

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

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE**  
**UMA NOVA FORMA FARMACÊUTICA CONTENDO HIDROQUINONA**

**SIMONE SANTOS BEZERRA**

**Recife, 2003**

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

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE  
UMA NOVA FORMA FARMACÊUTICA CONTENDO HIDROQUINONA**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração: Tecnologia Farmacêutica.

**Mestranda: Simone Santos Bezerra**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nereide Stela Santos Magalhães**

**Recife, 2003**

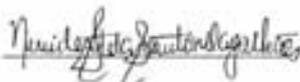


UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

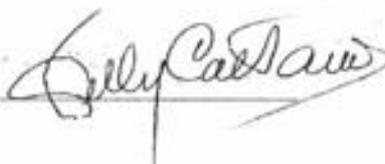
Recife, 19 de Dezembro de 2003.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 19 de Dezembro de 2003 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

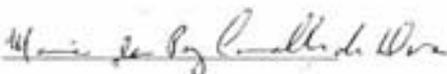
**PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO:** Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: 

**EXAMINADOR INTERNO:** Profa. Dra. Maria Nelly Caetano Pisciotano (Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: 

**EXAMINADOR EXTERNO:** Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva (Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: 

*Dedico este trabalho*

*A minha mãe, Maria Ignez Santos Bezerra, aos meus avós, Antônio Menezes dos Santos e Helena Mattos dos Santos e à minha irmã, Suely Santos, os quatro pilares desta conquista.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter permitido que eu vivesse para realizar tudo isso, e à Virgem Maria, que sempre me protegeu e me deu conforto nos momentos de angústia;

A minha mãe, por seu amor incondicional e por tudo mais;

A minha família (os mais próximos e mesmo os mais distantes), pelo apoio e pelo carinho;

Ao meu pai, Armando Gomes Bezerra, a minha prima Rachel Bastos e a minha tia-avó, Hermé de Almeida Mattos, pelos exemplos de vida;

Aos meus amigos Anita Esmeralidina B. Lima, Ladjane Duarte, Eduardo A. Lira e Michele Lira Rodrigues porque sem eles minha vida seria muito “cinza”;

À minha orientadora, Professora Nereide Magalhães, pela paciência, pela confiança, pelos ensinamentos e por ter me incentivado a prosseguir quando eu quis desistir desta caminhada;

A Prof<sup>a</sup> Nelly Caetano, do Departamento de Farmácia da UFPE, pelo carinho, pelos ensinamentos e pela contribuição técnica;

A Profª Silene Carneiro, do Departamento de Antibióticos da UFPE, pelo apoio e disponibilidade com que sempre contei;

Ao Prof. Davi Santana, do Departamento de Farmácia da UFPE, por ter gentilmente cedido seu laboratório e suas células de Franz para que eu pudesse realizar alguns dos meus experimentos;

A Profª Elba Lúcia Amorim, do Departamento de Farmácia da UFPE, por ter igualmente cedido seu laboratório para que eu pudesse realizar alguns dos meus experimentos;

A Iguaci da Costa Duque, secretária da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/ UFPE, por ter sido sempre tão solícita e amável;

Ao Profº Dr. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)/UFPE, e ao Profº Dr. Luiz Bezerra de Carvalho, responsável pelo setor de Bioquímica do LIKA, no qual foi realizada a maior parte deste trabalho, pela gentileza com que sempre me trataram;

Aos funcionários do LIKA, que sempre estiveram dispostos a resolver meus problemas técnico-administrativos e que me trataram tão cordialmente todo este tempo, em especial a Vera Lúcia, Luiz Felipe Viegas, Moisés Melo e Rafael Padilha;

Ao pessoal dos setores de Biotecnologia e Biologia Molecular do LIKA pelos muitos empréstimos, e em especial aos colegas do Setor de Patologia Carmelita B. Lima, Mário de

Melo Júnior e Prof<sup>o</sup>. Nicodemos Teles pelas fotos das minha formulações e pela excelente vizinhança;

Aos meus amigos do Setor de Bioquímica do LIKA, em especial a Givanildo e Luciana Oliveira, Luciana da Mata e Ian porto por terem tornado, com seus sorrisos, mais agradáveis meus dias de trabalho e por terem me ajudado a superar muitas das dificuldades que encontrei para realizar a parte prática da minha dissertação;

Aos meus amigos do grupo Sistemas de Liberação Controlada (SLC) por todos os momentos e experiências que compartilharam comigo, em especial a Noêmia Santos, Hercília Rolim, Margareth Mayer, Lúcio Pimentel, Rosângela Vidal, Robson Amaro da Silva, Marcela Outtes e Agenor Tavares;

A Dayse Maria Vasconcelos de Deus, pela amizade e por ter sido minha “fiel escudeira” quando eu quis lutar como “Dom Quixote”;

Aos meus companheiros de Mestrado, em especial a Risonildo Pereira Cordeiro, pela mão amiga e pela disponibilidade profissional;

A Roseane Maria Ribeiro Costa, pela contribuição inestimável para a realização deste trabalho e por ter sido tão boa companheira neste período importantíssimo da minha vida pessoal e profissional;

A Jaqueline Rodrigues, minha ex-colega do grupo SLC, pelos conselhos e pela ajuda essencial;

A Andréa Duarte Tavares pelas inúmeras vezes em que esteve disponível para esclarecer minhas dúvidas;

A João Eudes do Nascimento, meu amigo e professor, e Ana Amélia Moreira Lira, minha querida colega da graduação e do mestrado, pela ajuda de valor incalculável que me deram na etapa final de desenvolvimento deste trabalho;

A Dilcéia Leite Nóbrega por não ter deixado que eu desistisse do meu título de Mestre quando tive meus momentos de fraqueza;

Aos que confiaram na minha capacidade profissional, porque me serviram de estímulo, e aos que não confiaram nela, porque me obrigaram a trabalhar minha auto-estima;

Meus sinceros agradecimentos enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esta dissertação pudesse existir.

“Eu pedi força e Deus me deu dificuldades para superar;  
Eu pedi sabedoria e Deus me deu problemas para resolver;  
Eu pedi prosperidade e Deus me deu cérebro e músculos para trabalharem juntos;  
Eu pedi coragem e Deus me deu perigos para enfrentar;  
Eu pedi amor e Deus colocou em meu caminho pessoas para eu ajudar;  
Eu pedi favores e Deus me deu oportunidades;  
Eu pedi tudo o que queria e Ele me deu, enfim, exatamente o que eu precisava...”

Autor desconhecido

# SUMÁRIO

**Agradecimentos**

**Lista de Figuras**

**Lista de Tabelas**

**Lista de Gráficos**

**Resumo**

**Abstract**

<b>1.INTRODUÇÃO</b>	<b>02</b>
<b>2.REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>04</b>
2.1 Pele e Pigmentação	04
2.2 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos e Formas Farmacêuticas	
Aplicadas à Pele	10
2.3 Microemulsão Transdérmica P.L.O. (Pluronic®Lecithin Organogel)	12
2.4 Hidroquinona: Generalidades	13
2.5 Atuação da hidroquinona como despigmentante	17
2.6 Atividade da hidroquinona frente a melanomas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	19
2.7 Atividade Antimicrobiana da Hidroquinona	20
2.8 Hidroquinona: Toxicologia	24

<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>4. ARTIGO</b>	<b>31</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>56</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>58</b>

#### **ANEXO I**

**Resumos enviados para congresso**

#### **ANEXO II**

**Resultados adicionais: tabelas, gráficos e análises estatísticas**

#### **ANEXO III**

**Normas do periódico Drug Development and Industrial Pharmacy**

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão da Literatura

- Figura 1.** Unidade epidérmica de melanização (de acordo com W.C. QUEVEDO Jr.).\_\_\_\_\_ 05
- Figura 2.** Diagrama do folículo piloso (pêlo+glândulas): localização da papila.\_\_\_\_\_ 06
- Figura 3.** Rota biossintética da melanina \_\_\_\_\_ 08
- Figura 4.** Micela “lipossomal” do Pluronic® Lecithin Organogel \_\_\_\_\_ 12
- Figura 5.** *Staphylococcus aureus* - Ilustração do aspecto de células coradas de *S. aureus*, vistas ao microscópio óptico e aspecto das células em Microscopia Eletrônica de Transmissão \_\_\_\_\_ 20
- Figura 6.** Alvos de ação de drogas antimicrobianas na célula bacteriana \_\_\_\_\_ 22
- Figura 7.** Amamentação \_\_\_\_\_ 24
- Esquema 1.** Matriz ácido-base e oxidação-redução para hidroquinona (HQ), semiquinona (SQ) e benzoquinona (BQ). \_\_\_\_\_ 16

### Artigo

- Figure 1.** Photomicrography of HQ-loaded PLOme analysed by optical microscopy\_\_\_\_ 44
- Figure 2A.** TEM of an unloaded PLOme formulation \_\_\_\_\_ 45
- Figure 2B.** TEM of a loaded PLOme formulation \_\_\_\_\_ 45

<b>Figure 3A.:</b> 25°C pH evolution within short-term thermal stability assay for formulations B, E and their respective hydroquinone-free formulations _____	46
<b>Figure 3B.:</b> 37°C pH evolution within short-term thermal stability assay for formulations B, E and their respective hydroquinone-free formulations _____	46
<b>Figure 4A:</b> Hydroquinone content analysis within short-term thermal stability assay at 25°C _____	47
<b>Figure 4B:</b> Hydroquinone content analysis within short-term thermal stability assay at 37°C _____	47
<b>Figure 5.</b> Long-term pH evolution of Pluronic Lecithin Organogel formulations containing hydroquinone. _____	49
<b>Figure 6A:</b> In vitro kinetic profile of hydroquinone encapsulated into a Pluronic Lecithin Organogel formulation made with propyleneglycol. _____	50
<b>Figure 6B:</b> In vitro kinetic profile of hydroquinone encapsulated into a Pluronic Lecithin Organogel formulation made with polyethyleneglycol 200. _____	50
<b>Figure 7:</b> Comparative antimicrobial activity of hydroquinone and tetracycline against <i>S. aureus</i> strains	

## LISTA DE TABELAS

### Revisão da Literatura

Tabela 1: Componentes das “preparações combinadas” \_\_\_\_\_ 19

### Artigo

**Table 1:** Constituents/concentrations variation within A-J formulations. \_\_\_\_\_ 37

**Table 2:** Origin of *Staphylococcus aureus* strains selected for the antimicrobial activity test  
\_\_\_\_\_ 41

**Table 3:** Sensitivity/resistance characteristics of *Staphylococcus aureus* strains selected  
for the antimicrobial activity tests. \_\_\_\_\_ 42

**Table 4:** Results of the accelerated stability testing for formulations A-J when compared  
with their respective hydroquinone-free (unloaded) formulations. \_\_\_\_\_ 44

**Table 5.** Evaluation of the stability of hydroquinone incorporated into Pluronic Lecithin  
Organogel (PLOme) formulations B and E, containing propylene glycol and polyethylene  
glycol 200 respectively. \_\_\_\_\_ 48

**Table 6.** Comparative Minimal Inhibitory Concentration of Tetracycline and Hydroquinone  
against *Staphylococcus aureus* strains. \_\_\_\_\_ 49

## ABSTRACT

Hydroquinone (HQ) is a drug reported to possess manifold biological activities, such as depigmenting, antimicrobial and antitumour properties. The Pluronic<sup>®</sup>Lecithin Organogel (PLOme) is a phospholipidic microemulsion particularly implied when a high cutaneous permeability and systemic absorption of a drug is suitable. Once that HQ is highly unstable into various topical vehicles and it presents low topical bioavailability and toxicity, the HQ appears as a fulfilling drug to this liposomal pharmaceutical form. The aim of this work was therefore to incorporate such a drug into this transdermal drug delivery system. Furthermore, the stability and the kinetic profile as well as the antimicrobial activity of both free and incorporated forms of HQ were evaluated. HQ-loaded PLOme and unloaded PLOme were prepared according to the supplier directions. The samples were then submitted to accelerate and long-term stability tests. Thermal stability studies were also performed monitoring the pH and the HQ content into PLOme formulations stored at 25°C and 37°C. The HQ content was assayed by high performance liquid chromatography using the United States Pharmacopoeia method. A method of drug extraction from PLOme formulations was developed and validated. The *in vitro* HQ kinetic profile from the best formulations at 0.1% concentration was examined using the Franz cells method. A cellulose membrane was used to separate the donors and the aqueous receptor medium. The antimicrobial activity against ATCC and resistant *Staphylococcus aureus* strains was determined for free and encapsulated HQ forms (*Staphylococcus aureus* ATCC chosen were the ATCC 6538/ FDA 209 and the ATCC 6538P/ FDA 209P). The multi inoculation

agar dilution susceptibility testing method were used. No microscopic or microscopic alterations were detected after accelerated stability testing, but the presence of darkness of HQ loaded PLOme. Long-term stability testing also revealed darkness for HQ-loaded formulations. Neither detectable increase on the particle size nor modification on particle shape occurred until 120 days. No relevant pH evolution was observed for both HQ-free and HQ-loaded PLOme. Concerning the HQ content, no degradation was noticed under unfavorable thermal conditions. The pH changes were not detected in the short-term thermal stability analysis. In contrast, the long-term stability showed a second-order HQ degradation, which leads to a short shelf life. The HQ rate obtained from microemulsion was close to 1.5 times lower than that one derived with HQ in a gel matrix at a similar drug concentration. Free PLOme-encapsulated hydroquinone showed to have great *in vitro* inhibitory potential against strains of *S. aureus* (including multi resistant ones); PLOme-encapsulated hydroquinone had better activity than hydroquinone against two of the testing-strains. The transdermal gel containing HQ, otherwise, seems not to be enough stable under the above mentioned stability tests. As a consequence, further investigation is required on the stability and kinetic of this pharmaceutical form before commercialization.

## RESUMO

O *p*-diidroxibenzeno (hidroquinona) é um princípio ativo dotado de várias atividades biológicas, sendo relatado por diferentes autores como sendo despigmentante, antimicrobiano e quimioterápico. O Pluronic<sup>®</sup> Lecithin Organogel (PLOme) é uma microemulsão fosfolipídica particularmente indicada quando é desejável maior permeabilidade ou mesmo absorção sistêmica de uma droga. Considerando a instabilidade da hidroquinona em diferentes veículos cosméticos, bem como sua baixa biodisponibilidade tópica e sua conhecida toxicidade, este ativo surge como interessante candidato a ser contido numa forma farmacêutica lipossomal. O objetivo deste trabalho é então incorporar a hidroquinona num sistema transdérmico de liberação de drogas, a microemulsão PLOme. Além disso, foram avaliados os parâmetros cinéticos das formulações obtidas, bem como a atividade antimicrobiana da hidroquinona nas formas livre e micromulsionada. Foram preparadas, de acordo com indicações do fabricante, formulações de Pluronic<sup>®</sup> Lecithin Organogel (gel transdérmico) contendo hidroquinona em diferentes concentrações, bem como as formulações “brancas” correspondentes. As amostras foram submetidas a testes de estabilidade acelerada (resistência a centrifugação, stress mecânico, elevação de temperatura e ciclos gelo-degelo) e em longo prazo (acompanhamento do pH e conteúdo ao longo do tempo). Para a determinação do conteúdo de hidroquinona em cada amostra foi utilizada Cromatografia Líquida de Alta Precisão (HPLC): as condições cromatográficas empregadas foram aquelas recomendadas pela Farmacopéia Americana (USP23); foi desenvolvido e validado um método para a extração

da droga a partir das microemulsões PLOme. Foram investigados os parâmetros cinéticos das melhores formulações. Nestes ensaios a hidroquinona foi utilizada a 0,1% ; alíquotas de cada amostra foram dispostas sobre membranas de celulose em células de Franz, tendo sido escolhida a água como meio receptor. O potencial antimicrobiano da hidroquinona livre e microemulsionada foi determinado frente a duas cepas padrão ATCC e frente a 18 cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, principal microrganismo causador da mastite em mulheres no período de amamentação (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538/ FDA 209; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P/ FDA 209P foram utilizados como padrões). Para tal foi utilizada a técnica de microdiluição em Agar, com o auxílio do multi-inoculador de Steers. Não foram observadas alterações macro ou microscópicas após os testes de estabilidade acelerada, exceto pelo escurecimento que apresentaram as formulações com hidroquinona. Os estudos de estabilidade em longo prazo revelaram alteração de cor das amostras, mas não aumento no diâmetro das partículas ou modificação no formato das mesmas num período de 120 dias. Não ocorreu perda de conteúdo nem alteração de pH nas formulações analisadas durante os ensaio de estabilidade térmica em curto prazo. No estudo em longo prazo a temperatura ambiente, ao contrário, observou-se significativa perda de hidroquinona das formulações, evidenciada por cinéticas de degradação de segunda ordem e curtos prazos de validade, mas sem significativa variação de pH. As cinéticas *in vitro* revelaram que a uma matriz de gel libera comparativamente para o meio receptor uma maior quantidade de hidroquinona em relação à microemulsão testada. A hidroquinona, em suas formas livre e encapsulada, demonstrou possuir atividade inibitória frente a diversas cepas de *Staphylococcus aureus* (incluindo cepas multi-resistentes); duas das cepas testadas foram melhor inibidas pela hidroquinona encapsulada (PLOme-HQ) do que pela hidroquinona livre. O gel transdérmico contendo hidroquinona, no entanto, parece não ser

suficientemente estável nas condições testadas. Conseqüentemente, é necessária investigação adicional a respeito da estabilidade e do perfil cinético desta forma farmacêutica antes de sua comercialização.