma via alternativa da administração oral e intravenosa de ativos medicamentosos e oferece muitas vantagens como a ausência de efeito de primeira passagem, liberação contínua da droga, diminuição dos efeitos colaterais e melhor aceitação do paciente.^{1,2} A habilidade de um fármaco presente em formulações tópicas permear a pele depende da capacidade de libertação da droga deste veículo para a pele, e da difusão por esta barreira para seu sítio de ação. São poucos os compostos de interesse terapêutico que possuem propriedades físico-químicas adequadas para penetrarem rapidamente a epiderme viável e principalmente o estrato córneo constituído por células ricas em queratina envolvidas em múltiplas camadas lipídicas que representam a principal barreira à permeação.^{3,4} Assim, a penetração insuficiente de drogas na pele freqüentemente limita o uso de formulações aplicadas topicamente.

Já é bem conhecido que o processo de permeação na pele obedece à primeira lei de Fick:⁵

$$J = \frac{C_v \cdot D \cdot C_{s,m}}{C_{s,v} \cdot L}$$

Onde J é a velocidade de permeação da droga através da barreira, C_v é a concentração de droga dissolvida no veículo, $C_{s,v}$ e $C_{s,m}$ são a solubilidade da droga no veículo e na barreira, respectivamente, D é o coeficiente de difusão e L a espessura da membrana. Assim, J é diretamente proporcional à razão $C_v/C_{s,v}$ que representa o grau de saturação da droga na formulação relacionada ao aumento da atividade termodinâmica do sistema sendo independente da concentração necessária para alcançar este grau de saturação.⁶

Então, a equação 1 prediz que a velocidade de permeação de uma droga em dois veículos diferentes saturados que não alteram a função barreira da pele, são idênticas e independentes da quantidade total de droga dissolvida. Assim dois veículos nos quais a droga está presente na concentração de saturação, apresentariam a mesma velocidade de permeação independente da solubilidade do fármaco no veículo mesmo que um deles apresentasse concentração de saturação muito mais elevada que o outro.⁶

Vários artifícios têm sido empregados objetivando reduzir a propriedade de barreira da pele e promover a penetração transdérmica do fármaco.⁷ Muitas drogas se encontram na forma de eletrólitos fortes a moderadamente fracos de modo a proporcionarem um equilíbrio de espécies ionizadas e não ionizadas. Estas espécies afetam diretamente a penetração sendo a forma não ionizada a que possui melhor permeabilidade embora estudos têm demonstrado

que um aumento na solubilização do fármaco através da sua ionização pode proporcionar um aumento da penetração e do fluxo do fármaco.^{8,9,10}

O lapachol [2-hidróxido-3-(3-metil-2-butenil)-1,4] é uma naftoquinona que possui atividade antiviral, antimicrobiana, antiinflamatória e principalmente anticancerígena. Nos estudos clínicos descritos na literatura, seja utilizando pacientes portadores de cervicites e cérvico-vaginites crônicas¹¹ ou utilizando pacientes portadores de bursite¹², otite¹³, tendinite¹⁴ e sinusite¹⁵ a atividade antiinflamatória da droga é comprovada.

Neste mesmo contexto, alguns estudos preliminares de desenvolvimento galênico e difusão *in vitro* do lapachol incorporados em formas farmacêuticas geleificadas demonstrou a viabilidade da incorporação do lapachol em formas tópicas.^{16,17}

Assim, baseado nos relatos anteriores e considerando a via cutânea como alternativa e muitas vezes como complemento de outras vias de administração o objetivo deste trabalho trata-se do desenvolvimento farmacotécnico do lapachol tópico utilizando uma abordagem racional através de ensaios de permeação *in vitro e ex vivo* assim como ensaios de retenção cutânea.

MATERIAIS E MÉTODOS

O lapachol foi obtido do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE. Os solventes empregados foram glicerina p.a., Ácido Acético e Metanol, todos obtidos da Merck®. Propilparabeno, metilparabeno, EDTA e oleato de isodecila foram obtidos da Henrifarma, a trietanolamina da Merck, álcool etílico p.a. da Quimis, monoestearato de glicerila da CRODA e os demais excipientes da Galena.

As membranas artificiais utilizadas nos ensaios de difusão *in vitro* foram de natureza celulósica com poros de 0,44µm da M&S. Para o ensaio de difusão *ex vivo* e retenção cutânea foi utilizada pele de orelha de porco obtida em matadouros locais e preparadas para o experimento.

Determinação da solubilidade em solução tampão de fosfatos pH 7,0 – A solubilidade foi determinada por agitação de excesso da droga durante 16 horas (overnight), seguido de doseamento por CLAE.

Determinação do Coeficiente de Partição octanol/tampão de fosfatos pH 7,0

Foi obtido por partição de uma concentração conhecida de lapachol em solução tampão contra igual volume de octanol através de agitação por 16 horas (overnight) seguido de quantificação da fase aquosa. O Coeficiente de partição foi determinado pela fórmula:

$$K_{o/t} = \frac{C1 - C2}{C2}, \text{ onde:}$$

C1= concentração do lapachol antes da partição

C2 = concentração do lapachol depois da partição

Preparação das formas farmacêuticas tópicas

As formulações usadas neste estudo foram duas bases do tipo emulgel (1-5) e uma do tipo gel (6), onde o lapachol foi incorporado em diferentes concentrações como apresentado na tabela I:

Tabela I – Composição das diferentes formulações utilizadas variando as concentrações de lapachol e emulsificantes utilizados.

Constituintes	Formulações					
	1	2	3	4	5	6
Lapachol	0,4%	0,3%	0,4%	0,3%	0,3%	0,5%
Álcool cetosteárilico	6%	6%	-	-	-	-
Álcool cetosteárilico etoxilado	3%	3%	3%	3%	2%	-
Monoestearato de glicerila	-	-	8%	8%	7,00%	-
Carbopol ultrex	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,5%
Metiparabeno	0,15%	0,15%	0,15%	0,15%	0,15%	-
Propilparabeno	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	-
EDTA	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	-
Óleo mineral	5%	5%	5%	5%	5%	-
Tween 80	-	-	-	-	-	0,025%
Oleato de isodecila	5%	5%	5%	5%	5%	-
Trietanolamina	pH 8,0	pH 8,0	pH 8,0	pH 8,0	pH 8,0	pH 8,0
Etanol	14%	14%	14%	14%	14%	28%
Glicerina	6%	6%	6%	6%	6%	12%
Água q.s.p.	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Preparação dos emulgéis

O carbopol foi previamente disperso em água, em seguida foram adicionados todos os excipientes hidrossolúveis. Preparou-se a fase oleosa e aqueceu-se as duas fases até aproximadamente 70° C. Verteu-se a fase oleosa sobre a aquosa, neutralizou-se a

preparação utilizando trietanolamina e incorporou-se o lapachol em solução de glicerina: etanol, agitando até resfriamento.

Preparação do gel

O carbopol foi previamente disperso em água, em seguida, neutralizou-se com trietanolamina e adicionou-se o tween[®] 80. O lapachol foi incorporado em solução de glicerina: etanol e agitado até homogeneização.

Estudos de penetração *in vitro* e *ex vivo*

O estudo foi realizado utilizando seis células de Franz interligadas a um banho termostático estabilizado a 37° C e dispostas nos respectivos pontos de uma placa magnética, promovendo agitação constante do meio receptor. O volume e a área difusional do compartimento doador correspondiam a aproximadamente 1,5mL e 1,15 cm² respectivamente, e o volume do compartimento receptor correspondia a aproximadamente 5,5mL. Uma quantidade de 110mg, exatamente pesada, das preparações foi colocada no compartimento doador e o meio receptor utilizado foi o tampão fosfato pH 7,0. Em intervalos de tempos pré-determinados, coletou-se todo o líquido receptor, reabastecendo o volume total retirado imediatamente com o próprio líquido na mesma temperatura. No estudo *in vitro*, membranas sintéticas foram utilizadas, sofrendo hidratação na própria solução tampão por 24 horas antes da montagem nas células de difusão. Para o estudo *ex vivo*, foram utilizadas orelhas de porco, onde a espessura total da pele foi removida da cartilagem e a gordura do tecido subcutâneo removida também. Discos da pele intacta de diâmetro de aproximadamente 3cm foram estocados a -20°C até o uso, por período não excedendo a seis semanas.¹⁸ A pele removida foi posta nas células de difusão tipo Franz com a derme em contato com o compartimento receptor.¹⁹ As amostras coletadas foram filtradas e as concentrações de lapachol foram determinadas por HPLC. Todas as formulações estudadas foram testadas por este método, para posteriormente servir como parâmetro para definição da melhor preparação.

Ensaio de Retenção Cutânea

Para realizar o estudo de retenção cutânea utilizou-se a metodologia adaptada de De Rosa et al. (2003), onde, após 24 horas do ensaio *ex vivo* descrito acima, a pele foi limpa com algodão embebido com solução tampão de fosfatos pH 7,0 e seca com papel absorvente. As camadas de estrato córneo foram removidas pelo método do Tape stripping utilizando fita adesiva Scotch® (3M).²⁰ Aproximadamente 10 fitas foram necessárias para remover o extrato córneo das amostras da pele. Um volume de 10mL de metanol foi adicionado às fitas adesivas, deixados em overnight, agitados por 1 minuto e então filtrados.

O tecido restante foi pesado, homogeneizado com 5 mL de metanol por 1 minuto, sonificado por 30 minutos, centrifugado e filtrado. A quantidade da droga no filtrado foi analisada por HPLC.

Análise por HPLC

Todas as concentrações foram determinadas por HPLC, modelo HP 1100 com detector UV ($\lambda = 278$) e uma coluna RP-18, 250 x 4mm, da Shimadzu®. A fase móvel foi metanol: ácido acético 5% (80:20), o fluxo utilizado foi de 1mL/min e o volume de injeção foi de 20 μ L.²¹

RESULTADOS

Os resultados da análise do coeficiente de partição estão apresentados na **Tabela II**.

Tabela II: Coeficiente de partição, tampão de fosfatos pH 7,0/ octanol, do lapachol na proporção 1:1 (octanol/tampão) a temperatura ambiente e solubilidade em solução tampão a temperatura ambiente e 37°C

C1 (μ g/mL)	C2 (μ g/mL)	K C. de Partição	Log K	Solubilidade (μ g/mL)	Solubilidade (μ g/mL)
49,98	0,18	276,7	2,44	59,80*	100,13**

* Temperatura Ambiente

** 37° C

As formulações utilizadas no estudo de permeação utilizando membranas sintéticas estão apresentadas na **Tabela III**, onde pode ser visualizado a quantidade permeada após 6 horas

de cinética e o fluxo (J) de liberação do lapachol a partir destas preparações. Os resultados de liberação *in vitro* destas preparações estão apresentados nas **figuras 1 e 2** onde observou-se que as preparações 3 e 5 apresentaram perfis de liberação semelhantes, mesmo a primeira apresentando quantidade maior de lapachol, 0,4%, em comparação com a segunda, 0,3%.

As preparações 1 e 4 apresentaram também, perfis de liberação semelhantes apesar de possuírem bases diferentes e concentrações de lapachol diferentes.

Comparou-se também o perfil cinético das formulações 4 e 5, estas muito semelhantes qualitativamente, mas que apresentaram quantidades de tensoativos diferentes. Foi visto que a formulação 5 liberou melhor que a 4.

Tabela III – Fluxo das diferentes formulações utilizadas no ensaio *in vitro* utilizando membrana sintética (n = 3, média ± DP).

Formulações	Quantidade Permeada	Fluxo J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$)
1	87.38 ± 13	12.809 ± 2
2	60.99 ± 8	8.977 ± 1,5
3	105.80 ± 8	15.691 ± 1
4	87.49 ± 14	12.68 ± 2
5	105.88 ± 10	15.51 ± 4

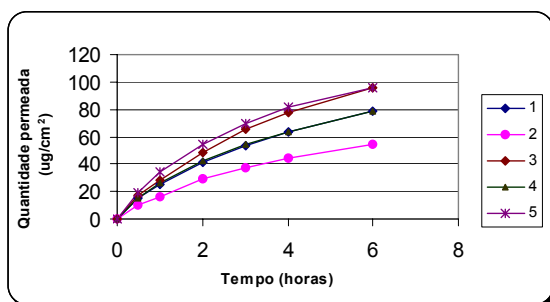


Figure 1 – Liberação *in vitro* de lapachol (μg) a partir das diferentes formulações testadas.

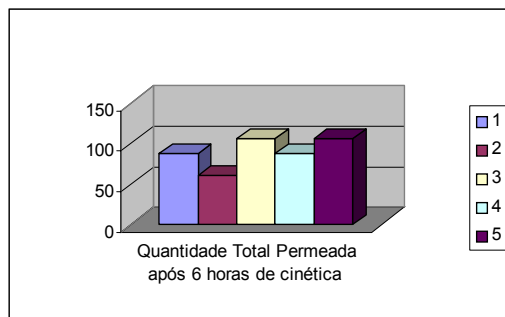


Figure 2 – Quantidade liberada após 6 horas de cinética *in vitro* de lapachol (µg) a partir das formulações testadas.

As formulações testadas no estudo de permeação através de pele estão apresentadas na **Tabela IV**, onde se observa a quantidade permeada após 24 horas de cinética e o fluxo (J) de liberação do lapachol. Os resultados de liberação *in vitro* destas preparações estão apresentados na **figura 3** onde se observou que a preparação gel apresentou liberação bastante superior ao gel-creme (também visualizado na **Tabela III**).

Tabela IV – Fluxo das diferentes formulações utilizadas no ensaio *in vitro* utilizando pele de orelha de porco (n = 3, média ± DP).

Formulações	Quantidade Permeada	Fluxo J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$)
5	3.4 ± 1	$0,14 \pm 0,1$
6	29.02 ± 1	$1,28 \pm 0,1$

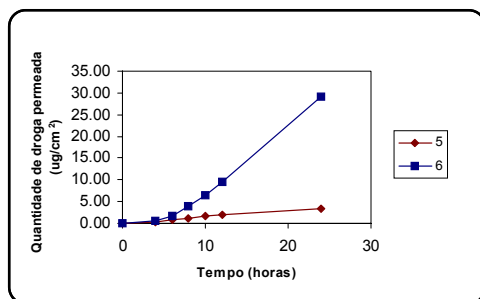


Figure 3 – Liberação *in vitro* de lapachol (µg) a partir das diferentes formulações testadas.

No ensaio de retenção cutânea, observou-se a afinidade do lapachol pela pele, tendo ocorrido uma retenção do lapachol na epiderme nas duas formulações (**Figura 4**).

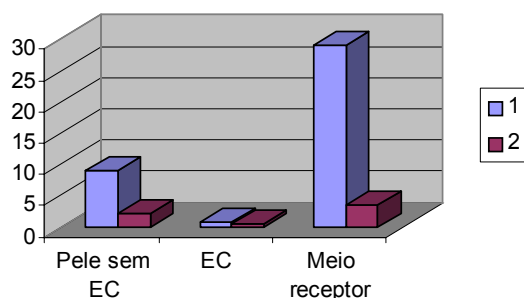


Figure 4 – Ensaio de retenção nas camadas da pele e a permeação cutânea após 24 horas de estudo em células de Franz utilizando orelha de porco (* Estrato córneo).

DISCUSSÃO

Dentre os vários fatores que podem influenciar a penetração cutânea das drogas, o pH e a solubilidade da droga no veículo, bem como a viscosidade da preparação são fatores importantes a considerar. O pH manifesta sua ação devido a presença de formas ionizadas e moleculares, em proporções variáveis, segundo o pKa do fármaco, e estas formas, em geral, apresentam comportamento de penetração diferentes.²² Assim, foi observado em estudo anterior no nosso laboratório que preparações gelificadas com pH 8,0 apresentaram perfis de liberação muito superiores ao pH 7,0 e 5,0. Desta forma todas as preparações utilizadas no ensaio *in vitro* possuíam pH 8,0.²³

Nos nossos resultados, observou-se que as preparações 3 e 5, cujas bases são as mesmas, apresentaram perfis de liberação semelhantes entre si, embora possuam concentrações diferentes de lapachol. Já as preparações 1 e 4, também contendo concentrações diferentes de lapachol, porém com bases diferentes, também apresentaram perfis de liberação semelhantes entre si. Pode-se obter uma explicação para o fato, observando as características das bases emulsificantes de cada uma das preparações. Desta forma observou-se que as bases constituídas por monoestearato de glicerila, liberam melhor o fármaco que aquelas que utilizam álcool cetosteárilico.

Quando comparou-se o perfil cinético, empregando-se membranas artificiais as formulações 4 e 5, de mesma base emulsificante, mas que apresentavam quantidades de tensoativos diferentes, verificou-se que a formulação 5 liberou melhor que a 4. Isto pode ser explicado por uma afinidade, e conseqüentemente retenção, do lapachol pelos tensoativos presentes na preparação, já que a formulação 4 possui quantidade de tensoativos maior que a 5.

No estudo de permeação através de pele observou-se que a preparação gel apresentou liberação bastante superior ao emulgel. O que reforçaria uma maior afinidade do fármaco pelas preparações emulsificadas, ocasionando sua retenção.

Assim pode-se concluir que o estudo de difusão *in vitro* do lapachol sobre Células de Franz, mostrou que o princípio ativo apresenta difusibilidade através tanto da membrana artificial como da pele animal.. Todavia os melhores perfis, no ensaio *in vitro* com membrana artificial, foram vistos nas preparações 5 e 3. Como esta última preparação apresentou após observação microscópica, presença de cristais de lapachol decorrentes de processo de supersaturação, esta não foi selecionada para a etapa de permeação utilizando a pele como barreira. Nestes ensaios, o lapachol apresentou uma difusibilidade melhor no gel. O fármaco apresentou também nesta preparação, uma boa retenção cutânea, o que torna viável sua utilização em formas farmacêuticas de aplicação tópica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao LAFEPE, CAPES e MCT/CNPQ pelo suporte financeiro.

REFERENCIAS

1. GUY, R.H.; HADGRAFT, J. Transdermal drug delivery: the ground rules are emerging. *Pharm. Int.*, v. 6, p.112-116, 1985.
2. GWAK, H.S.; CHUN, I.K. Effects of vehicles and penetration enhancers on the *in vitro* percutaneous absorption of tenoxican through hairless mouse skin. *International Journal of pharmaceutics*, v.236, p. 57-64, 2002.
3. YOKOMIZO, Y. Effects of phosphatidylcholine on the percutaneous penetration of drugs the dorsal skin of guinea pigs *in vitro*; and analysis of the molecular

- mechanism, using attenuated total reflectance-fourier transform infrared (ATF-FTIR) spectroscopy. . Journal of Controlled Release, v.42, p. 249-262, 1996.
4. SHOKRI, J.; NOKHODCHI, A.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; JALALI, M. B. et al. The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. International Journal of Pharmaceutics, v. 228, p. 99-107, 2001.
 5. BARRY, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. Journal of Controlled Release, v.6, p. 85-97, 1987.
 6. MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. Eur. J. Pharm. Biopharm. v. 52, n.2, p. 103-112, 2001.
 7. CHIEN, Y. W. Novel drug delivery systems. New york, Marcel dekker, v. 50, 797p, 1992.
 8. ZATZ, J.L. Fundamental of transdermal controlled drug administration: physicochemical considerations. Drug Development and Industrial Pharmacy, v.9 (4), p. 561-577, 1983.
 9. SWARBRICK, J.; LEE, G.; BROM, J.; GENSMANTEL, N.P. Drug permeation through human skin II: permeability of ionizable compounds. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 73, n. 10, p. 1352-1355, october, 1984.
 10. GWAK, H.S.; CHUN, I.K. Effects of vehicles and penetration enhancers on the *in vitro* percutaneous absorption of tenoxicam through hairless mouse skin. International Journal of pharmaceutics, v.236, p. 57-64, 2002.
 11. WANICK, M. C.; BANDEIRA, J. A. ; FERNANDES, R. V. – Ação antiinflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico do Líber do Pau d'arco Roxo (*Tabebuia avellanedae*), em pacientes portadores de Cervicites e Cérvico-vaginites. Rev. inst. Antibióticos, Recife, v.10 (1/2): p.41-46, dez. 1970.
 12. CORREIA, L. C. A.; SILVA, A. A. F. – Primeiros ensaios utilizando o Lapachol em pacientes portadores de bursite na fase aguda. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 10., 1988, São Paulo. Anais do X Simpósio de plantas medicinais do Brasil. São Paulo, setembro, 1988.
 13. CORREIA, L. C. A.; SILVA, A. A. F. – Primeiras observações com o emprego do lapachol em gotas, em pacientes portadoras de otites agudas e crônicas. In:

- Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 10., 1988, São Paulo. Anais do X Simpósio de plantas medicinais do Brasil. São Paulo, setembro, 1988.
14. CORREIA, L. C. A.; SILVA, A. A. F. – Primeiros informes na utilização do Lapachol em pacientes portadores de Tendinite. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 10., 1988, São Paulo. Anais do X Simpósio de plantas medicinais do Brasil. São Paulo, setembro, 1988.
 15. CORREIA, L. C. A.; SILVA, A. A. F. – Primeiras observações utilizando o lapachol em gotas em pacientes portadores de sinusites agudas e crônicas. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 10., 1988, São Paulo. Anais do X Simpósio de plantas medicinais do Brasil. São Paulo, setembro, 1988.
 16. SANTOS, E.R. dos; PRISTA, L.V.N.; LOBO, J.M.S.; SANTOS, D.G. Estudos de difusão cutânea do Lapachol. I – Ensaio *in vitro*. Revista Portuguesa de Farmácia. v. 41, Nº 3, p. 15-19, 1991.
 17. LIRA, A.A.M.; SESTER, E.A.; ABREU, L.R., SILVA, L.B.L., SANTANA, D.P. Desenvolvimento Farmacotécnico do Lapachol Tópico: Ensaio *In Vitro* e *Ex Vivo*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Submitted.
 18. TROTTA, M.; UGAZIO, U.; PEIRA, E.; PULITANO, C. Influence of ion pairing on topical retinoic acid from microemulsions. Journal of Controlled Release. V.86, p.315-321, 2003.
 19. FRANZ, T.J. Percutaneous absorption on relevance of *in vitro* data. J. Invest. Dermatol., v. 64, p. 190, 1975.
 20. DE ROSA, F.S.; TEDESCO, A.C.; LOPEZ, R.F.V.; PIERRE, M.B.R.; LANGE, N.; MARCHETTI, J.M.; ROTTA, J.C.G.; BENTLEY, M.V.L.B. *In vitro* skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. Journal of Controlled Release, v.89, p.261-269, 2003.
 21. FONSÊCA, S.G.; SILVA, L.B.L.; CASTRO, R.S.; SANTANA, D.P. Validação de Metodologia Analítica para Doseamento de Lapachol por CLAE. Revista Química Nova. In Press.
 22. KUSHLA, G.P.; ZATZ, J.L. Influence of pH on lidocaine penetration through human and hairless mouse skin *in vitro*. Int. J. Pharm., v. 71, p. 167-173, 1991.

23. LIRA, A.A.M.; SESTER, E.A.; ABREU, L.R., SILVA, L.B.L., SANTANA, D.P.
Desenvolvimento Farmacotécnico do Lapachol Tópico: Ensaios *In Vitro* e *Ex Vivo*.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Submitted.

CONCLUSÃO

Desenvolvimento farmacotécnico:

- ◆ Todas as preparações apresentaram um bom aspecto macroscópico mas quando observadas microscopicamente foi observada a presença bolhas e em alguns casos, a de cristais de lapachol;
- ◆ A quantidade de lapachol foi diminuída para concentrações menores para evitar a formação de cristais de lapachol. Desta forma obteve-se as preparações P2, P3, P4 e P6 com ausência de cristais de lapachol quando observadas a nível microscópico.
- ◆ As formulações com 40% de sistema solvente etanol:glicerina (70:30), foram as que apresentaram a maior quantidade de bolhas, pois, devido a grande quantidade de solvente incorporado, ocorria uma admissão de ar na preparação. Assim apenas as formulações P3 a P6 foram submetidas as etapas posteriores de permeação *in vitro*;
- ◆ Embora a formulação P5 apresentasse lapachol cristalizado, esta foi submetida ao ensaio de permeação para análise de comportamento de formulação supersaturada;
- ◆ Então ao final do experimento obteve-se quatro preparações do tipo emulgel, onde duas utilizavam uma combinação do álcool cetosteárilico com o álcool cetosteárilico etoxilado como base emulsificante, e as outras, onde o álcool cetosteárilico foi substituído por monoestearato de glicerila, resultando em uma nova base com propriedades diferentes da primeira.

Análise Térmica:

- ◆ No estudo de compatibilidade de excipientes, observou-se que o lapachol apresentou compatibilidade com todos os excipientes líquidos e com a maioria dos excipientes sólidos, apresentando uma interação com o álcool cetosteárilico, onde o processo de fusão do lapachol ocorreu na temperatura de 115°C.
- ◆ O DSC convencional para as preparações e placebos mostraram que a formulação 1, apresentou uma endoterma característica de fusão do lapachol, não verificado no placebo, com um deslocamento bastante significativo. Já a formulação 2 apresentou esta endoterma com um deslocamento menor que a formulação 1. Isto poderia ser um indicativo que a segunda formulação teria uma maior estabilidade que a primeira, levando em consideração apenas os resultados observados.

Estudo de permeação e retenção cutânea:

- ◆ As preparações foram então submetidas a ensaios de permeação utilizando células de Franz, para otimização através dos perfis de liberação onde verificou-se que a melhor liberação foi visualizada nas preparações 3 e 5, cujas bases são as mesmas e os perfis de liberação semelhantes entre si, embora possuam concentrações diferentes de lapachol. Isto pode ser explicado pelo fato da formulação 3 ser constituída por uma maior de fase tensoativa o ocasionaria na retenção deste fármaco;
- ◆ Após observação do aspecto microscópico verificou-se presença de cristais de lapachol na formulação 3, decorrente de processo de supersaturação o que inviabilizou sua utilização nas etapas posteriores;
- ◆ As preparações 1 e 4 apresentaram também perfis de liberação semelhantes apesar de possuírem bases diferentes e concentrações de lapachol diferentes, tendo a segunda menor concentração de lapachol e desta forma demonstrando melhor liberação a partir desta base. Este fato pode ser explicado pela solubilidade menor do lapachol na base contendo monoestearato de glicerila que foi visto na comparação das preparações 3 e 1, que contém quantidades iguais de lapachol mas a 3 apresenta já saturação do veículo.
- ◆ Assim, a preparação 5 foi comparada através de um ensaio de permeação e retenção cutânea, utilizando pele de orelha de porco, com o do gel de lapachol já existente, desenvolvido em nosso laboratório em estudos anteriores. Foi observado no ensaio de permeação que a preparação gel apresentou liberação bastante superior ao emulgel, o que reforçaria a hipótese da afinidade do fármaco pela preparação emulsificada, ocasionando sua retenção.
- ◆ No ensaio de retenção cutânea, o fármaco apresentou também uma boa retenção cutânea, principalmente no gel o que viabilizaria sua retenção como forma farmacêutica de uso tópico.

Perpectivas

- ◆ A continuidade do estudo de estabilidade acelerado e realização de um estudo de estabilidade a longo prazo para determinação do prazo de validade do produto;
- ◆ Realização de ensaios de irritabilidade cutânea e ocular que garantam a segurança na utilização desta preparação nas etapas posteriores;
- ◆ Ensaios clínicos em humanos portadores de traumatismos do tipo entorses e contusões, avaliando do ponto de vista clínico (eficácia e tolerabilidade), o lapachol emulgel administrado por via tópica como antiinflamatório local. Utilizaremos para isso, pacientes do ambulatório de ortopedia e traumatologia do Hospital das Clínicas (protocolo submetido ao comitê de ética);
- ◆ Determinar a eficácia do emulgel a base de lapachol comparando a taxa de cura das lesões inflamatórias locais após administração tópica deste e do medicamento referência, Cataflan emulgel[®] (ensaio clínico, randomizado, duplo-cego);
- ◆ Determinar os possíveis efeitos colaterais do tratamento tópico antiinflamatório, tais como irritação e desconforto;
- ◆ Lançamento no mercado de um novo produto antiinflamatório tópico.

Comentário:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ◆ ALMEIDA, E. R., SANTOS, E. R., SILVA, A. A. F., CORREIA, C. A - Antiinflammatory action of Lapachol, J. Ethnopharmacology, 29: p. 239-241, 1990.
- ◆ ALMEIDA, M. E.; BRANDÃO, M. A.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M.. Avaliação preliminar do efeito interceptivo do lapachol em ratas Wistar, Bol. Centro Biol. Reprod., 18, p. 37-48, 1999.
- ◆ ALMEIDA, A. D. T. DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE FORMAS TÓPICAS DE ISOTRETINOÍNA. Dissertação de MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE – RECIFE, 2000.
- ◆ ALMEIDA, E.R.; MELLO, A.C.; SANTANA, C.F.; SILVA FILHO, A.A.; SANDOS, E.R. The action of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)1,4-naphtoquinone (lapachol) in pregnant rats. Revista Portuguesa de Farmácia, v. 38, n. 3, p.21-23, 1988.
- ◆ ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L. V.; Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos, 6ª edição, Editorial Premier, 2000.
- ◆ BARRY, B. W.; GRACE, A. J. Rheological and sensory evaluation of work softening and recovery of pharmaceutical white soft paraffins. J. Pharm. Sci. V.60, n. 8, p. 1198-1203, 1971.
- ◆ BARRY, B. W. Dermatological Formulations: Percutaneous Absorptions, New York: Marcel Dekker, 1983, v. 18, cap. 1, p. 1-48.
- ◆ BLOCK, J. B., SERPICK, A. A., MILLER, W., WIERNICK, P. H. – Early clinical studies with lapachol (NSC – 11905). Cancer Chemother Reports part 2, 4 (4): 27-28, dec. 1974.
- ◆ BLOCK, L. H. Medicated Applications. In Gennaro AR, ed. Remington's Pharmaceuticals Science, 18ed., Easton: Mack, 1990, cap. 84, p. 1596-1602.
- ◆ BONNABRY, C. Mise au point et validation de modeles d'étude *in vitro* du passage percutané – Université d'auvergne – UFR de pharmacie, 1999.

- ◆ BOND, J.R.; BARRY, B.W. Limitations of hairless mouse skin as a model for *in vitro* permeation studies through human skin: hydration damage. *J. Invest. Dermatol.*, 90, p. 486-489, 1988.
- ◆ BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I. *In vitro* models for human percutaneous absorption. In *Models Dermatology*, p. 178-188, 1985.
- ◆ CANOTILHO, J.; SOUZA, A.T.B.; PINTO, J.A.M.C. Análise Térmica. Interesse em tecnologia Farmacêutica. *Revista Portuguesa de Farmácia*, Lisboa, v. 42, n. 4, p. 5-12, 1992.
- ◆ CLEMESY, M. – Utilization de peaux dans les méthodes d'étude de perméation "ex vivo" des systèmes transdermiques – Unite d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques – these n° 162/86 – 1988.
- ◆ COMUNE, A. P. Análise Térmica - Princípios, aplicações e importância em Fármaco e medicamentos. *Lecta*, Bragança Paulista, v. 17, n. 2, p.87-94, jul-dez, 1999.
- ◆ CORREIA, L. C. A.; SILVA, A. A. F. – Primeiros ensaios utilizando o Lapachol em pacientes portadores de bursite na fase aguda. Anais do X Simpósio de plantas medicinais do Brasil – setembro, 1988 – São Paulo – Brasil.
- ◆ CORREIA, L. C. A.; SILVA, A. A. F. – Primeiros informes na utilização do Lapachol em pacientes portadores de Tendinite. Anais do X Simpósio de plantas medicinais do Brasil – setembro, 1988 – São Paulo – Brasil.
- ◆ DERSIJARU, G.R.; PAUL, I.C.; CURTIN, D.Y. *Am Chem. Soc.* N.99, p.1594-1600, 1977.
- ◆ FARBER, P. L.; Traumas e contusões. Disponível em <http://sites.uol.com.br/pfarber>. Acesso em 8 de janeiro de 2001.
- ◆ FLORIO, J. C.; TASAKA, A. C. ; Antiinflamatórios , Revista Racine, n° 55, p. 24-31, março-abril, 2000.
- ◆ FONSÊCA, S.G.; SILVA, L.B.L.; CASTRO, R.S.; SANTANA, D.P. Validação de Metodologia Analítica para Doseamento de Lapachol por CLAE. *Revista Química Nova*. In Press.
- ◆ FONSÊCA, S. G. C. Avaliação de formas clássicas e microparticuladas contendo lapachol. Dissertação DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE- RECIFE, 2000.

- ◆ FRANZ, T.J. Percutaneous absorption on relevance of *in vitro* data. J. Invest. Dermatol., 64, p. 190, 1975.
- ◆ GODWIN, D. A.; MICHNIACK, B. B.; CREEK, K. E. Evaluation of Transdermal Penetration Enhancers Using A Novel Skin Alternative. Journal of Pharmaceutical Science, 86, p. 1001-1005, 1997
- ◆ GONÇALVES DE LIMA, O., d'ALBUQUERQUE, I. L., MACHADO, M. P. – Primeiras observações sobre a ação antimicrobiana do Lapachol. – Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco 14 (1/2): 129-135, 1956.
- ◆ GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - part 2. Reserch focus. V. 1, n. 6, setembro, 1998.
- ◆ GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - part 1. Reserch focus. V. 1, n. 5, august, 1998.
- ◆ GIRON, D. Applications of thermal analysis in the pharmaceutical industry. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, v. 4, n. 6, p. 755-770, 1986.
- ◆ GIRON, D. Thermochim. Acta, n. 248, p. 1-59, 1995
- ◆ GIRON, D. Applications of Thermal analysis in the Pharmaceutical Industry. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis. V. 4, n. 6, p.755-770, 1986.
- ◆ GOODMAN, A. G., *et al.* ; Goodman & Gilman's the Pharmacological Basics of Therapeutics, 9ª edição, New York, mc Graw-Hill, 1996
- ◆ GOOGRICH, B. F. Carbopol – High performance polymers for pharmaceuticals. Bulletin 14: 24, 1997.
- ◆ GUY, R.H.; HADGRAFT, J. Transdermal drug delivery: the ground rules are emerging. Pharm. Int., v. 6, p.112-116, 1985.
- ◆ GWAK, H.S.; CHUN, I.K. Effects of vehicles and penetration enhancers on the *in vitro* percutaneous absorption of tenoxican through hairless mouse skin. International Journal of pharmaceutics, v.236, p. 57-64, 2002.
- ◆ HOOKER, S. C. THE CONSTITUTION OF LAPACHIC ACID (LAPACHOL) AND DERIVATIVES. J.Chem.Soc.61:611-650,1892.
- ◆ HUANG, Y.; WU, S.; WANG, C. Response Surface Method: A Novel Strategy to Optimize Iontophoretic Transdermal Delivery of Thyrotropin-releasing hormone, Pharmaceutical Research, 13, p. 547-552, 1996.

- ◆ IDSON, B. Efeitos emulsificantes sobre a pele. *Cosmet. & Toilet.* V. 9, n. 4, p. 54-59, 1997.
- ◆ KURAMOTO, M.; TANAKA, T.; MAKITA, H.; NAKAMURA, Y.; YATA, N. Characteristics of Shed SnakeSkin Permeability to Indomethacin and Fatty alcohol, *J. Pharm. Pharmacol.*, 48, p. 680-684, 1996.
- ◆ JEANMOUGIN, M. – Cycle d’enseignement dermatologique – ROCHE, 1984.
- ◆ LEAL, L. B. S. Preparação e Avaliação Biofarmacêutica de formas Semi-sólidas da Aroeira da Praia – *Schinus terebinthifolius* Raddi - Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, 1999.
- ◆ LE HIR, A.; Noções de Farmácia Galênica, 6º edição, organização Andrei Editora Ltda., 1997.
- ◆ LIMA, O.G.; D’ALBUQUERQUE, I. L., GONÇALVES DE LIMA, C., MACHADO, M. P.- Primeiras Observações sobre a Ação Antimicrobiana do Lapachol.- *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco*, v. 14, Nº 1/2, 129-135, 1956.
- ◆ LIN, T. J. Adverse effects of excess surfactants upon emulsification. *Cosmet. & Toilet.*, v. 106, p. 71-80, 1991.
- ◆ LIN, S. Y.; HOU, S. J.; HSU, T. H. S.; YEH, F. L. Comparisons of Different Animal Skins with Human skin in Drug Percutaneous Penetration Studies. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 14, p. 645-654, 1992.
- ◆ LOPES, P.S., KANEKO, T.M. Membranas no estudo de permeação cutânea, *Cosmetics & Toiletries*, 12, mar/abr, p. 62-66, 2000.
- ◆ LUI, C.Y.; AYENI, A.A.; GYLLENHAAL, C.; GROVES, M.J. Some formulation properties of Lapachol, a potential oncolytic agent of natural origin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. **11**, Nº 9/10, 175. 63-1779, 1985.
- ◆ MACEDO, RO, NASCIMENTO, TG (2001), Thermal characterization of lapachol by means of TG and DSC coupled to a photovisual system, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* , 64 (2): 751-756
- ◆ MACEDO, R.O. et. al., 28th Natas - Annual Meeting, Orlando, FL, 2000.
- ◆ MACEDO, R.O. and et. al, *Anais da Assoc. Brasileira de Química*, 1998.

- ◆ MARQUARDT, D.; SUCKER, H. Oil-in-water-emulsions gels: determination and mathematical treatment of flow properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 46, p. 115-124, 1997.
- ◆ MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P. *Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Science*, 4ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, cap. 13, p. 324-349.
- ◆ MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H. I. Dermatotoxicology, In: Monteiro-Riviere, NA *Anatomical Factors Affecting Barrier Function*, 5ed., Washington: Taylor & Francis, 1996, p. 3-33.
- ◆ MATOS, J.R.; MERCURI, L.P.; GOMES DE PINHO, J.J.R.; MIYANO, M.H.; STORPIRTIS, S. Aplicação de métodos termoanalíticos em estudos de pré-formulação de comprimidos de cloridrato de metformina. *Anais Assoc. Bras. Quim.*, v. 47, n. 4, p. 305-307, 1998.
- ◆ MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive Skin Penetration Enhancement and its Quantification In Vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, p. 103-112, 2001.
- ◆ MORRISON, R.K.; BROWN, D.E.; OLESON, J.J.; COONEY, D.A. Oral toxicology studies with Lapachol. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.17, p.1-11, 1970.
- ◆ NAITO, S.; TSAI, Y. Percutaneous absorption of indomethacin from ointment bases in rabbits. *Int. J. Pharm.*, 8, p. 263-276, 1981.
- ◆ NAYAK, P. K., MOLINS, D., CARLETON, F. J., MORRISON, R. K. – Absorption, tissue distribution and excretion of Lapachol in animals. *Proceedings of Federation of American Societies for experimental Biology*. 27 (1): 1774, jan-fev, 1968
- ◆ NIAZY, E. M. Influence of oleic acid and other permeations promoters on transdermal delivery of dihydroergotamine through rabbit skin. *Int. J. Pharm.*, 67, 97-100, 1991.
- ◆ NOVARTIS, Voltaren Emulgel. Disponível em <http://www.novartis.com.br>. Acesso em 15 de janeiro de 2001.
- ◆ PRIBORSKY, J.; MUHLBACHOVÁ, E. Evaluation of *in vitro* percutaneous absorption across human skin and in animal model. *J. Pharm. Pharmacol.* , 7, p. 468-472, 1990.
- ◆ PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. ; MORGADO, R.; *Tecnologia Farmacêutica*; 5º edição, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

- ◆ REDFEARN, E. R. ; WHITTAKER, P. A. – The inhibitory effects of quinones on the succinic oxidases system of the respiratory chain. *Biochim. Biophys Acta*, 56: 440-444, 1962.
- ◆ REIFENRATH, W. G.; HAWKINS, G. S.; KURTZ, M.S. Percutaneous penetration and skin retention of topically applied compounds: An *in vitro-in vivo* study. *J. Pharm. Sci.*, 80, p. 526-532,1991.
- ◆ RITSCHER, W. A.; HUISSAN, A. S. – The principles of permeation of substances across the skin – *Meth. Find Exptl. Clin. Pharmacol.* 10(1), 39-56, 1988.
- ◆ SANDOVAL, N.A.; RODRIGUEZ,C.; POCH,M.; MARTINEZ, N.R. Tumores provocados por Metilcolantreno y Lapachol. Seguimiento del Desarrollo Mediante Citología. *APPTLA*, v.46, p.257-264, 1996.
- ◆ SANTANA, D. P. – Evaluation biopharmacéutique de diferentes formulation galéniques de l’isotretinoïne em gel – Université Joseph Fourier – Guenoble I – UFR de Pharmacie – 1992.
- ◆ SANTANA, C.F. de; LIMA, O.G. de; D’ALBUQUERQUE, I.L.; LACERDA, A.L.; MARTINS, D.G. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do pau d’arco (*Tabebuia avellanadae*). *Revista do Instituto de Antibióticos*. V. 8, Nº 1/2, 89-94, 1968.
- ◆ SANTI, P.; GUY, R.H. Reverse ionphoresis- parameters determining electro – osmotic flow. II Electrode chamber formulation, *J. Controlled Release*, 42, p. 29-36, 1996.
- ◆ SANTI, P. Transdermal Delivery System. IV Pharmatech, New Perspective in Drug Delivery Systms. August 8 to 11, 1999.
- ◆ SANTOS, E.R. dos; PRISTA, L.V.N.; LOBO, J.M.S.; SANTOS, D.G. Estudos de difusão cutânea do Lapachol. I – Ensaio “in vitro”. *Revista Portuguesa de Farmácia*. 41, Nº 3, 15-19, 1991.
- ◆ SCHULTZ, K.H.; GARBE, I.; HAUSEN, B.M.; SIMATUPANG, M.H. The sensitizing capacity of naturally occurring quinones – experimental studies in Guinea Pig. I. Naphtoquinones and related compounds. *Archives for Dermatological Research*, v. 258, n.1, p.41-52, 1977.
- ◆ SESTER, E.A.. AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DO LAPACHOL TÓPICO: ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*. Dissertação DE MESTRADO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE- RECIFE, 1996.

- ◆ SHAW, N.O.; DE VILLIERS, M.M.; LOTTER, A.P. Preformulation Stability Screening of Ivermectin with Non-ionic Emulsion Excipients. *Pharmazie*, 54, 5, 372-376, 1999.
- ◆ SKELLY, J.P., SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., GUY, R.H.; WESTER, R.C.; FLYNN, G.; YACOBI, A. FDA and AAPS report of the Workshop on principles and practices of *in vitro* percutaneous penetration studies: Relevance to bioavailability and bioequivalence, *Pharma Res.*, 4, p. 265-267, 1987.
- ◆ SMITH, A. L.; LESTER, R. L. – The inhibition of oxidation and phosphorylation in beef-heart mitochondria by benzoquinones. *Biochim. Biophys. Acta*, 48: 547-551, 1961.
- ◆ THE MERCK INDEX. 12^o edition. -Lapachol- no. 5376, pág.917-1996.
- ◆ VALERO, M. S. Determinação do EHL crítico do óleo de Babaçu , avaliação da função hidratante e aplicação em emulsões tópicas como novo adjuvante lipofílico. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, 1997.
- ◆ VANBEVER, R.; BOULENGÉ, E.; PRÉAT, V. Transdermal delivery of fentanyl by electroporation I. Influence of electrical factors, *Pharm Res.*, 13, p. 559-565, 1996.
- ◆ VAN DOOREN, A.A.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 9, 43, 1983.
- ◆ VENKATARAN, S.; KHOHLOKWANE, M.; WALLIS, S. H. Differential Scanning Calorimetry as a quick scanning technique for solid state stability studies. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v.21, p.847-855, 1995.
- ◆ WANICK, M. C.; BANDEIRA, J. A. ; FERNANDES, R. V. – Ação antiinflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico do Líber do Pau d'arco Roxo (*Tabebuia avellanedae*) , em pacientes portadores de Cervicites e Cérvico-vaginites. *Ver. inst. Antibióticos*, Recife, 10 (1/2): 41-46, dez. 1970.
- ◆ WESTER, R.C.; CHRISTOFFEL, J.; HARTWAY, T.; POBLETE, N.; MAIBACH, H.I.; FORSELL, J. Human cadver skin viability for *in vitro* percutaneous absorption: Storage and detrimental effects of heat-separation and freezing, *Pharm. Res.*, 15, p.82-84, 1998.

- ◆ YOKOMIZO, Y. Effects of phosphatidylcholine on the percutaneous penetration of drugs the dorsal skin of guinea pigs in vitro; and analysis of the molecular mechanism, using attenuated total reflectance-fourier transform infrared (ATF-FTIR) spectroscopy. . Journal of Controlled Release, v.42, p. 249-262, 1996.
- ◆ ZHANG, I.; SHUNG, K.K.; EDWARDS, D.A. Hydrogels with enhanced mass transfer for transdermal drugs delivery. J. Pharm. Sci., 85, p. 1312-1316, 1996.

