



**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MILCA GABRIELLA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÃO TÓPICA
CONTENDO NITROFURAZONA
MICROENCAPSULADA**

**Sorocaba/SP
2013**

MILCA GABRIELLA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÃO TÓPICA
CONTENDO NITROFURAZONA
MICROENCAPSULADA**

Dissertação apresentada à banca Examinadora
do Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba,
como exigência parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a Dr^a Marta Maria Duarte Carvalho Vila
Co-orientador: Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão

**Sorocaba/SP
2013**

MILCA GABRIELLA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÃO TÓPICA
CONTENDO NITROFURAZONA
MICROENCAPSULADA**

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA:

Ass: _____
Profª Drª Marta Maria Duarte Carvalho Vila
Universidade de Sorocaba

Ass: _____
Prof. Dr. Victor Manuel Balcão
Universidade de Sorocaba

Ass: _____
Profª Drª Denise Grotto
Universidade de Sorocaba

Ass: _____
Prof. Dr. Robson Machado Oliveira
Universidade de Sorocaba

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Representação esquemática das três camadas da pele humana.....	13
Figura 02.	Microfotografia da pele humana, destacando estrato córneo.....	14
Figura 03.	Representação esquemática das vias de penetração através da pele.....	17
Figura 04.	Fórmula estrutural da nitrofurazona.....	22
Figura 05.	Representação esquemática evidenciando diferença entre microcápsulas e microesféras.....	27
Figura 06.	Representação esquemática de diferentes processos de microencapsulação.....	29
Figura 07.	Solução de cloreto de cálcio com micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona microencapsuladas, sob agitação orbital em câmara incubadora	47
Figura 08.	Fotografias das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada.....	49
Figura 09.	Fotografia dos diversos dispositivos testados na etapa de extrusão da dispersão de nitrofurazona em solução aquosa de alginato de sódio.....	51
Figura 10.	Microfotografia de varredura eletrônica de micropartícula de alginato de sódio contendo nitrofurazona encapsulada.....	53
Figura 11.	Espectros de infravermelho de amostras de micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada, de micropartículas de alginato de cálcio sem nitrofurazona e de nitrofurazona livre.....	55
Figura 11.	Espectros de infravermelho de amostras de micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada, de micropartículas de alginato de cálcio sem nitrofurazona e de nitrofurazona livre (continuação).....	56
Figura 12.	Resultados obtidos nas análises por DSC às micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada e as micropartículas de alginato de cálcio sem nitrofurazona.....	59
Figura 13.	Resultados obtidos nas análises termogravimétricas (TGA) às micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada e as micropartículas de alginato de cálcio sem nitrofurazona.....	60
Figura 14.	Fotografias dos géis preparados com 4,0% (m/m) de Aristoflex® AVC: sem nitrofurazona, contendo nitrofurazona e contendo micropartículas de alginato de cálcio com nitrofurazona encapsuladas..	62
Figura 15.	Determinação de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC imediatamente após preparação das formulações (Tempo 0).....	65
Figura 16.	Determinação de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC, após um período de armazenamento de 30 dias.....	66
Figura 17.	Determinação de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC, após um período de armazenamento de 45 dias.....	66

Figura 18.	Determinação de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC, após um período de armazenamento de 60 dias.....	67
Figura 19.	Determinação de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC, após um período de armazenamento de 75 dias.....	67
Figura 20.	Determinação de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC, após um período de armazenamento de 90 dias.....	68
Figura 21.	Reograma da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para o gel otimizado com 4,0% (m/m) de Aristoflex® AVC e incorporando micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada.....	69
Figura 22.	Curva de calibração produzida no método espectrofotométrico.....	70
Figura 23.	Fotografias das placas de Petri após realização dos ensaios microbiológicos.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Constituição das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada, obtidas por meio da técnica de emulsão/solidificação.....	36
Tabela 02.	Constituição das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada, obtidas por meio da técnica de extrusão/solidificação.....	37
Tabela 03.	Formulações desenvolvidas para a produção de gel com micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada, do gel sem partículas contendo nitrofurazona encapsulada e do gel com nitrofurazona na forma livre.....	40
Tabela 04.	Planejamento experimental seguido para testar diferentes proporções entre os alginatos de sódio utilizados na produção das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada.....	48
Tabela 05.	Resultados obtidos nas determinações de viscosidade dos vários géis produzidos com diferentes percentagens de Aristoflex® AVC, medida a diferentes tempos de armazenamento.....	64
Tabela 06.	Resultados obtidos para a viscosidade, taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento do gel otimizado com 4,0% (m/m) de Aristoflex® AVC e incorporando micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada.....	69
Tabela 07.	Resultados obtidos nas determinações espectrofotométricas de nitrofurazona nos vários géis preparados após exposição dos mesmos á radiação ultravioleta.....	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1. Pele humana	12
2.1.1. Estrato córneo	13
2.1.2. Vias de penetração de substâncias através da pele	15
2.2. Queimaduras	18
2.2.1. Classificação	19
2.2.2. Principais tratamentos de queimaduras no Brasil	20
2.3. Nitrofurazona	21
2.3.1. Formas farmacêuticas contendo nitrofurazona	23
2.4. Formas farmacêuticas tópicas	24
2.5. Sistemas de liberação de substâncias ativas para uso tópico	25
2.6. Microencapsulação	27
2.6.1. Métodos mecânicos de microencapsulação	29
2.6.2. Métodos físico-químicos de microencapsulação	30
2.6.3. Polímeros utilizados na obtenção de micropartículas	31
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	34
4.1. Reagentes e consumíveis	34
4.2. Equipamentos	34
4.3. Métodos experimentais	35
4.3.1. Preparação de micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada	35
4.3.1.1. Preparação de micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada por emulsão/ solidificação	35
4.3.1.2. Preparação de micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada por extrusão/ solidificação	36
4.3.2. Caracterização físico-química das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada	38
4.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
4.3.2.2. Análises térmicas (TGA e DSC)	38

4.3.2.3. Análise por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier	39
4.3.3. Preparação da formulação farmacêutica na forma de um gel para aplicação tópica	39
4.3.4. Caracterização do gel incorporado com micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada	40
4.3.4.1. Ensaios de fotoestabilidade dos géis	40
4.3.4.2. Caracterização reológica dos géis produzidos	41
4.3.4.3. Determinação do teor de nitrofurazona por espectrofotometria no UV visível	42
4.3.4.4. Determinação do teor de nitrofurazona incorporado nas micropartículas e da eficiência de encapsulação.....	43
4.3.5. Ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. Preparação de micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada	45
5.2. Caracterização das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona microencapsulada	51
5.2.1. Microscopia eletrônica de varreduras (MEV)	52
5.2.2. Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier	53
5.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação	56
5.2.4. Análises térmicas por termogravimetria (TGA) e por calorimetria diferencial de varredura (DSC)	57
5.3. Preparação do gel para aplicação tópica incorporando micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada	61
5.4. Caracterização do gel	62
5.4.1. Ensaio de determinação de viscosidade	63
5.4.2. Determinação da concentração de princípio ativo por espectrofotometria	70
5.4.3. Ensaio de fotoestabilidade	71
5.4.4. Ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar	73
6. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77

RESUMO

Recentemente, tem-se verificado o desenvolvimento de diversas formulações farmacêuticas de uso tópico empregando princípios ativos microencapsulados, tendo como objetivo, entre outros, a liberação controlada do fármaco, em simultâneo com a proteção do ativo e mascaramento da sua cor e/ou odor. Dentre as estruturas carreadoras empregadas, incluem-se as micropartículas (microcápsulas e microesferas) e as nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas). O objetivo principal deste trabalho de pesquisa aplicada consistiu em desenvolver e avaliar um gel para aplicação tópica, contendo nitrofurazona (NTZ) na forma microencapsulada. Neste sentido, inicialmente, foram preparadas micropartículas contendo NTZ por gelificação ionotrópica de alginato de sódio. As micropartículas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), pela determinação da eficiência do processo de encapsulação, e por análises térmicas (TGA e DSC). Na sequência, foi desenvolvido um gel com 0,2% (m/m) de NTZ na forma encapsulada, tendo como agente gelificante Aristoflex® AVC. O teor de 4% (m/m) de Aristoflex® AVC empregado na formulação otimizada foi definido através de análises de viscosidade, como sendo aquela percentagem que garantia a não desestruturação do gel aquando da incorporação das micropartículas contendo NTZ encapsulada, mantendo uma viscosidade constante no gel. O gel otimizado foi avaliado no tempo quanto à viscosidade, aos 0, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de armazenamento. O gel otimizado com as micropartículas de NTZ encapsulada foi avaliado quanto ao teor de princípio ativo por espectrofotometria no UV-visível, fotoestabilidade, atividade antimicrobiana e características reológicas. O método de extrusão/solidificação empregado para obtenção das micropartículas de alginato de cálcio com NTZ encapsulada foi considerado adequado, tendo produzido uma eficácia de incorporação de princípio ativo de $97,8\% \pm 1,1\%$. As micropartículas de alginato de cálcio com NTZ encapsulada apresentaram diâmetros hidrodinâmicos entre 500 μm a 800 μm e formato oval. Pelas análises térmicas e espectro no infravermelho, considerou-se que a NTZ não estabeleceu forte ligação com o polímero, o que pode ser favorável para a liberação do princípio ativo. O gel a 4% de Aristoflex® AVC contendo as micropartículas de NTZ encapsulada apresentou um teor de princípio ativo de $0,18\% \pm 0,05\%$, viscosidade adequada após 90 dias de armazenamento e comportamento pseudoplástico. Adicionalmente, demonstrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Após 24 horas de exposição contínua à luz UV, a formulação desenvolvida pode sofrer fotodegradação, sendo necessário que o produto seja protegido da luz solar durante o seu armazenamento. Pelos resultados obtidos neste trabalho de P&D, pode concluir-se que o gel contendo micropartículas de alginato de cálcio com NTZ encapsulada apresenta características promissoras para utilização como formulação antimicrobiana de uso tópico.

Palavras-chave: micropartículas, nitrofurazona, alginato de cálcio, aplicação tópica, gel, antimicrobiano

Abstract

Recently, there has been the development of various pharmaceutical formulations of topical use employing microencapsulated active ingredients, aiming at (but not limited to) the controlled release of the drug simultaneously with protection of the pharmaceutical active ingredient and masking of its color and/or odor. Among the carrier structures employed, one can find microparticles (microcapsules and microspheres) and nanoparticles (nanocapsules and nanospheres). The major goal of this applied research work was to develop and evaluate a gel for topical application, containing nitrofurazone (NTZ) in microencapsulated form. In this regard, initially NTZ-containing microparticles were prepared by ionotropic gelation of sodium alginate. The microparticles were characterized by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), by determining the efficiency of the encapsulation process, and thermal analysis (TGA and DSC). As a result, a gel was developed with 0.2% (w/w) of NTZ in encapsulated form, having as gelling agent Aristoflex® AVC. The content of 4% (w/w) Aristoflex® AVC employed in the optimized formulation was established through analyses of viscosity, as the fraction of gelling agent that guaranteed maintenance of the gel structure upon incorporation of the microparticles containing encapsulated NTZ, maintaining a constant viscosity in the gel. The optimized gel formulation was evaluated throughout time with regard to viscosity at 0, 30, 45, 60, 75 and 90 days of storage. The optimized gel with microparticles encapsulating NTZ was evaluated for the content in active ingredient by UV-vis spectrophotometry, photostability, antimicrobial activity and rheological characteristics. The method of extrusion/solidification employed for obtaining the microparticles of sodium alginate with encapsulated NTZ was considered adequate, producing an efficiency of incorporation of active principle of $97.8\% \pm 1.1\%$. The microparticles of sodium alginate with encapsulated NTZ exhibited hydrodynamic diameters between 500 μm and 800 μm and oval shape. The results from thermal analysis and FTIR spectra allowed to conclude that NTZ did not established strong links with the polymer, which may be favorable for the release of the active principle. The gel prepared with 4% (w/w) Aristoflex® containing the microparticles with encapsulated NTZ showed a content of active ingredient of $0.18\% \pm 0.05\%$, suitable viscosity after 90 days of storage and pseudoplastic behavior. Additionally, it showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. After 24 hours of continuous exposure to UV light, the pharmaceutical formulation developed may undergo photodegradation, hence it is necessary to protect the product from sunlight during storage. The results obtained in this R&D work allow to conclude that the gel containing microparticles of sodium alginate with encapsulated NTZ shows promising characteristics for use as a topical antimicrobial formulation.

Keywords: microparticles, nitrofurazone, cálcium alginate, topical application, gel, antimicrobial

1. INTRODUÇÃO

O delineamento de formas farmacêuticas tem como objetivo a produção de medicamentos a partir de produtos naturais, de síntese, ou obtidos por processos biotecnológicos, susceptíveis de serem administrados com finalidade profilática, curativa ou de diagnóstico. A obtenção de formas farmacêuticas deve assim buscar a facilidade tanto de posologia como de administração, a ação desejada e a segurança. Partindo destes pressupostos, para uma formulação otimizada existem várias formas de incorporação de princípios ativos, o que pode permitir atender diferentes perfis de utilização e em diferentes circunstâncias. Evidentemente, é necessário considerar os fatores físico-químicos do fármaco, as necessidades terapêuticas relacionadas ao paciente e, principalmente, os fatores biofarmacêuticos, os quais incluem as características de absorção do fármaco a partir de diferentes vias de administração (PRISTA *et al.*, 2002; AULTON, 2005).

A eficácia clínica de um fármaco aplicado por via tópica depende não só das suas propriedades farmacológicas, mas também da sua disponibilidade no local de ação intencionado (MARTINS & VEIGA, 2002). A quantidade de fármaco capaz de penetrar na pele depende tanto da eficiência dos processos de liberação do fármaco a partir da formulação que o contém como da capacidade de penetração da substância ativa nas sucessivas camadas da pele. Assim, a cedência ou liberação *in vitro* do princípio ativo de formulações tópicas, depende tanto do carreador utilizado como da forma de preparação da formulação (BEMVINDO, 2006).

Atualmente, tem-se verificado o desenvolvimento de diversas formulações farmacêuticas envolvendo compostos ativos microencapsulados, objetivando a liberação controlada de fármacos, a redução da concentração do fármaco em outros locais que não os órgãos ou tecidos alvo e a proteção dos compostos que sejam lábeis (SILVA *et al.*, 2003). Dentre as estruturas carreadoras empregadas, incluem-se as micropartículas (microcápsulas e microesferas) e as nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas) (ALENCASTRE, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A nitrofurazona para uso humano tem seu emprego dirigido ao uso tópico para o tratamento de feridas e lesões infectadas da pele e mucosas. Apresenta largo espectro de ação agindo contra vários microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Sua atividade desinfetante favorece a cicatrização no tratamento de feridas produzidas por traumatismo, queimadura ou intervenção cirúrgica (HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

A nitrofurazona é comercialmente disponibilizada na forma de loção e pomada (DEF-Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, 2012/2013). No entanto, seu uso em pacientes queimados pode causar desconforto (FERREIRA *et al.*, 2003).

O gel é uma forma farmacêutica com características emolientes e refrescantes, auxiliando assim a rápida secagem na superfície da pele, formando uma fina película que mantém a região afetada protegida por mais tempo além de manter a propriedade ativa do fármaco presente na formulação (LIRA, 2003). Além disto, é possível a inclusão no gel de princípios ativos protegidos sobre a forma de micropartículas.

Considerando os fatos mencionados, desenvolveu-se neste trabalho de pesquisa um gel contendo nitrofurazona microencapsulada em partículas de alginato de cálcio, para aplicações tópicas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

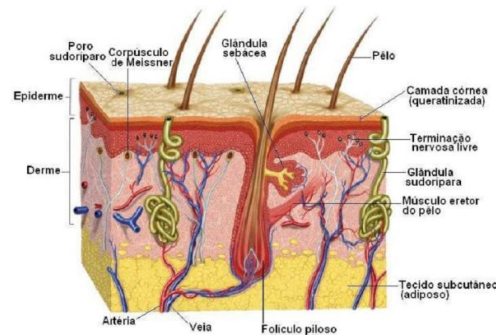
2.1. Pele Humana

A pele é o maior órgão do corpo humano, pesando aproximadamente 5 kg e apresentando cerca de 2 m² de área superficial em humanos adultos. Adicionalmente, é um dos órgãos mais complexos do corpo humano, pois pelo menos cinco tipos diferentes de células contribuem para a formação de sua estrutura. As funções da pele são diversas. Protege o organismo contra a desidratação e atrito, graças à camada queratinizada da epiderme. A pele recebe, por meio de suas terminações nervosas sensitivas, informações sobre o meio ambiente e as envia ao sistema nervoso central. Colabora com a termorregulação do corpo e excreção de substâncias por intermédio das glândulas sudoríparas. Pela presença da melanina, pigmento que é produzido e acumulado na epiderme, protege contra a ação dos raios ultravioleta. Na pele se forma a vitamina D₃ pela ação da radiação ultravioleta do sol sobre precursores sintetizados no organismo. Apresenta células do sistema imunitário, que atuam contra a invasão por microrganismos.

A pele apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo e em continuidade com a derme, encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo (Figura 1) (MENEZES, 2006; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A epiderme é a camada mais externa da pele e apresenta espessura variável de acordo com a região do corpo, chegando a 1,5 mm nas plantas dos pés, sendo que aproximadamente 95% da epiderme é constituída por epitélio pavimentoso queratinizado. A epiderme consiste em uma complexa estrutura constituída de diferentes camadas formadas pelos queratinócitos, células epiteliais estratificadas que sofrem diferenciação à medida que vão da camada basal até a superfície da pele (RIBEIRO, 2006). As outras células que compõem a epiderme estão representadas pelos melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (MENEZES, 2006; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Figura 1. Representação esquemática das três camadas da pele humana: epiderme, derme e hipoderme. (retirado de <http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>, acessado em 24 de abril de 2013).



A região superficial da pele, chamada de estrato córneo, está localizada na epiderme, apresenta 10 a 20 μm de espessura e é responsável pela função de barreira primária à absorção percutânea de diversos compostos e à perda de água. Essa estrutura córnea atua ainda como principal reguladora da penetração percutânea de diferentes compostos e é um marcador da integridade e função da pele. A propriedade de barreira física à difusão de substâncias, característica do estrato córneo, é decorrente da presença de células ricas em queratina assim como de domínios lipídicos intercelulares (MENEZES, 2006).

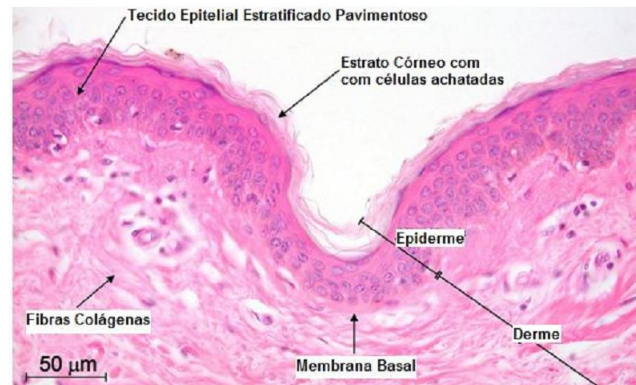
A derme é formada por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e vasos linfáticos, nervos e terminações nervosas. Já a hipoderme, também conhecida como tecido celular subcutâneo, é constituída por lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos (LIRA, 2003).

2.1.1. Estrato Córneo

A última camada da epiderme, a camada córnea ou estrato córneo, é o resultado final do processo de diferenciação celular. A partir da camada basal é que se originam as demais camadas que formam a epiderme, sendo nesta região que se observa a maior proporção de células em divisão (RIBEIRO, 2006). Ao deixarem a camada basal, os queratinócitos começam a se diferenciar e, durante a migração através do estrato espinhoso e granuloso, sofrem uma série de mudanças tanto na estrutura quanto na composição. Os queratinócitos sintetizam e expressam diferentes proteínas estruturais e lipídios durante a sua maturação. A última sequência da diferenciação dessas células

está associada a profundas alterações em sua estrutura resultando em células planas, achatadas e anucleadas que caracterizam as escamas cornificadas resistentes do estrato córneo (Figura 2). Esta camada altamente hidrofóbica consiste, portanto, de células diferenciadas chamadas corneócitos, que apresentam um envelope celular composto por proteínas e lipídios (LIRA, 2003).

Figura 2. Microfotografia da pele humana, destacando o estrato córneo pertencente à estrutura epidermal. (retirado de <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artaug02/gohisto.html>, acessado em 03 de março de 2013).



O estrato córneo é composto ainda por elementos do citoesqueleto, domínios intercelulares enriquecidos em lipídios e junções intercelulares chamadas desmossomas que interconectam os corneócitos. Esta camada de células não-viáveis atua, portanto, como principal obstáculo à permeação percutânea de substâncias químicas e microrganismos, além de resistir contra forças mecânicas e estar envolvida na regulação da liberação de água do organismo para a atmosfera, conhecida como perda de água transepidermal (SAPRA, JAIN, TIWANY, 2008).

Durante a diferenciação da epiderme, os lipídios são sintetizados nos queratinócitos e direcionados para os domínios extracelulares, onde formam as camadas extracelulares enriquecidas de lipídios. Durante os estágios finais da diferenciação, a queratina é alinhada em uma variedade de interações altamente organizadas e condensada com uma proteína da matriz: a filagrina. Esta proteína agrega os filamentos de queratina em feixes firmes. Isso promove o colapso da célula para a forma achatada que é característica dos corneócitos da camada cornificada. Juntas, queratina e filagrina

constituem 80% a 90% da massa protéica da epiderme dos mamíferos (DALLAN, 2005).

Em condições normais, o estrato córneo é um tecido relativamente seco, apresentando 15% a 20% de água em relação ao peso seco. Aproximadamente 25% a 35% da água presente no estrato córneo está interagindo com a queratina. A água restante está livre e disponível para agir como solvente para permeantes polares. Em razão disso, a hidratação desempenha um papel importante, principalmente no que se refere ao aumento da permeação de solutos, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos (WILLIAN, BARRY, 2004; DALLAN, 2005).

Devido à composição lipídica do estrato córneo, com a longa cadeia de ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol como principais classes, o comportamento da fase lipídica é diferente daquele em outras membranas biológicas. No estrato córneo, fases cristalinas estão predominantemente presentes. Entretanto, uma subpopulação de lipídios forma uma fase líquida. Tanto a natureza cristalina quanto a presença de uma fase lamelar de 13 nm de espessura são consideradas fundamentais para a função de barreira da pele (LIRA, 2003).

Os fatores que determinam as quantidades de solutos (especialmente fármacos) permeadas pela pele incluem a concentração, o tipo de carreador, a solubilidade relativa do composto no carreador e a permeabilidade da barreira apresentada pelo estrato córneo (MORGAN, RENWICK, FRIEDMANN, 2003).

A pele constitui a principal barreira entre o organismo humano e o meio ambiente. Apresenta importância fundamental na manutenção da homeostase corpórea, como controle de perda de água e proteção contra agentes químicos e físicos provenientes do meio ambiente. Sendo assim, a pele também representa a principal barreira a ser vencida pelos fármacos, principalmente devido à sua camada mais externa, o estrato córneo (DE SANTIS, 2008).

2.1.2. Vias de penetração de substâncias através da pele

A grande maioria dos fármacos é administrada oralmente. Entretanto, devido à biotransformação de primeira passagem pelo fígado, esta via de administração torna-se limitada para uma série de compostos. Em vista disso, observa-se que tem ocorrido recentemente um interesse crescente na administração de fármacos através da pele, tanto para o tratamento de doenças locais (via dérmica), bem como no nível sistêmico (via

transdérmica) (LIRA, 2003). Nesse sentido, a via dérmica apresenta-se como uma alternativa para a administração de princípios ativos, tendo atividade metabólica limitada (se comparada com a atividade metabólica hepática) e possibilitando um perfil de liberação contínua do fármaco administrado (DALLAN, 2005; TANNER, MARKS, 2008). Além disto, a via tópica é uma alternativa de interesse para a administração de fármacos devido a fatores tais como uma elevada taxa de adesão e facilidade de interrupção da administração (DE SANTIS, 2008).

Desde a introdução de um sistema de liberação transdérmico para a escopolamina, em 1981, novas moléculas foram sugeridas para essa via de administração, tais como: fentanil, lidocaína, prilocaína, nitroglicerina, estradiol, etinilestradiol, acetato de testosterona, clonidina, nicotina, entre outras. Entretanto, algumas características importantes devem ser observadas para uma liberação e permeabilidade adequadas de solutos (especialmente fármacos), tais como lipofilicidade suficiente para se difundir no estrato córneo e hidrofiliabilidade suficiente para atingir a epiderme viável e a circulação sistêmica, quando desejável, carga elétrica, massa molecular, ponto de fusão, dose e frequência de administrações diárias (THONG, ZHAIN, MAIBACA, 2007).

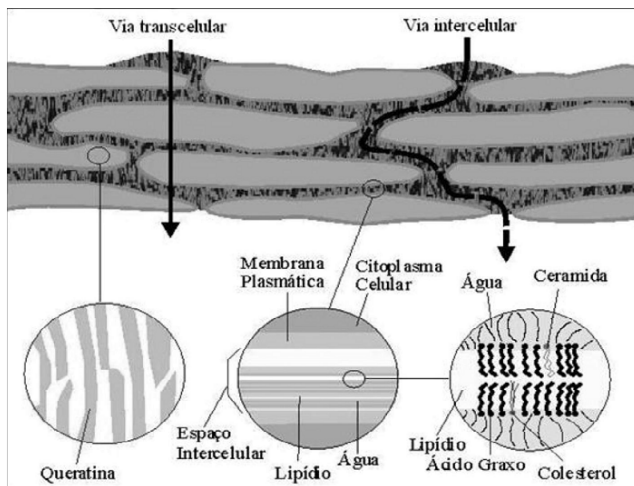
As restrições encontradas nesta via de administração são principalmente pelo fato de a pele possuir a característica de barreira, limitando bastante a absorção dos fármacos. Para absorção dos princípios ativos, os mesmos deverão ter potência adequada, visto que a pele tem a capacidade de absorção de até 10 mg/dia. O fármaco deve ainda possuir baixo peso molecular, boa solubilidade em água e óleo e, principalmente, não ser irritante (LIRA, 2003).

Considerando essas características, os compostos químicos podem se difundir utilizando as vias descritas abaixo e ilustradas na figura 3.

A via denominada transcelular permite a difusão de compostos através das células do estrato córneo, mais precisamente através dos feixes de queratina localizados dentro dos corneócitos (LIRA, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A passagem de moléculas também pode ocorrer pela via intercelular, ou seja, através do cimento intercelular, e através deste, duas vias são possíveis para a difusão de substâncias, a via polar e a via lipídica (SIMÕES, 2013). Na via polar, o mecanismo de penetração dos fármacos consiste em causar uma mudança na proteína ou na intensificação da ação do solvente. Já na via não-polar, a permeação está baseada na alteração da rigidez da estrutura lipídica e sua consequente fluidização (DALLAN, 2005; LIRA, 2003).

Figura 3. Representação esquemática das vias de penetração de solutos através da pele (GRATIERI, GELFUSO, LOPES, 2008).



A função de barreira do estrato córneo pode ser modificada através de diversas técnicas e substâncias. O aumento da permeabilidade da pele para vários fármacos pode ser conseguido mediante a co-administração de promotores químicos de permeação ou pelo uso de promotores físicos como a iontoforese, a sonoforese ou a electroporação (SIMÕES, 2013).

A pele, no entanto, pode ser facilmente danificada por ação mecânica, agentes químicos e biológicos, e por radiação. O tecido pode sofrer cortes, contusões, queimaduras, mordidas e picadas. Detergentes, resíduos químicos, solventes e poluentes atacam e penetram na superfície da pele. Microrganismos e plantas liberam compostos alergênicos de contato. Além disto, muitas doenças podem afetar a pele (AULTON, 2005).

As queimaduras da pele ocasionam lesões importantes destruindo a superfície cutânea a partir de agente externo, variando desde uma pequena vesícula, bolha ou erosão, a perdas mais profundas ou largas capazes de desenvolverem muitas respostas sistêmicas (MÉLEGA, 2002).

2.2. Queimaduras

A queimadura representa um evento que acompanha a humanidade desde os tempos remotos, porém com a utilização difundida do fogo nas diferentes culturas os acidentes passaram a ser cada vez mais comuns. As queimaduras, no entanto, devem-se não somente à ação do fogo mas também à ação de produtos químicos, radiações ionizantes e até mesmo ao frio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; ROCHA, 2009). Os agentes geradores das lesões térmicas são líquidos, vapores, sólidos aquecidos, produtos inflamáveis, contato direto com chamas, radiações não ionizantes e o frio, já os agentes responsáveis por queimaduras complexas são fricção mecânica, eletricidade, radiações ionizantes como raios X, radiação alfa, radiação beta, radiação gama e produtos químicos.

A maior incidência de queimaduras acontece predominantemente no sexo masculino, em faixas etárias distintas, é em crianças a maior frequência encontra-se na faixa etária de até 6 anos de idade, sendo o maior causador de queimaduras os escaldamentos, com predominância de 60% dos acidentes ocorridos na cozinha (ROCHA, 2009).

De acordo com Palhares (2010), as queimaduras desestabilizam a integridade funcional da pele e sua homeostase hidroeletrolítica, além de modificarem o controle da temperatura interna e a flexibilidade e lubrificação da superfície corporal, sendo que estas alterações podem ser mais severas de acordo com a profundidade das lesões.

Com a lesão térmica o colágeno fica exposto e, por conseguinte, há ativação e liberação de histamina pelos mastócitos. Com a liberação da histamina ocorre o aumento da permeabilidade capilar, com a passagem do infiltrado plasmático para o interstício dos tecidos lesionados, acarretando edema tecidual e hipovolemia. Outro sistema ativado é o da calicreína que, por sua vez, produz cininas que auxiliam no aumento da permeabilidade capilar agravando o edema e a hipovolemia. As cininas e a exposição do colágeno são os fatores responsáveis pela ativação do sistema fosfolipase e do ácido araquidônico que originará as prostaglandinas E2, aumentando a vasodilatação, e resultando na dor. Concomitantemente, a via tromboxane é ativada e, junto com a plasmina e trombina circulantes, formam o tampão nas paredes capilares resultando num aumento na pressão hidrostática de até 250%, contribuindo assim para o edema tecidual (MÉLEGA, 2002; PALHARES, 2010).

Segundo Palhares (2010) e MENEZES (2006), nas lesões superiores a 40% da superfície corporal, além das evidências inflamatórias locais há uma resposta sistêmica com o surgimento de febre, circulação sanguínea hiperdinâmica e ritmo metabólico

acelerado, aumento do catabolismo muscular oriundo da alteração hipotalâmica, aumento da secreção de glucagon, cortisol e catecolaminas, e diminuição da barreira para a corrente sanguínea.

2.2.1. Classificação

As queimaduras são classificadas de acordo com a extensão da superfície corpórea queimada, sendo esta calculada em porcentagem da área total queimada. Além da área queimada, deve-se observar a profundidade das queimaduras, que podem ser de primeiro, segundo e terceiro grau (ROCHA, 2009).

- Queimaduras de primeiro grau: a epiderme, camada mais externa da pele é atingida, sendo que estas lesões não geram alterações hemodinâmicas, pelo fato da não vascularização epitelial. São caracterizadas clinicamente pela dor e pelo eritema local.
- Queimaduras de segundo grau: a epiderme, a derme e partes dos anexos cutâneos são afetados, apresentando os sinais e sintomas das queimaduras de primeiro grau, porém há a presença de vesículas ou bolhas superficiais ou profundas, sendo que nas superficiais não há sequelas e a cicatrização é totalizada em até 14 dias, enquanto que nas profundas a revitalização pode chegar a demorar 35 dias podendo ocasionar cicatrizes com resultado estético insatisfatório.
- Queimaduras de terceiro grau: todas as camadas da pele são atingidas nesta classificação de queimaduras, que provocam lesões profundas atingindo fibras musculares e podendo atingir até alguns tecidos ósseos subjacentes. Estas lesões são assintomáticas e indolores e não há reepitelização, ocasionando perda dos anexos epidérmicos e das terminações nervosas epidérmicas e dérmicas. O diagnóstico clínico é através do aspecto da lesão que apresenta superfície endurecida, podendo expor por transparência vasos sanguíneos lesionados (VALE, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; ROCHA, 2009).

2.2.2. Principais tratamentos de queimaduras no Brasil

Há relatos datados de 1500 a.C. sobre as técnicas de tratamento das queimaduras. No século XVIII, preconizava-se o uso de água gelada para minimizar a dor e o edema. Apesar destas lesões serem tratadas à séculos, somente no século XX se iniciou o estudo fisiopatológico das mesmas, onde se envolveu a bioquímica das lesões e sua evolução (PALHARES, 2010).

A partir dos anos 60 deu-se preferência ao tratamento empregando curativos oclusivos. A partir da década de 70 iniciou-se o tratamento com enxertos e extensores de pele (MÉLEGA, 2002; PALHARES, 2010). Os substitutos temporários de pele são materiais eficazes no tratamento de queimaduras superficiais recentes e também na cobertura da pele enquanto se aguarda o enxerto definitivo (FERREIRA *et al.*, 2003).

Especificamente para o caso do tratamento de queimaduras, existem atualmente no mercado cerca de 120 tipos de produtos constituídos de diversos materiais, dentre os quais se encontram os curativos Bioclusive e Silicone n-a (Johnson & Johnson), Geliperm sheet (Geitlich Ltd.), Granuflex (ConvaTec Ltd.), Jelonet e Opsite flexigrid (Smith & Nephew Medical Ltd.), Paratulle (Seton Healthcare Group plc), Spenco 2ndin (Spenco Medical (UK) Ltd.), Tegaderm e Tegapore (3M Health Care Ltd.), Vigilon (Bard), Omiderm (Omiderm Ltd.), além de uma linha de produtos produzidos pela Hyperion Medical (hidrogéis, hidrocolóides, filmes, etc), dentre outros. Deve-se salientar que todos os produtos anteriormente citados são importados.

Em 2003, um biomaterial do tipo hidrogel reforçado com fibras de polipropileno para uso em queimaduras foi desenvolvido no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP, São Paulo/SP, Brasil) e no Instituto de Pesquisas e Energia Nuclear (IPEN, São Paulo/SP, Brasil) (VASCONCELOS, 2003).

Ainda em território nacional, a empresa Bionext - Produtos Biotecnológicos (São Paulo/SP), em parceria com pesquisadores do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP, Campus Araraquara/SP) e do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP, Campus São Carlos/SP), desenvolveu um curativo de celulose produzida pela bactéria *Acetobacter xylinum* para o tratamento de queimaduras. Este curativo chegou a ser comercializado em hospitais, durante algum tempo, mas entretanto e por motivos comerciais, teve sua distribuição interrompida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Apesar da diversidade de materiais disponíveis no mercado destinados ao tratamento de queimaduras, normalmente o custo do tratamento é bastante elevado, principalmente devido ao custo dos curativos e à necessidade de sua frequente troca.

O principal objetivo dos tratamentos e medicamentos desenvolvidos para queimaduras consiste na redução da dor local, em impedir a incidência de hemorragia e em favorecer o surgimento ou restauração tecidual e, com isso, proporcionar ao paciente uma melhor qualidade de vida, acarretando assim uma adesão maior ao tratamento e diminuindo o tempo de internação em casos necessários (ALBUQUERQUE *et al.*, 2010).

No combate às infecções locais secundárias ligadas a queimaduras associa-se curativos oclusivos, antibióticos na forma de cremes, pomadas e soluções. Entre tais produtos destacam-se aqueles que empregam antibióticos como a sulfadiazina de prata a 1%, sulfametoxazol trimetoprima, polimixina B e neomicina. Outros cremes também utilizados são aqueles contendo acetato de sulfanamida 10%, gentamicina 0,1% e nitrofurazona 0,2% (FERREIRA, BRANDÃO, SILVA, 2003).

2.3. Nitrofurazona

A nitrofurazona foi o primeiro derivado nitrofurânico introduzido na clínica médica, em 1946, para o tratamento por via oral de infecções bacterianas e para o tratamento da Doença de Chagas. Os nitrofuranos ou derivados do 5-nitrofurfural são substâncias que contêm um grupamento nitroso na posição cinco do anel do furano, e que apresentam atividade antibacteriana e exercem atividade contra certos protozoários e fungos. O uso da nitrofurazona promoveu, porém, diversos efeitos tóxicos graves (como por exemplo, mutagenicidade e em alguns casos carcinogenicidade). Além disto, os resultados para o tratamento da Doença de Chagas não obtiveram resultados satisfatórios (TAVARES, 2001).

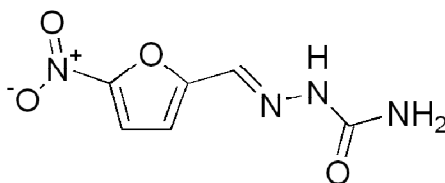
A nitrofurazona apresenta elevada toxicidade quando administrada por via oral, por razão da hemólise, sendo responsável por causar graves problemas de neuropatias. Assim, a via tópica continua sendo a via de escolha para o tratamento de infecções cutâneas, queimaduras e úlceras, principalmente aquelas resistentes a outros fármacos (BOSQUESI, 2009).

Deste modo, a nitrofurazona para utilização humana tem seu emprego dirigido ao uso tópico para o tratamento de feridas e lesões infectadas da pele e mucosas. Apresenta largo espectro de ação agindo contra vários microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, entretanto, seu mecanismo de ação não está perfeitamente esclarecido. Sua atividade desinfetante favorece a cicatrização no tratamento de feridas produzidas por

traumatismo, queimadura ou intervenção cirúrgica. Também pode ser utilizada no tratamento de contaminações bacterianas, causadas por rejeição, ou infecções hospitalares epidêmicas, infecções piodérmicas e úlceras cutâneas. Exerce ação bacteriostática, na maioria das bactérias, em uma faixa de concentração de 1:100.000 a 1:200.000, e bactericida em concentrações duas vezes superiores (HARDMAN & LIMBIRD, 2003). A nitrofurazona não sofre absorção significativa através da pele íntegra ou queimada, nem a partir de membranas mucosas, o que dá suporte ao seu uso tópico (JOHNSON, DELAVARI, AZAR, 1999).

A nitrofurazona possui nome químico 2-[(5-nitro-2-furanil)metileno] hidrazinacarboxamida, fórmula molecular $C_6H_6N_4O_4$. A sua fórmula estrutural pode ser visualizada na figura 4. A nitrofurazona apresenta, como principais características, cor entre o amarelo-limão e o amarelo escuro; ausência de odor; sabor amargo ao paladar; pH 5,0 a 7,4 em suspensão aquosa a 1%, e pH 6,0 a 6,5 em solução aquosa saturada; sensibilidade à luz, escurecendo lentamente quando exposta a ela, e temperatura de fusão de 236 °C (KLEEMANN, ENGEL, KUTSCHER, 2001; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2005; TRISSEL, 2009; BRITISH PHARMACOPEIA, 2010).

Figura 4. Fórmula estrutural da nitrofurazona.



A nitrofurazona sofre degradação por ação da luz, sendo rapidamente transformada em um composto “syn-isômero”, o qual é degradado, gerando uma série de compostos de degradação corados, instáveis e de difícil caracterização (DE LUCA *et al.*, 2010). Entretanto, segundo Trissel (2009), o escurecimento sob exposição à luz não afeta a sua potência.

Em função de seu vasto uso, não somente para uso humano, vários métodos são descritos na literatura para a análise da nitrofurazona em fármacos e medicamentos, tais como métodos espectrofotométricos (AGRAWAL & PATEL, 1986; SASTRY *et al.*, 1992; WALASH, EL-BRASHY, SULTAN, 1993; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2005; BRITISH PHARMACOPEIA, 2010), cromatográficos

(SHAHJAHAN & SHALABY, 1998; LUNN, 2000; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2005) e voltamétricos (MISHRA & GODE, 1985; MORALES, RICHTER, TORAL, 1987; REDDAY & REDDY, 1992; KHODARI, MANSOUR, MERSAL, 1999) e outros como queluminescência (DU *et al.*, 2007) e reflectância difusa (TUBINO, VILA, PALUMBO, 2009).

2.3.1. Formas farmacêuticas contendo nitrofurazona

As especialidades farmacêuticas comercialmente disponíveis estão na forma de solução tópica e pomada a 0,2 % (DEF 2012/2013; KLEEMANN, ENGEL, KUTSCHER, 2001). Entretanto, pomadas contendo nitrofurazona a 0,2%, quando aplicadas no tratamento de queimaduras, podem causar dor. Pomadas de nitrofurazona apresentam ainda, como efeito adverso mais frequentemente relatado, ocorrendo em cerca de 1% dos pacientes tratados, dermatite de contato. O polietilenoglicol (PEG), normalmente presente em pomadas de nitrofurazona, pode ser absorvido através da pele injuriada podendo provocar danos renais, em especial aos néfrons, em casos de uso em excesso (NORORONHA & ALMEIDA, 2000; FERREIRA *et al.*, 2003).

O uso de preparações na forma de géis pode proporcionar formulações com características refrescantes, em função da baixa oleosidade, com boas características de espalhamento e rápida absorção de princípios ativos. No entanto, poucos são os trabalhos que apresentam formulações à base de géis contendo nitrofurazona, pelo fato da formulação apresentar uma estabilidade relativa aquém quando comparada a pomadas e cremes (FAULKNER *et al.*, 1997). Em outros trabalhos científicos, verificam-se estudos de inclusão da nitrofurazona em complexos com ciclodextrinas (MELO *et al.*, 2007) e quitosana, ou ainda a preparação de filmes poliméricos contendo nitrofurazona (KIM *et al.*, 2008; COELHO, 2012), visando alternativas de preparações farmacêuticas tópicas para utilização da nitrofurazona.

2.4. Formas farmacêuticas tópicas

Pomadas, cremes e géis são formas farmacêuticas semisólidas destinadas à aplicação tópica, com ação sistêmica ou local. Estes produtos podem ser aplicados sobre a pele, na superfície do olho ou ainda serem utilizados por via retal, vaginal e nasal. Pomadas, cremes e géis podem ser utilizados pelos efeitos de seus ingredientes ativos

ou por efeitos físicos com ação protetora e lubrificante (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007).

Dentre as principais formas farmacêuticas destinadas ao uso tópico, os géis apresentam características interessantes tais como capacidade refrescante e aparência elegante. Os géis são definidos como sistemas semisólidos constituídos por dispersões de pequenas partículas inorgânicas ou de grandes moléculas orgânicas interpenetradas por um líquido. Os géis também são definidos como um sistema solvente-polímero, que contém uma rede tridimensional de ligações bastante estáveis, que dificilmente são afetadas por alterações térmicas. Um alto grau de reticulação química ou física pode estar envolvido. O aumento da viscosidade causado pelo entrecruzamento e consequente fricção interna é responsável pelo estado semi-sólido (ZATZ & KUSHLA, 1996; ALLEN *et al.*, 2007). Segundo a farmacopéia brasileira (2010), géis são formas farmacêuticas semisólidas de um ou mais princípios ativos que contêm um agente gelificante para fornecer firmeza a uma solução ou dispersão coloidal (um sistema onde partículas de dimensão coloidal, tipicamente com dimensões entre 1 nm e 1 µm, são distribuídas através do líquido).

A consistência semisólida dos géis é decorrência da presença de agentes gelificantes, sendo na maioria sua concentração em geral, de 0,5% a 2% (ALLEN *et al.*, 2007).

Os géis podem ser classificados em lipofílicos e hidrofílicos. O gel lipofílico é resultante da preparação obtida pela incorporação de agentes gelificantes como tragacanta, amido, derivados de celulose, polímeros carboxivinílicos e silicatos duplos de magnésio e alumínio, em água, glicerol ou propilenoglicol. Os géis ditos hidrofóbicos consistem, geralmente, de parafina líquida com polietilenoglicol ou óleos gordurosos com sílica coloidal ou sabões de alumínio ou zinco (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Evidentemente, a análise criteriosa de todos os componentes presentes no gel deve ser realizada, visto serem agentes interferentes sobre a estabilidade, viscosidade e compatibilidade, assim como sobre a eficácia na permeação dos princípios ativos na pele (LIRA, 2003).

2.5. Sistemas de liberação de substâncias ativas para uso tópico

Os sistemas de liberação de fármacos têm despertado a atenção de inúmeros pesquisadores nos últimos 10 anos, em função das vantagens que podem gerar para a saúde humana (MARCATO & DURAN, 2008).

Sistemas de liberação de fármacos podem ser obtidos como modificações farmacotécnicas com emprego de vetores/carreadores que permitem alterar propriedades cinéticas ou dinâmicas de um fármaco com otimização tanto da velocidade de cedência como do regime de dosagem das substâncias, permitindo assim uma liberação controlada dos princípios ativos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; CORREIA, 2005). Considerando a via de administração cutânea e a liberação de substâncias ativas na epiderme, existe em muitos casos o interesse de maximizar o tempo de permanência do composto na pele, minimizando a sua absorção transdérmica (ALENCASTRE, 2002).

A liberação sustentada mostra-se importante para substâncias ativas que são irritantes em concentrações elevadas, para suprir a pele por um período de tempo prolongado e para reduzir a absorção sistêmica. Embora o local de ação da maior parte dos cosméticos e fármacos de ação tópica seja a superfície da pele, para respeitar este princípio, é necessário uma escolha criteriosa do sistema de liberação. Substâncias tais como filtros solares, antissépticos e antibióticos, por exemplo, devem manter-se sobre a pele. Já outros princípios ativos tais como clareadores e agentes anti-envelhecimento, devem atuar na derme (ALENCASTRE, 2002).

O termo liberação controlada implica na predição e na reprodutibilidade da cinética de liberação de um fármaco, sendo que os vários sistemas de liberação controlada podem ser agrupados de acordo com os vetores/carreadores empregados. Dentre as estruturas empregadas, incluem-se os lipossomas, as micropartículas (microcápsulas e microesferas) e as nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas) (ALENCASTRE, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

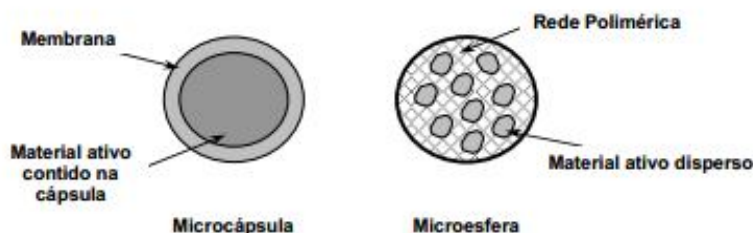
Os lipossomas são estruturas vesiculares coloidais formadas por bicamadas lipídicas que podem ser definidos como associações coloidais de lipídeos anfipáticos. São vesículas esféricas, com diâmetros em torno de 0,003 μm a 10 μm , compostas de moléculas constituídas por uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. Dentro das vesículas (núcleo hidrofílico) podem ser incorporados fármacos solúveis em água, enquanto que dentro das membranas podem ser incorporados fármacos solúveis em lipídeos (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007; GERALDO, 2008).

A expressão micro/nanopartículas é utilizada de acordo com o tamanho das partículas. As micropartículas são pequenas partículas sólidas e esféricas com tamanho

que varia entre 1 μm e 1000 μm . As nanopartículas são definidas como partículas de tamanho inferior a 1 μm , caracterizando um sistema coloidal (KAYSER, 2005; CABRAL, 2004; SILVA *et al.*, 2003).

O termo micro/nanopartículas, quando aplicado à liberação controlada de fármacos refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, micro/nanoesferas e micro/nanocápsulas. Os sistemas denominados esferas integram o fármaco homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica, obtendo-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. As micro/nanocápsulas constituem sistemas do tipo reservatórios, onde é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. As micro/nanopartículas podem ser constituídas de diferentes materiais biodegradáveis como polímeros naturais ou sintéticos, lipídios ou fosfolipídios. O fármaco pode ser integrado na matriz ou ligado à superfície das partículas (KAYSER, 2005). Na microencapsulação forma-se um núcleo que contém o composto ativo, protegido por uma membrana do agente encapsulante. Nas microesferas o composto ativo encapsulado está disperso por toda a rede polimérica, formando geralmente um composto homogêneo conforme ilustrado na figura 5 (PARIZE, 2009).

Figura 5. Representação esquemática evidenciando as diferenças entre microcápsulas e microesferas (MADENE *et al.*, 2006).



O formato dos sistemas de liberação depende de mecanismos físico-químicos pelos quais o composto foi encapsulado, portanto de acordo com o procedimento de

encapsulação empregado. A matriz de encapsulação poderá apresentar diferentes formas (filmes, esferas, partículas irregulares), diferentes micro-estruturas (porosas ou compactas) e diferentes estruturas físicas (sólidas amorfas ou cristalinas, matriz borrachosa ou vítrea) que influenciam diretamente na liberação do material ativo ou na estabilidade do produto durante o armazenamento (AGUILERA, 2005; PARIZE, 2009).

2.6. Microencapsulação

A microencapsulação é um processo pelo qual substâncias sólidas, líquidas e até gasosas podem ser encerradas no interior de partículas microscópicas pela formação de uma fina camada ao redor da substância. As cápsulas formadas podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007; FAVARO-TRINDADE, PINHO, ROCHA, 2008).

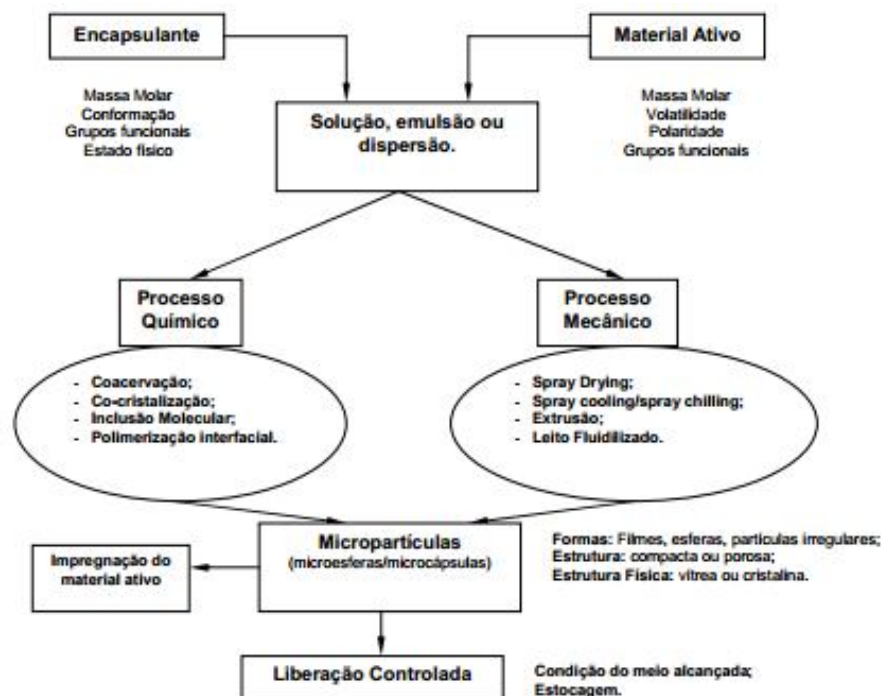
A tecnologia da microencapsulação tem sido utilizada em diversas indústrias, como na agrícola, alimentar, de produtos domésticos, médica, gráfica e cosmética. Na indústria farmacêutica, as aplicações são variadas indo desde o mascaramento de sabores ou odores, conversão de líquidos em sólidos, proteção em relação aos agentes atmosféricos (umidade, luz, calor e/ou oxidação), redução ou eliminação da irritação gástrica ou efeitos secundários provocados por alguns fármacos, redução da volatilidade, administração de fármacos incompatíveis, melhoramento das características de escoamento de pós, facilitação do manuseio de substâncias tóxicas, auxílio à dispersão de substâncias insolúveis em água em meios aquosos, até à produção de formas farmacêuticas de liberação controlada, sustentada e vetorizada (SILVA *et al.*, 2003). O processo de microencapsulação tem favorecido a redução da perda de compostos devido a fatores físicos e químicos que ocasionalmente diminuem a funcionalidade biológica, degradação química e liberação antecipada ou incompleta da substância ativa, além de aprimorar a qualidade do produto final, aparência, condição de armazenamento, uma maior adesão do paciente ao tratamento por proporcionar em alguns casos uma melhoria das características sensoriais quando existe uma escolha correta do agente de microencapsulação (PARIZE, 2009).

Há uma grande variedade de métodos para a obtenção e preparação de microesferas e microcápsulas poliméricas, que permitem a incorporação de fármacos hidrossolúveis ou lipossolúveis. A seleção destas técnicas depende da aplicação que será dada à microcápsula, do tamanho desejado, do mecanismo de liberação e das

propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante. Adicionalmente, para a escolha do método mais adequado deve-se considerar ainda a simplicidade, reprodutibilidade e exequibilidade do aumento de escala (FAVARO-TRINDADE, PINHO, ROCHA, 2008; SEVERINO *et al.*, 2011). A escolha do método de microencapsulação é orientada pelas propriedades físicas e químicas tanto do princípio ativo como do agente encapsulante, assim como pelo propósito da aplicação do composto. Na Figura 6 encontram-se representados de forma esquemática diferentes processos de microencapsulação (PARIZE, 2009).

As principais técnicas empregadas para a veiculação dos princípios ativos incluem métodos mecânicos e físico-químicos que usam extrusão/solidificação, emulsificação/solidificação por extração e/ou evaporação do solvente, e coacervação. Vários polímeros também podem ser utilizados na produção de micropartículas, e sua escolha depende da aplicação requerida (SILVA *et al.*, 2004; SEVERINO *et al.*, 2011).

Figura 6. Representação esquemática de diferentes processos de microencapsulação (PARIZE, 2009).



2.6.1. Métodos mecânicos de microencapsulação

A preparação de micropartículas por métodos mecânicos baseia-se na utilização de dispositivos injetores, estacionários ou giratórios, podendo realizar-se por atomização, fusão ou fluidização (SEVERINO *et al.*, 2011).

O processo de atomização, também conhecido por *spray-drying*, é o método mecânico mais utilizado. O fármaco, em solução ou dispersão, é nebulizado juntamente com o material revestidor solubilizado ou fundido. Isto é feito em uma câmara de evaporação, causando a rápida solidificação das gotículas e originando as micropartículas (CABRAL, 2004).

O método que emprega fusão também é denominado *spray-congealing*. Este método baseia-se na transformação de gotículas do polímero fundido em micropartículas sólidas por congelamento. Neste método, o polímero é previamente submetido a um processo de fusão, seguindo-se a dissolução ou dispersão do princípio ativo na massa fundida. Esta é posteriormente atomizada numa câmara, na qual circula uma corrente de ar frio ou um gás previamente arrefecido (PEREIRA, 2012).

Na fluidização, as partículas sólidas de fármaco são suspensas numa corrente de ar quente ascendente formando um leito fluidizado. As partículas são revestidas por nebulização de uma solução do polímero adequado (SILVA *et al.*, 2003). Pode também

utilizar-se revestimento em turbinas, o qual consiste em revestir núcleos sólidos através da pulverização do material de revestimento, com fácil remoção do solvente pela corrente de ar.

2.6.2. Métodos físico-químicos de microencapsulação

Os métodos físico-químicos empregados para a obtenção de micropartículas podem empregar extrusão/solidificação, emulsificação/solidificação por extração e/ou evaporação do solvente e coacervação.

Denomina-se coacervação o fenômeno que envolve a dessolvatação de um polímero e a sua separação da solução polimérica, em duas fases líquidas imiscíveis entre si. Neste método, uma das fases torna-se mais densa, uma vez que fica relativamente concentrada em polímero, enquanto que a outra fase está praticamente isenta de polímero. Este método origina microsferas ou microcápsulas, quando o princípio ativo se encontra disperso sob a forma de partículas sólidas ou dissolvido num óleo imiscível com a solução polimérica, respectivamente. A dessolvatação do polímero pode ser induzida por mudança de temperatura, por alteração do pH, por adição de um sal, de um “não-solvente” do polímero ou de um polímero incompatível com a solução polimérica (SILVA *et al.*, 2003; SEVERINO *et al.*, 2011). Os processos de coacervação podem ser divididos em simples (por mudança no pH, força iônica, ou temperatura) ou complexos (por complexação entre dois polieletrólitos de carga oposta) (CABRAL, 2004).

No método de extrusão, o material do núcleo na forma líquida, fundido ou em solução, é lançado através do orifício de um tubo fino ou seringa para formar microgotas, cujo tamanho será dependente do diâmetro do orifício e da velocidade de saída do material. A solidificação do material de revestimento pode ocorrer por evaporação do solvente, difusão do solvente ou por reação química (SILVA *et al.*, 2004).

Podem-se também preparar micropartículas por formação prévia de uma emulsão, cuja fase interna, na forma de microgotas, é solidificada originando as micropartículas. A solidificação pode ocorrer por processos muito variados, tais como secagem em fase líquida, extração de solvente, reticulação química e térmica, interação iônica, entre outros (SILVA *et al.*, 2004; SEVERINO *et al.*, 2011).

2.6.3. Polímeros utilizados na obtenção de micropartículas

Existe uma ampla gama de opções de matérias primas para utilização como agentes poliméricos na fabricação de diferentes formas farmacêuticas (VILLANOVA, ORÈFICE, CUNHA, 2010). Os polímeros são constituintes praticamente indispensáveis na preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos, devido a fatores como a facilidade e baixo custo de obtenção assim como a biocompatibilidade (REDESCHI, 2006).

Os polímeros utilizados nos produtos farmacêuticos são classificados em (i) polímeros sintéticos (distinguindo-se entre biodegradáveis e não degradáveis), (ii) polímeros naturais, e (iii) polímeros naturais modificados.

Os polímeros naturais são sempre biodegradáveis, podendo citar-se como exemplos o colágeno, a celulose e a quitosana, sendo muito utilizados como matrizes em sistemas de liberação de fármacos. Os polímeros naturais modificados são obtidos por adição de grupos polares às cadeias poliméricas, com o objetivo de diminuir o tempo de degradação. Exemplos deste tipo de modificações podem ser a reticulação de gelatina utilizando-se formaldeído, a reticulação de quitosana utilizando-se glutaraldeído, entre outros. Modificações enzimáticas também são utilizadas, como por exemplo a modificação de quitosana por tirosinase (CABRAL, 2004).

Os polímeros sintéticos têm sido bastante utilizados na obtenção de micropartículas, em função da versatilidade que proporcionam, permitindo obter micropartículas com perfis de liberação de princípio ativo específicos e possibilitando assim a sua administração por diversas vias (SEVERINO *et al.*, 2011).

Dentre os diversos polímeros naturais utilizados na elaboração de produtos farmacêuticos, podemos destacar as gomas (xantana, dextrana, pululana, gelana, logusta, carragena), quitosana, pectina, alginato, sulfato de condroitina, gelatina, dextrina, hialuronana e polilisina. Exemplos de polímeros sintéticos incluem (não se limitando a) bisacrilamida, poli(acrilamida) (PAm), PEG, PVA, PAA, poli(ácido metacrílico) (PMAA), poli(acrilato de butila) (PBA), poli(metacrilato de metila) (PMMA), poli(N-isopropil acrilamida), PVP, poli(fosfazona), PLA, PCL, poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA), poli(oligo(óxido de etileno) monometiléter metacrilato) (POEOMA) contendo ligações covalentes cruzadas por grupos tióis e copolímeros diversos (VILLANOVA, ORÈFICE, CUNHA, 2010).

Os alginatos são polissacarídeos derivados do ácido algínico, que por sua vez é obtido principalmente a partir de algas marinhas da espécie *Laminaria*. Este biopolímero pertence à classe dos copolímeros binários, contendo ligações 1-4 de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), de larga variação na composição e estrutura sequencial (MOE, *et al.*,1995; OGAJI, NEP, AUDU-PETER, 2012).

Os alginatos possuem propriedades coloidais singulares tais como compactação, estabilização, suspensão, formação de filme, formação de gel e emulsões. Os alginatos possuem uma característica exclusiva, que é a sua capacidade para reagir com cátions polivalentes, especialmente íons cálcio, resultando assim em géis fortes ou polímeros insolúveis. Sais compostos por íons monovalentes (sódio, potássio, amônio) formam alginatos solúveis em água, já os formados por íons multivalentes (cálcio, cromo, bário, alumínio) formam alginatos insolúveis em água. A estrutura do gel de alginato não depende apenas da concentração empregada e da estrutura química do material do gel, porém ela é dependente também da cinética utilizada na formação do mesmo, que está diretamente ligado a concentração de cátions, da força iônica e do pH (SANTANA, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1.Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar características físico-químicas e reológicas, fotoestabilidade e atividade antimicrobiana de um gel para aplicação tópica contendo nitrofurazona na forma microencapsulada.

3.2. Objetivos específicos

- Preparar de micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada, com definição da técnica mais adequada;
- Avaliar características físico-químicas das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada;
- Preparar de formulação farmacêutica na forma de gel com nitrofurazona microencapsulada estabelecendo a formulação mais adequada;
- Avaliar a estabilidade do gel produzido considerando viscosidade, fotoestabilidade e teor de nitrofurazona;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do gel produzido integrando micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e consumíveis

Todos os reagentes utilizados neste trabalho de pesquisa foram de grau de pureza farmacêutico ou PA, tendo sido utilizados sem qualquer tipo de purificação adicional. A água utilizada foi purificada num sistema Milli-Q Elga Purelab (Molsheim, França) até uma condutividade final de cerca de $18.2 \text{ M}\Omega.\text{cm}^{-1}$. O alginato de sódio (baixa

viscosidade) com teor de base seca de 90,8%-106,0%, lote 1000896, e o alginato de sódio (alta viscosidade), com teor de base seca de 90,8%-106,0%, lote 0805920, foram adquiridos à Vetec Química fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil); O Aristoflex® AVC, lote GBG0008741, foi adquirido à PharmaSpecial - Especialidades Químicas e Farmacêuticas Ltda (Santana de Parnaíba, Brasil); O cloreto de cálcio (anidro, em pó, PA, lote 07060931) foi adquirido à CAQ – Casa da Química (Diadema, Brasil); A nitrofurazona (C.A.S. 59-87-0, fórmula molecular $C_6H_6N_4O_4$), com teor em base anidra igual a 97,3%, de origem chinesa, foi gentilmente doada pela empresa Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (São Paulo, Brasil). O polietilenoglicol 300 (lote 110217C914C2), o propilenoglicol (lote TQ9502109062) e o Nipagin™ (metilparabeno, lote 81239) foram adquiridos à Labsynter - Produtos para laboratório Ltda (Diadema, Brasil). O Nipazol™ (propilparabeno, lote KI0701) adquirido à Natural Pharma Química Ltda (São Paulo, Brasil).

4.2. Equipamentos

Os equipamentos científicos utilizados incluíram uma balança analítica da marca Tecnal (modelo SHI-AUY-220, Kyoto, Japão), uma balança analítica da marca Explorer Ohaus (modelo 220, Newark, EUA), um espectrofotômetro da marca Multispec (modelo 1501, São Paulo, Brasil), um espectrofotômetro da marca Gold Spectrumbiolab (modelo 53, Pequim, China), um viscosímetro da marca Brookfield (modelo Dv – I prime, EUA), uma lâmpada UV da marca Mineralight Lamp (modelo UVGL-58 (254 nm), Berlim, Alemanha), um agitador magnético da marca Fisaton (modelo 752 A, São Paulo, Brasil), uma pistola de pintura da marca Mac Loren (modelo P-100, Garça, Brasil), um tamis da marca Ber Tel (modelo 180 mm, Caieiras, Brasil), um homogeneizador Ultra-Turrax da marca IKA Hielscher Ultrasonics (modelo 50, Berlim, Alemanha), uma incubadora da marca American Lab (AL-140, Charqueada, Brasil), um liofilizador da marca Thermo Fisher (modelo 110, San José, EUA), uma estufa da marca Fanem (modelo 515 A, Guarulhos, Brasil), uma placa aquecedora da marca Fisaton (modelo 752 A, São Paulo, Brasil), um ultrapurificador de água da marca MilliQ (modelo Elga purelab, Molsheim, France), uma bomba de vácuo da marca Primatec (modelo 131, Itu, Brasil), um microscópio ótico da marca Olympus (modelo CH30RF 100, Tóquio, Japão), um microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL (modelo JSM-63660, Tóquio, Japão), um espectrômetro de absorção na região do infravermelho

com transformada de Fourier da marca Bomem (modelo MB100, Zurique, Suíça), um calorímetro diferencial de varredura (DSC) da marca TA Instruments (modelo MDSC 2910, EUA), e um termogravímetro (TGA) da marca TA Instruments (modelo 2050, EUA).

4.3. Métodos experimentais

4.3.1. Preparação de micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada

Foram preparadas partículas contendo nitrofurazona através dos métodos de emulsão/solidificação e extrusão/solidificação, sendo os procedimentos seguidos explicitados nas seções 4.3.1.1. e 4.3.1.2., respectivamente.

4.3.1.1. Preparação de micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada por emulsão/solidificação

A preparação das micropartículas com nitrofurazona encapsulada através da técnica de emulsão/solidificação empregou os componentes listados na Tabela 1, tendo envolvido três etapas sequenciais. Na **etapa I** (preparo da emulsão), aqueceu-se a fase aquosa até atingir uma temperatura de 60 °C e logo em seguida foram pesados os componentes oleosos (óleo de amêndoas e monoestearato de glicerila), tendo estes sido aquecidos até ao ponto de fusão da mistura (55 °C - 60 °C), formando-se assim a emulsão, logo após adicionou-se à formulação a nitrofurazona. Na **etapa II** (produção de micropartículas), a emulsão resultante da etapa I foi gotejada (utilizando uma seringa hipodérmica (21-G) de 5 mL) para uma solução aquosa de cloreto de cálcio 1 M, para solidificação das partículas por interação iônica com o cloreto de cálcio. A solução de cloreto de cálcio foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação com Ultra-Turrax a 10,000 rpm. As partículas resultantes assim obtidas foram mantidas na solução de cloreto de cálcio por duas horas, para um endurecimento adicional das mesmas, tendo depois sido separadas por filtração. Finalmente, na **etapa III** (desidratação), as partículas produzidas foram lavadas com água ultrapura e liofilizadas, sendo armazenadas em dessecador e ao abrigo da luz.

Tabela 1. Constituição das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada, obtidas por meio da técnica de emulsificação / solidificação.

Componente	Concentração (% , m/m)
Óleo de amêndoas	14,0
Monoestearato de glicerila	6,0
Tween 80	0,68
Span 80	0,32
Alginato de sódio de baixa viscosidade	2,4%
Alginato de sódio de alta viscosidade	1,6%
Nitrofurazona	0,2
Água ultrapura	Qsp 100%

Notas: Qsp – *quantidade suficiente para*

4.3.1.2. Preparação de micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada por extrusão/solidificação

A preparação das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada por extrusão/solidificação foi desenvolvida por gelificação ionotrópica do alginato de sódio, sendo realizada em três etapas. A formulação final encontra-se representada na Tabela 2, e envolveu três etapas sequenciais. Na **etapa I** (preparação da solução de nitrofurazona e alginato de sódio), determinou-se inicialmente a melhor proporção entre alginato de sódio de baixa viscosidade e alginato de sódio de alta viscosidade. Assim, foram testadas as relações percentuais de 40:60, 50:50, e 60:40, de alginato de sódio de baixa viscosidade e alginato de sódio de alta viscosidade, respectivamente. Os componentes nitrofurazona e alginato de sódio foram pesados separadamente, e 95 mL de água ultrapura foram aquecidos a cerca de 60 °C. A água ultrapura aquecida foi então adicionada gradativamente ao alginato de sódio até sua dissolução total, sob agitação magnética durante cerca de 10 min. Após a formação do gel de alginato adicionou-se a nitrofurazona na forma de pó, sob agitação manual (em torno de 60 rotações por minuto) durante cerca de 2 min. Na **etapa II** (extrusão), deixou-se a solução obtida na etapa I em repouso por cerca de 30 minutos até esta atingir a temperatura ambiente (25 °C). Seguidamente, a solução foi transferida para o

reservatório de uma pistola de pintura a jato de ar comprimido. A solução foi de seguida pulverizada sobre uma solução de cloreto de cálcio a 1 Molar (2,0 % (m/m)) à temperatura ambiente (25 °C). A solução de alginato e nitrofurazona pulverizada sob pressão, ao entrar em contato com a solução de cloreto de cálcio deu assim origem à formação de micropartículas, ficando estas dispersas na solução de cloreto de cálcio. Na **etapa III** (secagem), as micropartículas obtidas foram filtradas em tamis com malha fina e de 180 μ m de dimensão. Em seguida, permitiu-se que as partículas secassem à temperatura ambiente (25 °C) durante 24 horas, ao abrigo da luz.

Tabela 2. Constituição das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada, obtidas por meio da técnica de extrusão/solidificação.

Componente	Concentração (% , m/m)
Alginato de sódio (alta viscosidade)	2,4
Alginato de sódio (baixa viscosidade)	1,6
Nitrofurazona	0,2
Cloreto de cálcio	2,0
Água ultrapura	Qsp 100%

Notas: Qsp – quantidade suficiente para

4.3.2. Caracterização físico-química das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada

As micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada foram caracterizadas, do ponto de vista físico-químico, através da (i) avaliação de sua morfologia microestrutural empregando microscopia eletrônica de varredura, da (ii) determinação da quantidade de fármaco associado às micropartículas por espectrofotometria no UV-Visível, e do (iii) estudo da forma de associação do fármaco às substâncias utilizadas na produção das micropartículas, tanto através de análises térmicas como por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier.

4.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada foram observadas em microscópio eletrônico de varredura, marca JEOL, modelo JSM-63660 (JEOL, Tóquio, Japão). Amostras das micropartículas foram recobertas com ouro coloidal num *sputter coater*, sob vácuo, e posteriormente transferidas para a câmara do MEV, sendo obtidas fotomicrografias utilizando feixes de elétrons com intensidade de 10 keV.

4.3.2.2. Análises térmicas (TGA e DSC)

Para a caracterização termogravimétrica das micropartículas, foi realizada a análise termogravimétrica e análise térmica por calorimetria diferencial de varredura. O equipamento utilizado para as análises de TGA foi o termogravímetro modelo 2050 da marca TA Instruments (modelo MDSC 2910, EUA).

Nas análises de DSC utilizou-se um microcalorímetro diferencial de varredura da marca TA Instruments, modelo MDSC 2910 (EUA), tendo-se submetido as amostras de micropartículas a uma rampa de temperatura de 20 °C até 300 °C, a uma velocidade linear de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

4.3.2.3. Análises por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho, tanto de nitrofurazona pura como de amostras das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada, foram obtidos num espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (Bomem, modelo MB100, Zurique, Suíça) na gama de comprimento de onda de 4000 a 100 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹.

4.3.3. Preparação da formulação farmacêutica na forma de um gel para aplicação tópica

Para a preparação da formulação farmacêutica na forma de um gel, pesaram-se todos os componentes separadamente. Aqueceu-se 90 mL de água ultrapura até cerca de 60 °C, em béquer de 250 mL, e adicionou-se gradativamente o agente gelificante (Aristoflex®) sob agitação manual (com vareta de vidro) até obtenção de gel translúcido e viscoso. Lentamente, os demais componentes foram adicionados (propilenoglicol, polietilenoglicol), assim como a mistura conservante (fenoxietanol, metilparabeno, propilparabeno), com agitação manual constante.

Após o término da preparação do gel nas concentrações de polímero 2,0%, 2,5%, 3,0%, 4,0% e 5,0% (m/m), deixou-se este em repouso por cerca de 30 minutos até atingir a temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, foram adicionadas as micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada (apenas aquelas obtidas pelo processo de extrusão/solidificação, uma vez que o processo de secagem conferiu àquelas partículas produzidas pelo processo de emulsão/solidificação uma aparência pastosa tendo as mesmas ficado completamente aderidas umas às outras). Para avaliação das características físico-químicas do gel com micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada, preparou-se adicionalmente um gel sem partículas e outro gel com nitrofurazona na forma livre. O procedimento seguido foi semelhante àquele realizado para obtenção do gel com micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada. As formulações produzidas estão detalhadas na Tabela 3.

Tabela 3. Formulações desenvolvidas para a produção do gel com micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada, do gel sem partículas com nitrofurazona encapsulada, e do gel com nitrofurazona na forma livre.

Componente da formulação	Concentração (% , m/m)		
	Gel com micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada	Gel com nitrofurazona na forma livre	Gel sem micropartículas de nitrofurazona encapsulada
Aristoflex ® AVC	2,0%; 2,5%; 3,0%; 3,5%, 4,0% e 5,0%	2,0%	2,0%
Micropartículas com nitrofurazona encapsulada	0,2%	-----	-----
Propilenoglicol	5,0%	5,0%	5,0%

Nitrofurazona		-----	0,2%	-----
Solução conservante	Fenoxietanol	0,4%	0,4%	0,4%
	Metilparabeno	0,15%	0,15%	0,15%
	Propilparabeno	0,02%	0,02%	0,02%
Água ultrapura		*Qsp 100%	*Qsp 100%	*Qsp 100%

Notas: Qsp – *quantidade suficiente para*

4.3.4. Caracterização do gel incorporado com micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada

O gel adicionado das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada foi caracterizado quanto à sua viscosidade, teor em princípio ativo e fotoestabilidade, de acordo com os procedimentos a seguir discriminados.

4.3.4.1. Ensaios de fotoestabilidade dos géis

O estudo de fotoestabilidade dos géis foi realizado de acordo com as especificações descritas por Melo, Grillo e Moraes (2007). Utilizou-se como fonte de luz uma lâmpada UV dentro de uma câmara de dimensões 20cm x 27cm x 23cm, sendo a amostra de gel irradiada a uma distância de 18 cm da lâmpada, distancia esta considerada segura, pois os raios UV incidem sem possibilidade de ocorrer o aquecimento das amostras. Os ensaios de fotoestabilidade foram realizados expondo cerca de 10 g dos géis em placas de Petri isoladas com filme plástico (para evitar perdas de massa por evaporação de água). Os ensaios de fotoestabilidade foram realizados em amostras de gel somente com o polímero (amostra controle), em amostras de gel incorporado com nitrofurazona na forma livre, e em amostras de gel incorporado com micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada.

Para determinação do teor de nitrofurazona e sua relação com a fotoestabilidade, foram retiradas alíquotas com intervalos de 60 minutos até perfazer um total de 3 horas de exposição. Após este período, as amostras foram mantidas até 24 horas sob luz UV. Os teores de nitrofurazona das amostras foram determinados por espectrofotometria UV-Visível a um comprimento de onda de 375 nm (TUBINO, VILA, PALUMBO, 2009).

4.3.4.2. Caracterização reológica dos géis produzidos

Para a determinação da viscosidade dos géis foi utilizado um viscosímetro da marca Brookfield (modelo Dv – I prime, EUA). Para as amostras dos géis contendo micropartículas com nitrofurazona encapsulada foram utilizados *spindles* Brookfield de referências S-05, S-06 e S-07, a uma velocidade de rotação de 10 rpm, à temperatura ambiente (25 °C). Todas as análises foram feitas em triplicata. O *software* do viscosímetro fornece, além dos valores de viscosidade, dados de tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, pelo que estes dados foram também utilizados para a caracterização reológica das amostras dos vários géis produzidos.

A tensão de cisalhamento foi determinada matematicamente através da relação $\tau = \gamma \times \eta$, onde τ é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de cisalhamento e η a viscosidade do fluido. A tensão e a taxa de cisalhamento foram utilizadas para analisar o comportamento de fluxo dos hidrogéis. O comportamento tixotrópico ou reopético dos fluidos foram avaliados a partir da medida da viscosidade (η) em função do tempo (t).

4.3.4.3. Determinação do teor de nitrofurazona por espectrofotometria no UV-Visível

O método utilizado para a determinação do teor em nitrofurazona foi aquele desenvolvido por Tubino, Vila, Palumbo (2009) envolvendo espectrofotometria no UV-Visível, utilizando-se polietilenoglicol para diluição do princípio ativo, com leituras de absorvância efetuadas ao comprimento de onda de 375 nm. Para validação do método proposto, seguiram-se as diretrizes apontadas na Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), considerando linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de determinação.

Linearidade. Para a determinação da linearidade do método, preparou-se uma solução de nitrofurazona a 200 mg L⁻¹ em polietilenoglicol e efetuaram-se diluições em água ultrapura até obtenção das seguintes concentrações: 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 mg L⁻¹, para obtenção da curva de calibração. A relação linear simples foi determinada pela

equação $Y = aX + b$, onde Y = sinal analítico e X = concentração. O critério mínimo aceitável de correlação deve ser igual a 0,99 (BRASIL, 2003).

Precisão intra-corrida. Para a determinação da precisão intra-corridas, foram utilizadas 4 concentrações de nitrofurazona em polietilenoglicol, nomeadamente baixa ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$), médias (10 e $12,5 \text{ mg L}^{-1}$) e alta (20 mg L^{-1}), em triplicata. A precisão foi calculada através do coeficiente de variação conforme a Eq. (1), onde CV = coeficiente de variação; S = desvio padrão; X = concentração média das determinações:

$$CV = \frac{S}{X} \times 100 \quad (1)$$

Exatidão. A exatidão define a proximidade do resultado experimental com o valor real, sendo determinada através de comparação dos resultados obtidos com substância padrão secundária, de acordo com a Eq. (2), onde X = concentração média experimental, e CT = concentração teórica ou real:

$$\text{Exatidão} = \frac{X}{CT} \times 100 \quad (2)$$

Limite de detecção. A estimativa do limite de detecção foi realizada com base na relação de 3 vezes o sinal do branco, como indicado na Eq. (3), onde LD = limite de detecção; Dpa = desvio padrão do branco; IC = inclinação da curva de calibração:

$$LD = \frac{Dpa}{IC} \times 3 \quad (3)$$

Limite de quantificação. A estimativa do limite de quantificação foi realizada com base na relação de 10 vezes o sinal do branco, como indicado na Eq. (4), onde LQ = limite de detecção; Dpa = desvio padrão do branco; IC = inclinação da curva de calibração:

$$LQ = \frac{Dpa}{IC} \times 10 \quad (4)$$

4.3.4.4. Determinação do teor de nitrofurazona incorporado nas micropartículas e da eficiência de encapsulação

A quantidade de nitrofurazona incorporada nas micropartículas foi calculada pela diferença entre a concentração total de fármaco oferecido e a concentração de fármaco livre no sobrenadante após o processo de encapsulação. Considerou-se como fármaco oferecido o fármaco adicionado na mistura para a preparação da solução de nitrofurazona e alginato de sódio. O fármaco livre foi considerado o fármaco que ficou disperso na solução de cloreto de cálcio (i.e., o sobrenadante após a produção das partículas). Os teores de nitrofurazona foram determinados espectrofotometricamente no UV-Visível a um comprimento de onda de 375 nm (TUBINO, VILA, PALUMBO, 2009).

4.3.5. Ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar

A eficácia antimicrobiana do gel otimizado, incorporando micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada foi determinada pela técnica de difusão em ágar, método descrito por Bauer, Kirby e Sherris (1966) e Pedersen (1999) bem como segundo o padrão do Comitê Nacional de Padrões Clínicos Laboratoriais (CLSI, 2011). Todos os procedimentos envolvidos foram executados em capela de fluxo laminar unidirecional e todos os materiais e insumos empregados estéreis. Os ensaios microbiológicos foram realizados utilizando uma cepa de *Staphylococcus aureus* (cepa CCCD S007 - Cefar Diagnóstico Ltda, São Paulo Brasil).

A cepa de *Staphylococcus aureus* foi, inicialmente, inoculada em caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion) (Fluka, St. Louis MO, E.U.A.), e mantida por 24 h a 37 °C $\pm$ 0,5 °C para crescimento. Após este período de tempo, a cultura bacteriana foi inoculada em estrias sobre duas placas de Petri contendo como meio de cultivo Agar Sal Manitol (Prodimol Biotecnologia/SA, São Paulo SP, Brasil). Sobre o meio inoculado foram então aplicadas as amostras a testar, em duplicado: **quadrante 1** – Gel otimizado a 4%, sem partículas de nitrofurazona (padrão negativo de inibição); **quadrante 2** – Gel otimizado a 4%, incorporando partículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona

encapsulada; **quadrante 3** – Disco de papel de filtro esterilizado, impregnado com solução de nitrofurazona a 0,2% (m/v) em propilenoglicol (padrão positivo de inibição); e **quadrante 4** – Disco de papel de filtro esterilizado, impregnado com propilenoglicol (padrão negativo de inibição).

O propilenoglicol e a solução de nitrofurazona em propilenoglicol foram impregnados em discos de papel de filtro estéril de cerca de 7,0 mm de diâmetro e inoculados nas placas de Petri com auxílio de uma pinça estéril, à chama. As amostras dos géis (sem e com micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada) foram inoculadas com auxílio de alça de inoculação esterilizada por flamejamento ao rubro.

As placas de Petri foram então invertidas e incubadas sob condições de aerobiose a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h, período de tempo após o qual as placas foram examinadas visualmente para verificação da formação (ou não) de quaisquer halos de inibição.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção de uma nova forma farmacêutica exige a verificação de diversas características do produto com o objetivo de avaliar tanto a sua qualidade como a sua eficácia (AULTON, 2005). Neste trabalho de pesquisa, optou-se pelo desenvolvimento de um gel antimicrobiano tendo como princípio ativo nitrofurazona encapsulada em micropartículas de alginato de cálcio. Assim, foram preparadas e caracterizadas micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada, as quais foram incorporadas em um gel a 4% (m/m). Seguidamente, o gel foi avaliado quanto à sua viscosidade, teor de princípio ativo, fotoestabilidade, atividade antimicrobiana, e vida de prateleira.

5.1.Preparação de micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada

Inicialmente, as micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada foram obtidas pelo processo de emulsão/solidificação. Neste sistema, prepara-se, numa primeira etapa, uma emulsão, cuja fase interna, na forma de microgotas, é solidificada originando as micropartículas (SILVA *et al.*, 2003). A obtenção de partículas lipídicas

sólidas foi escolhida, a princípio, pelo fato da nitrofurazona não ser solúvel em água (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007). Assim, esperava-se não haver problema em relação à solubilização da nitrofurazona no decorrer deste procedimento. Embora as partículas formadas tenham apresentado características adequadas relativamente ao tamanho, o processo de liofilização empregado para a eliminação do solvente promoveu a formação de um agregado de partículas. Este agregado de partículas não apresentou boa dispersão na forma farmacêutica escolhida para veiculação tópica da nitrofurazona, ou seja, não permitiu a formação de um gel com aparência uniforme.

Para a solução deste problema, optou-se por outro processo de preparação de micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada. Empregou-se, assim, o método de extrusão/solidificação, tendo como agente encapsulante o alginato de sódio. O alginato de sódio como material encapsulante é bastante utilizado por ser um biopolímero natural de relativo baixo custo, biocompatível, atóxico e biodegradável. Além disto, não é necessário nem a utilização de solventes orgânicos nem condições rigorosas de temperatura para a formação das partículas (FUJIWARA *et al.*, 2010). Em função destas características, o alginato de sódio tem sido utilizado para obtenção de micropartículas contendo diversos ativos encapsulados e em diferentes processos (REIS, 2006; SANGEETHA *et al.*, 2007; FUJIWARA *et al.*, 2010; SACCHETIN *et al.*, 2010; TAGLIARIN, 2012).

A técnica de extrusão/solidificação para produção de micropartículas exige que o fármaco seja misturado numa dispersão de alginato de sódio, e a suspensão resultante extrusada, sendo as partículas de alginato de sódio com princípio ativo encapsulado formadas por gotejamento numa solução de cloreto de cálcio a 1,5% (m/v) a partir da qual são depois recolhidas por filtração. O processo de extrusão/solidificação empregando alginato de sódio ocorre pela gelificação ionotrópica daquele polímero. A gelificação ionotrópica do alginato de sódio se dá após ligação de íons bivalentes de cálcio aos blocos de ácido gulurônico das cadeias de alginato, constituindo o modelo da “caixa de ovos” (SILVA *et al.*, 2003; SUKSAMRAN *et al.*, 2009).

Para a solidificação das micropartículas, as mesmas foram deixadas em repouso por 30 minutos na solução com cloreto de cálcio a 1,5% (m/v), sendo estas depois recolhidas por filtração usando papel de filtro e secas em estufa a 40 °C por 24 horas. No entanto, as micropartículas aglomeravam-se formando uma massa espessa, não mantendo o formato original. Na tentativa de superação deste fato, as micropartículas

foram colocadas numa solução de cloreto de cálcio a 2% (m/v) para permitir um endurecimento adicional das mesmas, sob agitação orbital (a 15 rpm) em câmara **incubadora** a 37,7 °C, por um período de 4 horas (Figura 7). Após um período de repouso de 15 minutos, as partículas foram filtradas em papel de filtro e mantidas em estufa a 40 °C por 24 horas. No entanto, este procedimento também não se mostrou eficaz, pois durante o período de secagem as partículas ainda se aglomeravam.

Figura 7. Solução de cloreto de cálcio com micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada, sob agitação **orbital** em câmara incubadora.



Optou-se assim por uma re-avaliação dos componentes da formulação inicial. Inicialmente, a nitrofurazona, em função de sua baixa solubilidade em água, foi dissolvida em propilenoglicol sendo esta suspensão adicionada a uma dispersão aquosa de alginato de sódio de alta viscosidade. Assim, decidiu-se pela retirada do propilenoglicol, pois o mesmo poderia ser o agente causador da instabilidade das partículas, sendo a nitrofurazona dispersa diretamente na solução de alginato de sódio. Não houve problemas em relação à dispersão do princípio ativo, contudo as

micropartículas produzidas ainda apresentavam problemas em relação à manutenção do formato original. Os testes seguintes foram assim focados na definição do alginato de sódio mais adequado para a produção das micropartículas, testando-se alginatos de sódio de baixa e alta viscosidade em diferentes proporções, de acordo com o planejamento experimental descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Planejamento experimental seguido para testar diferentes proporções entre os alginatos de sódio utilizados na produção das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada.

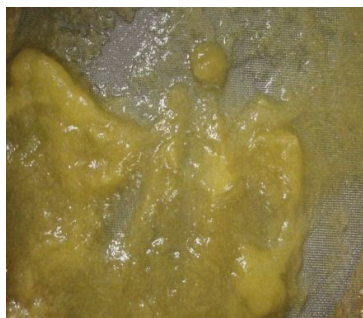
Alginato de sódio de Baixa Viscosidade (% , m/m)	Alginato de sódio de Alta Viscosidade (% , m/m)
100	-----
90	10
80	20
70	30
60	40
50	50
40	60
-----	100

Conforme pode ser observado por análise da Figura 8, a melhor proporção entre os dois tipos de alginato de sódio foi a proporção 60:40 (alginato de sódio de baixa viscosidade : alginato de sódio de alta viscosidade). As micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada, produzidas com esta proporção entre os alginatos, apresentaram-se bastante homogêneas em relação ao tamanho e exibiram resistência adequada.

Outro problema que necessitou ser superado diz respeito ao processo de extrusão da suspensão de biopolímero. Foram testados diversos métodos de extrusão da suspensão de biopolímero sobre uma solução de cloreto de cálcio: gotejamento

utilizando uma seringa hipodérmica de 5 mL sem agulha; extrusão sob vácuo através de um sistema de filtração membranar da Milipore®; extrusão por pressão positiva em dispositivo de vaporização por sucção manual; e extrusão por pressão positiva utilizando-se uma pistola de pintura. Na Figura 9, podem ser encontrados os dispositivos utilizados nos vários métodos de extrusão testados para a produção das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada.

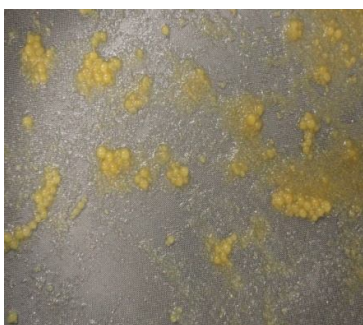
Figura 8. Fotografias das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada, produzidas com diferentes proporções (%) de alginato de sódio de baixa viscosidade (ASBV) e alginato de sódio de alta viscosidade (ASAV).



100% ASBV



100% ASAV



90% ASBV : 10% ASAV



80% ASBV : 20% ASAV



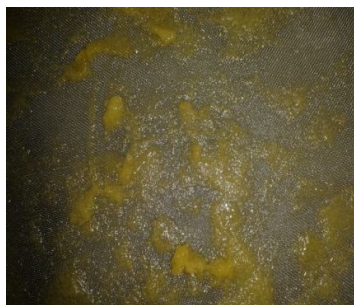
70% ASBV : 30% ASAV



60% ASBV : 40% ASAV



50% ASBV : 50% ASAV



40% ASBV : 60% ASAV

O método no qual se utilizou a seringa hipodérmica de 5 mL, propiciou a formação de partículas que, embora de tamanhos homogêneos, possuíam tamanho superior ao desejado, uma vez que as micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada seriam incorporadas em um gel para aplicação tópica. Caso as micropartículas fossem demasiado grandes, a sensação com a aplicação do gel sobre a pele seria a de uma “areia”. Assim, este método não foi considerado para o trabalho subsequente.

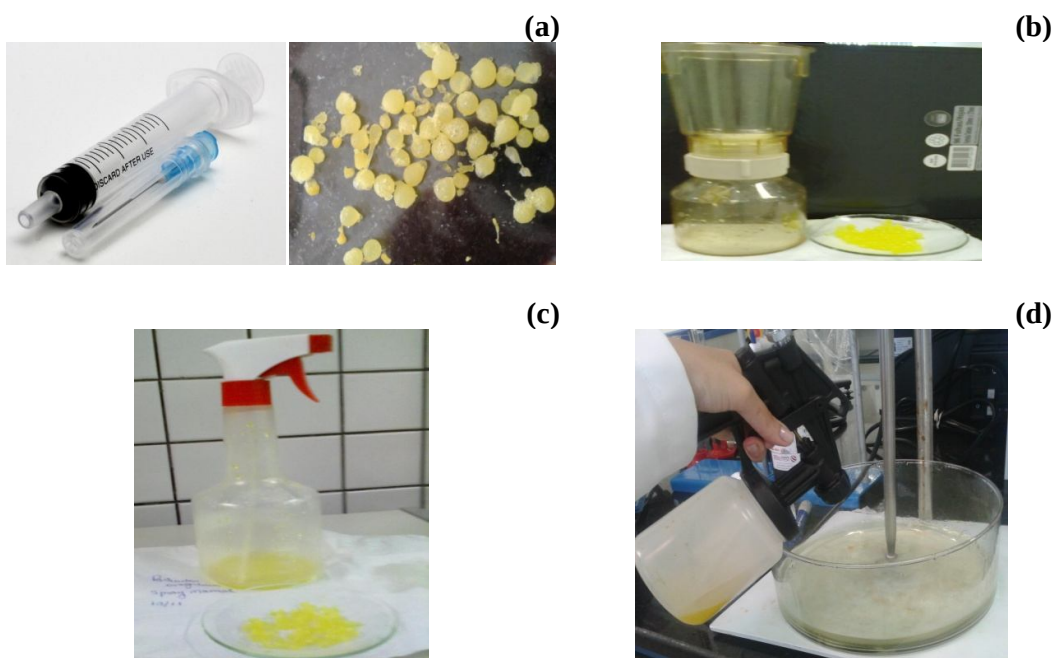
O processo de extrusão com vácuo através do sistema de filtração em membrana da Milipore® (Figura 9) não permitiu a formação de partículas. Após a passagem pela membrana da dispersão de nitrofurazona na solução de alginato de sódio, as partículas se reagrupavam na parte inferior da membrana e imediatamente antes do contato com a solução de cloreto de cálcio, formando uma massa compacta de alginato de sódio com nitrofurazona. Assim, este método não foi considerado para o trabalho subsequente.

O processo no qual a extrusão foi realizada empregando-se um dispositivo manual de vaporização por sucção (Figura 9) também não propiciou a formação de micropartículas adequadas, sendo por isso igualmente descartada a sua utilização no trabalho subsequente.

As micropartículas apresentando as melhores características para a formulação pretendida foram aquelas obtidas pela utilização da pistola de pintura à pressão (Figura 9), apresentando conformações mais uniformes e tamanhos reduzidos. Assim, este foi o dispositivo eleito como o mais adequado para o objetivo pretendido. Neste método, o fármaco a ser encapsulado foi disperso numa solução de alginato de sódio e, seguidamente, a dispersão produzida foi pulverizada sobre uma solução de cloreto de cálcio a 1,5% (m/v), utilizando-se a referida pistola de pintura acoplada a um compressor. Este método permitiu então a extrusão da dispersão (nitrofurazona na solução aquosa de alginato de sódio) formando micropartículas de tamanho adequado

que, em contato com a solução de cloreto de cálcio, iniciava o processo de endurecimento. Após um período de 30 minutos imersas na solução de cloreto de cálcio, as micropartículas de alginato de cálcio foram filtradas em papel de filtro e secas à temperatura ambiente (25 °C) durante 24 horas, na ausência de luz.

Figura 9. Fotografia dos diversos dispositivos testados na etapa de extrusão da dispersão de nitrofurazona em solução aquosa de alginato de sódio, para obtenção das micropartículas contendo nitrofurazona encapsulada.



- (a) Gotejamento utilizando uma seringa hipodérmica sem agulha
- (b) Extrusão sob vácuo através de um sistema de filtração membrana da Milipore®
- (c) Extrusão por pressão positiva em dispositivo de vaporização por sucção manual
- (d) Extrusão por pressão positiva utilizando-se uma pistola de pintura

5.2. Caracterização das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona microencapsulada

As características físico-químicas das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona microencapsulada são afetadas por um conjunto de parâmetros tecnológicos (SEVERINO *et al.*, 2011). Assim, em cada processo de produção de nano/micropartículas torna-se necessária a sua caracterização físico-química. As

micropartículas produzidas foram, assim, caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (para avaliação da sua morfologia estrutural), por determinação da eficiência do processo de encapsulação, por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier e por análises térmicas tanto termogravimétricas (TGA) como de calorimetria diferencial de varredura (DSC).

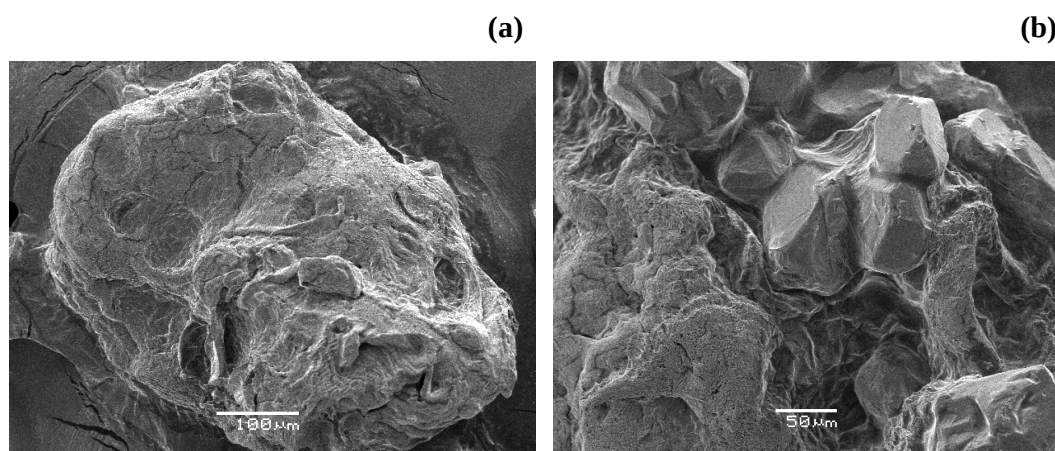
5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de MEV realizadas permitiram observar micropartículas com tamanhos compreendidos entre 500 μm a 800 μm , com formato levemente oval (ver Figura 10). As partículas produzidas puderam ser assim, caracterizadas como micropartículas, uma vez que a gama de tamanhos relativa às micropartículas varia desde 1 μm a 1000 μm (KAYSER, 2005; CABRAL, 2004; SILVA *et al.*, 2003).

Segundo Wang *et al.* (2004), a concentração de alginato de sódio pode influenciar o formato das partículas, pelo que, normalmente, se utiliza um teor de alginato de sódio entre 0,8% a 1,5% (m/v) para obtenção de micropartículas. Estes autores consideram ainda que, quando o teor de alginato de sódio é superior ao máximo citado, as partículas podem apresentar-se na forma ovalada. Esta consideração pode ser confirmada no trabalho aqui desenvolvido, uma vez que a formulação otimizada utilizou 2,0% (m/v) de alginato de sódio. No entanto, o teor de alginato de sódio utilizado para a produção de micropartículas pode variar acima dos valores citados por Wang *et al.* (2004), como pode ser verificado em outros trabalhos científicos (ACCHETIN *et al.*, 2010; PAULA *et al.*, 2010).

Adicionalmente, além da concentração do polímero, é importante referir que o formato das partículas também pode ser fortemente influenciado por parâmetros processuais tais como o processo de extrusão utilizado, a temperatura e velocidade de alimentação do sistema, entre outros fatores (SILVA *et al.*, 2003).

Figura 10. Microfotografias de varredura eletrônica de uma micropartícula de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada, obtidas em um Microscópio Eletrônico de Varredura da marca JEOL, modelo JSM-63660 (Tóquio, Japão).



*Ampliação: (a) x200; (b) x300.

5.2.2. Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier

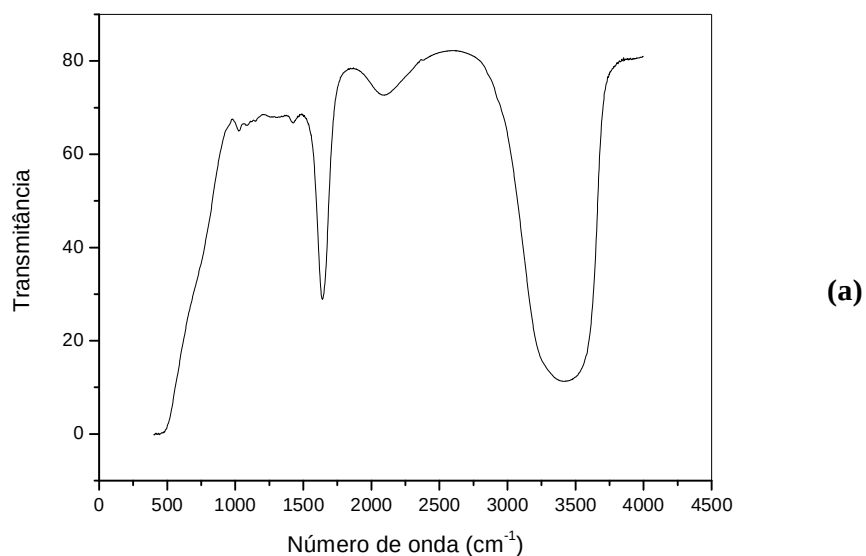
As análises por espectrofotometria de infravermelho permitem a identificação de grupos funcionais presentes nos materiais. Cada grupo funcional em particular absorve em uma frequência característica de radiação no espectro do infravermelho. Deste modo, um gráfico de intensidade *versus* frequência de radiação, designado como espectro de infravermelho, permite caracterizar os grupos funcionais de um dado material (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000).

Assim, esta capacidade faz com que a espectrofotometria na região de infravermelho seja muito utilizada na análise da estrutura das micropartículas. Esta técnica pode permitir o esclarecimento de possíveis interações entre o princípio ativo encapsulado e o polímero, através da análise dos grupos funcionais dos agentes envolvidos no processo (BRASILEIRO, 2010).

Segundo Lisboa (2011), os espectros de infravermelho do alginato de cálcio e do alginato de sódio são bastante similares e apresentam bandas específicas entre 1590

cm^{-1} a 1407 cm^{-1} , que caracterizam a presença de íons na estrutura. O vale de intensidade próximo ao comprimento de onda de 3500 cm^{-1} é característico do estiramento do OH e indica a presença de ligação com moléculas de água. A Figura 11 apresenta os espectros de infravermelho de micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada, de micropartículas de alginato de cálcio sem a adição da nitrofurazona, e de nitrofurazona livre. Nos espectros das partículas de alginato de cálcio, com e sem nitrofurazona encapsulada, pode observar-se um vale na região de comprimento de onda próximo da região de 1590 cm^{-1} , provavelmente indicando a presença de íons Ca^{2+} . O vale na região de comprimento de onda de 3500 cm^{-1} é observado em todos os espectros. Comparando-se os espectros das micropartículas de alginato de cálcio com e sem nitrofurazona encapsulada, pode concluir-se que não há deslocamentos dos principais vales, mas apenas uma alteração na sua intensidade, o que pode ser indicativo de que a nitrofurazona não estabeleceu forte ligação com o polímero encapsulante.

Figura 11. Espectros de infravermelho de amostras de micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada **(a)**, de micropartículas de alginato de cálcio sem nitrofurazona **(b)** e de nitrofurazona livre **(c)**. Os espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier obtidos na região de comprimentos de onda de 4000 cm^{-1} a 100 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , num espectrofotômetro FTIR de marca Bomem, modelo MB100 (Zurique, Suíça).



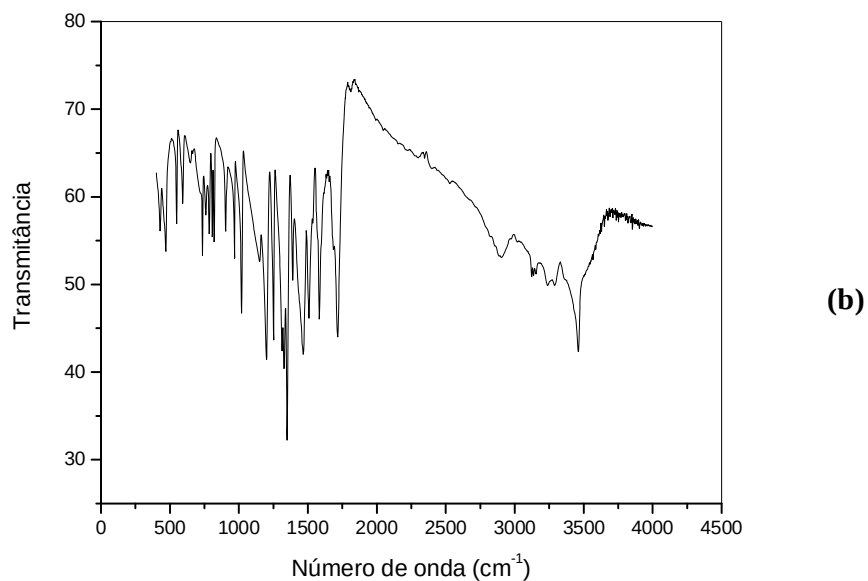
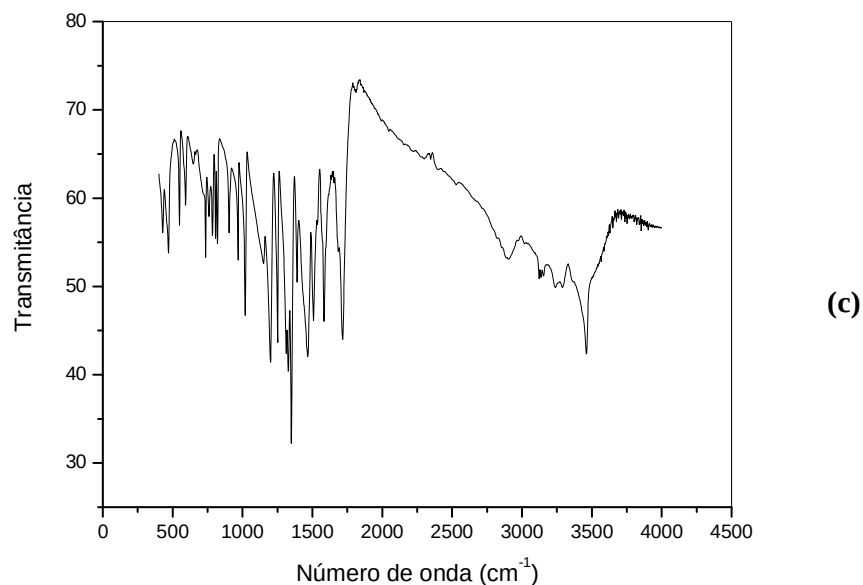


Figura 11. Espectros de infravermelho de amostras de micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada **(a)**, de micropartículas de alginato de cálcio sem nitrofurazona **(b)** e de nitrofurazona livre **(c)**. Os espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier obtidos na região de comprimentos de onda de 4000 cm^{-1} a 100 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , num espectrofotômetro FTIR de marca Bomem, modelo MB100 (Zurique, Suíça). (continuação)



5.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência do processo de encapsulação é dada pela razão entre a quantidade de princípio ativo encapsulado nas micropartículas e a quantidade teórica (total) de princípio ativo oferecido no processo. A eficiência de encapsulação de fármacos apresenta na literatura valores bastante diversos. Soni, Kumar e Namdeo (2011) citam, de modo geral, uma eficiência de encapsulação na ordem de 70% – 93%, enquanto Silva *et al.* (2003) referem que a eficiência de encapsulação pode variar entre 70% e 85%. No entanto, esta gama de eficiência de encapsulação pode variar ainda mais, de acordo com SCHAFFAZICK *et al.* (2003), que indicam taxas de encapsulação de alguns fármacos com variações entre 39% a 100%. Os valores de eficiência de encapsulação obtidos no trabalho de pesquisa e desenvolvimento aqui descrito foram de $97,8\% \pm 1,1\%$, valores muito próximos daqueles obtidos por Honary, Maleki e Karami (2009), que obtiveram uma eficiência de encapsulação de prednisona em torno de $96,68\% \pm 0,395\%$ a $98,97\% \pm 0,971$, tendo como agentes encapsulantes alginato de sódio e quitosana.

A taxa de encapsulação varia em função do processo de produção das nano/micropartículas, do fármaco eleito, do tipo e concentração do polímero encapsulante utilizado, da velocidade de eliminação do solvente, da solubilidade do polímero no solvente, entre outros fatores (SCHAFFAZICK *et al.* 2003; BRASILEIRO, 2011). Assim, os valores obtidos neste trabalho de pesquisa para a eficiência do processo de encapsulação de nitrofurazona usando alginato de sódio como polímero encapsulante podem ser considerados muito bons.

5.2.4. Análises térmicas por termogravimetria (TGA) e por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises térmicas avaliam a capacidade dos materiais sofrerem alterações em suas propriedades físicas em função da temperatura. Nas análises termogravimétricas (TGA), os resultados são apresentados sob a forma de curva termogravimétrica, na qual a variação de massa do material em estudo é registrada em função da temperatura e/ou do tempo de análise. A perda de massa pode ser relacionada com a estrutura molecular do material em estudo. A calorimetria diferencial de varredura (DSC) avalia a energia necessária para estabelecer um zero de diferença de temperatura entre uma substância

em estudo e um material de referência, sendo registrada em função da temperatura e/ou do tempo de análise (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000).

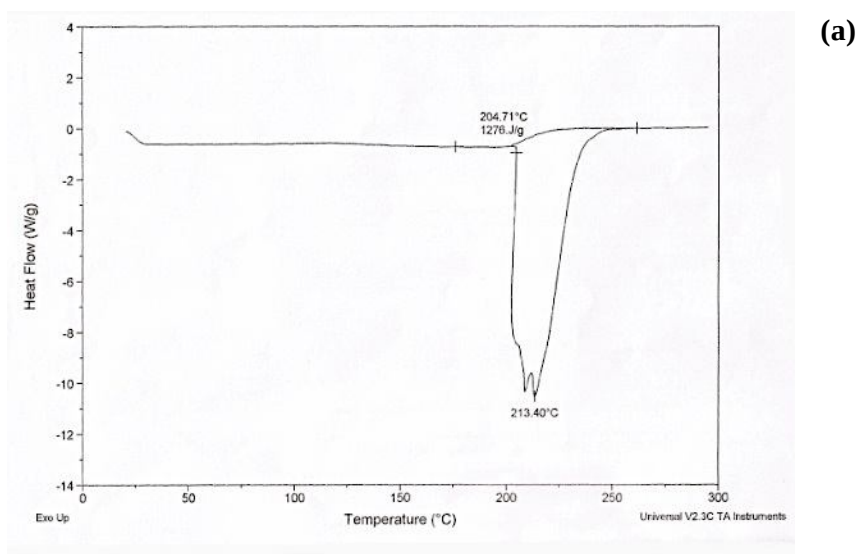
A análise por DSC (ver Figura 12) das micropartículas de alginato de cálcio sem nitrofurazona indicou como evento endotérmico (fusão) mais significativo, aquele ocorrido em 212,62 °C, enquanto esta análise efetuada às micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada apresentou um pico de temperatura de fusão em torno de 213,40 °C. Comparando estas temperaturas entre si, verifica-se um mínimo deslocamento do pico de fusão, o que pode indicar que a nitrofurazona não se ligou fortemente ao polímero encapsulante. As temperaturas de fusão das micropartículas de alginato de cálcio com e sem nitrofurazona encapsulada apresentam-se próximas daquelas encontradas por Paula *et al.* (2010) que, ao analisar partículas de alginato de sódio relataram uma temperatura de fusão em torno de 194 °C. Provavelmente, esta diferença observada nas temperaturas de fusão, poderá ter sido devida às diferentes formulações utilizadas na produção das (micro)partículas.

Paula *et al.* (2010), ao analisarem microesferas de alginato de cálcio por termogravimetria (TGA), relatam que a decomposição ocorre em três etapas. O primeiro evento foi atribuído à evaporação de água, ocorrendo na zona de temperatura entre 85 °C - 132 °C. O segundo evento, de decomposição, foi devido à formação de carbonato de sódio, evidenciando-se a 209 °C. E, finalmente, o terceiro evento, que ocorreu no intervalo de temperaturas entre 297 °C a 576 °C, devido à carbonização das cadeias poliméricas.

A curva termogravimétrica das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada, produzidas neste trabalho de pesquisa, apresentou eventos térmicos próximos aos descritos por Paula *et al.* (2010) (ver Figura 13a). Pode então supor-se que o primeiro evento térmico com perda de água ocorreu entre 58,40 °C e 89,00 °C (perda de massa de 78,31%), que o segundo evento ocorreu a 192,46 °C, podendo provavelmente indicar a formação de carbonato de cálcio (perda de massa de 1,69%), e que o terceiro evento, a carbonização das cadeias poliméricas, terá ocorrido no intervalo de temperatura de 286,87 °C a 640,80 °C (perda total de massa de 1,045% + 1,050%). Já a inspeção da curva resultante da análise TGA às partículas de alginato de cálcio sem nitrofurazona (ver Figura 13b) permitiu observar uma perda significativa de massa (de 42,12%) iniciando-se a 55,94 °C, provavelmente resultante da eliminação de água. A uma temperatura de 291,16 °C ocorre perda de massa de 16,58%, devendo-se provavelmente à carbonização das cadeias poliméricas.

Pode concluir-se que, em comparação com as partículas de alginato de cálcio sem nitrofurazona encapsulada, as partículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada são mais susceptíveis à decomposição.

Figura12. Resultados obtidos nas análises por DSC às micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada **(a)** e às micropartículas de alginato de cálcio sem nitrofurazona **(b)**. O equipamento utilizado consistiu num calorímetro por varredura diferencial da marca TA Instruments, modelo MDSC 2910 (Tóquio, Japão), em que o parâmetro das análises consistiu num ciclo de aquecimento de 20 °C até 300 °C a uma velocidade linear de aquecimento de 10 °C min⁻¹.



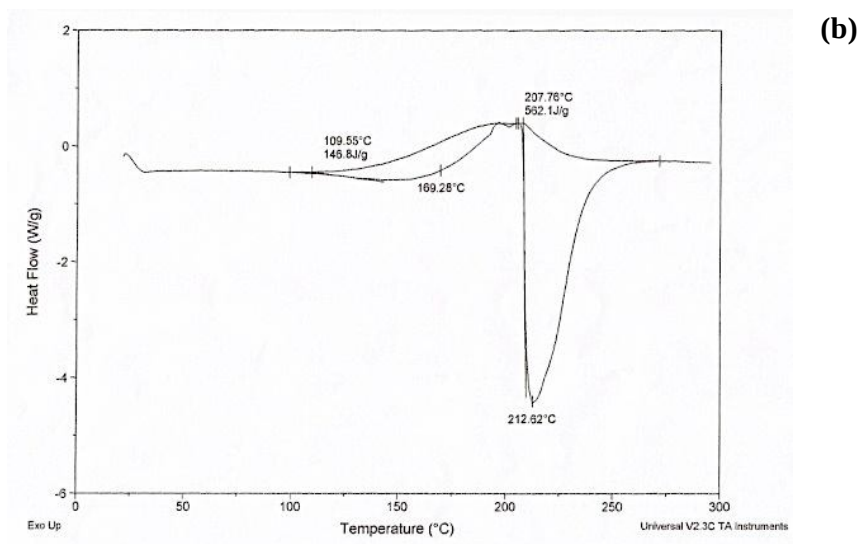
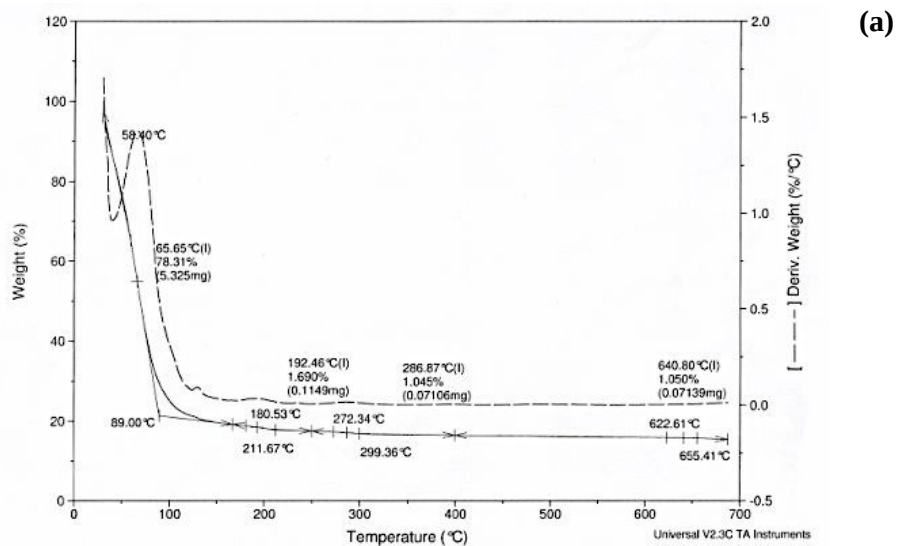
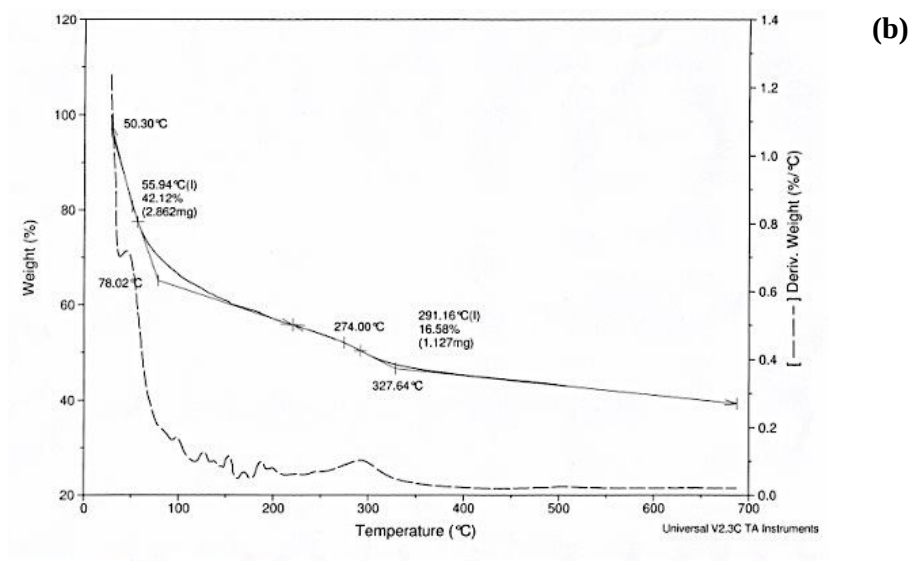


Figura 13. Resultados obtidos nas análises termogravimétricas (TGA) às micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada **(a)** e às micropartículas de alginato de cálcio sem nitrofurazona **(b)**. O equipamento utilizado consistiu num termogravímetro da marca TA Instruments, modelo 2050 (EUA).





5.3. Preparação do gel para aplicação tópica incorporando micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada

Os géis são sistemas semi-sólidos que consistem em dispersões de pequenas ou grandes moléculas em um veículo aquoso que adquire consistência semelhante à das geléias pela adição de um agente gelificante (ANSEL JR., 2007). A formulação do gel desenvolvido neste trabalho de pesquisa aplicada estabeleceu, inicialmente, 2,0 % (m/m) do agente gelificante (Aristoflex® AVC).

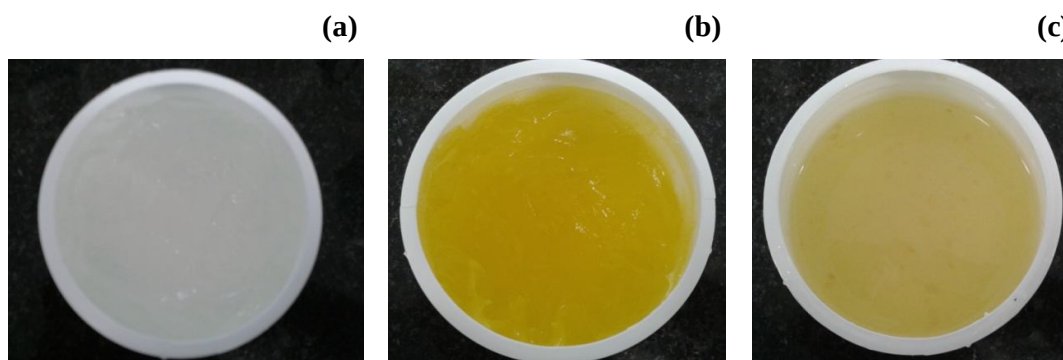
O Aristoflex® AVC é um co-polímero neutralizado de acriloldimetiltaurato do ácido sulfônico e vinilpirrolidona, sendo assim um polímero sintético formador de géis em sistemas aquosos, é utilizado em função da sua capacidade de formação de géis cristalinos e incolores, com características de excelente consistência além de proporcionar boas propriedades sensoriais, conferindo uma agradável sensação quando aplicado sobre a pele (OLIVEIRA, 2011).

No entanto, ao serem adicionadas as micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada, observou-se a imediata desestruturação do gel. Este fato ocorreu, provavelmente, devido à interação do agente gelificante com o alginato de cálcio, provocando assim o rompimento da rede polimérica formadora de gel, devido a uma possível mudança do pH do meio. Assim, procedeu-se a alterações na

formulação inicial, com aumento da concentração do agente gelificante adicionado até à obtenção de uma formulação adequada incorporando micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada. Para tal, foram preparados géis com 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5% e 5,0% (m/m) do polímero Aristoflex® AVC, mantendo todos os demais constituintes com as proporções definidas inicialmente. Estas percentagens de gel base foram consideradas para estudo pois em formulações dermo-cosméticas pode utilizar-se de 0,5% a 5% (m/m), dependendo da viscosidade desejada e dos princípios ativos a serem incorporados (PHARMA SPECIAL, 2013). A concentração de 4,0% (m/m) do agente gelificante foi a que proporcionou uma adequada viscosidade e estabilidade do gel frente à incorporação das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada. Na Figura 14 podem observar-se os vários géis preparados com 4,0% de polímero Aristoflex® AVC.

O gel preparado utilizou também propilenoglicol, cuja função é manter a homogeneidade da formulação auxiliando assim na estabilização do gel. O propilenoglicol atua ainda como lubrificante para a superfície da pele e como veículo de transporte do princípio ativo ao local de ação intencionado. Adicionalmente, a formulação conta ainda com agentes conservantes (fenoxietanol, metilparabeno e propilparabeno) com a função de proteger a formulação contra a degradação por ação microbiana (ROWE *et al.*, 2009).

Figura 14. Fotografias de géis preparados com 4,0% (m/m) de Aristoflex® AVC: sem nitrofurazona **(a)**, contendo nitrofurazona na forma livre **(b)**, e contendo micropartículas de alginato de cálcio com nitrofurazona encapsulada **(c)**.



5.4. Caracterização do gel

Os géis hidrofílicos têm sido muito utilizados em produtos cosméticos e farmacêuticos. Os géis são de fácil espalhamento e remoção, não são gordurosos, podem veicular diferentes ingredientes ativos e, somando-se a isto, têm boa apresentação (ANSEL JR, 2007).

Geralmente, as substâncias responsáveis pela formação de géis são polímeros que, quando dispersos em meio aquoso, assumem uma conformação estrutural que confere viscosidade à preparação. Tanto o tipo como a percentagem de polímero utilizado na formulação pode influenciar o comportamento reológico da forma farmacêutica e, deste modo, interferir na estabilidade física do produto. Adicionalmente, os diferentes tipos de polímeros podem interferir no comportamento do gel sobre a pele e na liberação do ingrediente ativo, resultando em diferentes graus de aceitação do gel pelo consumidor (CORREA *et al.*, 2005). Assim, para o controle de qualidade do produto desenvolvido neste trabalho de pesquisa aplicada, foram realizados vários testes com o objetivo de avaliar a estabilidade da viscosidade do produto em estocagem, determinar o teor de princípio ativo na formulação farmacêutica e avaliar a sua fotoestabilidade.

5.4.1. Ensaios de determinação de viscosidade

Nos produtos semi-sólidos, a determinação das características reológicas é fundamental na avaliação da qualidade do produto e consequente aceitação do mesmo pelo consumidor. As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico. A reologia tem sido assunto de grande e crescente importância para as indústrias de cosmética e farmacêutica, pois as características reológicas podem influenciar a estabilidade física do sistema, a espalhabilidade, as características sensoriais e as finalidades de uso (CORREA *et al.*, 2005; TAGLIARI, 2012).

No estudo preconizado neste trabalho de pesquisa aplicada, os géis preparados com concentrações de 2,5% (m/m) a 5,0% (m/m) de polímero foram avaliados quanto à viscosidade para a definição da melhor (isto é, mínima) percentagem do agente gelificante. Este procedimento foi necessário, uma vez que a incorporação no gel a 2,0% (m/m) (formulação original) das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada provocou a imediata desestruturação do mesmo, e a consequente diminuição abrupta da viscosidade. Assim, optou-se por preparar vários

géis mantendo todos os componentes constantes à exceção do agente gelificante, que foi incrementado em meio ponto percentual em cada um dos géis, partindo-se de um valor de 2,5% (m/m) até 5,0% (m/m) de Aristoflex® AVC. O comportamento reológico das formas semi-sólidas foi avaliado por meio de determinações de viscosidade, utilizando-se um viscosímetro da *Brookfield* (modelo RVDV-I Prime, Middleboro, EUA). O viscosímetro da *Brookfield* consiste em um agitador rotativo que mede a viscosidade do fluido com base na resistência por ele oferecida à agitação com um determinado “*spindle*” (GIL, 2010). Todas as análises foram feitas em triplicata, aos tempos de armazenamento de 0, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, conforme os dados incluídos na Tabela 5.

Pela análise dos resultados obtidos (ver Figuras 15 a 20) pode perceber-se que a percentagem do polímero Aristoflex® AVC que produziu o melhor resultado em relação à viscosidade, foi naquela formulação onde se utilizou 4,0% (m/m). Durante os 90 dias de armazenamento ao qual se sujeitaram os vários géis, o gel produzido com 4,0% (m/m) de Aristoflex® AVC manteve uma viscosidade adequada, para espalhamento e consistência, mantendo assim as características esperadas para a formulação de uso tópico.

Tabela 5. Resultados obtidos nas determinações de viscosidade dos vários géis produzidos com diferentes percentagens de Aristoflex® AVC, medidas a diferentes tempos de armazenamento com um viscosímetro digital da Brookfield (modelo RVDV-I Prime, Middleboro, EUA) com adaptador acoplado para amostras de pequeno volume.

Tempo de armazenamento (d)	Parâmetro μ (Cp); τ (s ⁻¹)	Percentagem de Aristoflex® AVC (m/m)				
		2,5%	3,0%	3,5%	4,0%	5,0%
0	μ	5050	7360	18020	38500	30040
30		7523	6004	17380	29916	31840
45		7517	5990	18113	29650	32487
60		7468	5997	18144	30373	32067
75		6712	6360	16055	32063	31947
90		6896	6565	16266	33400	33330

0	τ	505000	368000	360400	385000	300400
30		376150	120080	347600	299160	318400
45		375850	299500	362260	296500	324870
60		373400	299850	362880	303730	320670
75		335600	318000	321100	320630	338940
90		344800	328250	313300	342800	331650

Nota: μ = viscosidade (Centipoise, Cp); τ = tensão de cisalhamento (s^{-1})

Os principais aspectos a serem observados numa forma farmacêutica de uso tópico são a manutenção da viscosidade com o decorrer do tempo, uma boa espalhabilidade, uma aparência visual agradável e o não ser agressivo para a pele, fatores que juntos contribuem para uma melhor adesão do paciente ao tratamento (CORREA *et al.*, 2005). Nos gráficos apresentados como Figuras 15, 16, 17, 18, 19 e 20, pode observar-se que os géis preparados com uma percentagem mássica igual ou superior a 4,0% de Aristoflex® AVC apresentaram valores de viscosidade estáveis, ou seja, adições acima de 4,0% (m/m) de Aristoflex® AVC não produziram alterações de viscosidade, sendo o gel preparado com 4,0% (m/m) de Aristoflex® AVC a formulação de escolha para veiculação das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada.

Figura 15. Resultados obtidos nas determinações de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC, imediatamente após preparação das formulações (Tempo 0).

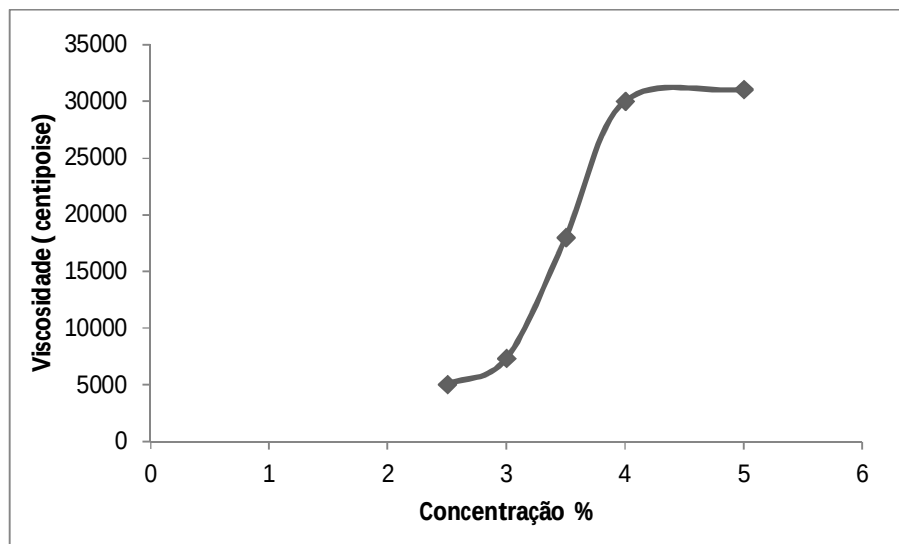


Figura 16. Resultados obtidos nas determinações de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC, após um período de armazenamento de 30 dias.

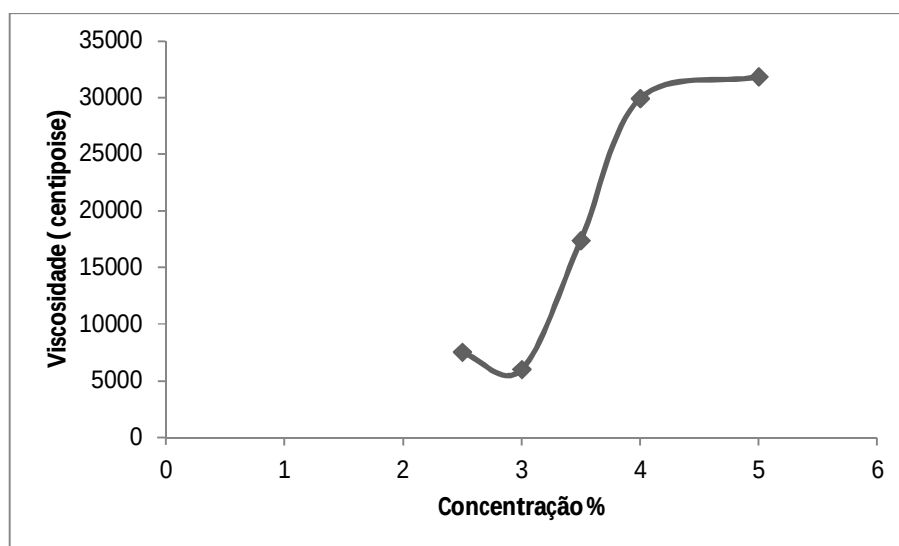


Figura 17. Resultados obtidos nas determinações de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC, após um período de armazenamento de 45 dias.

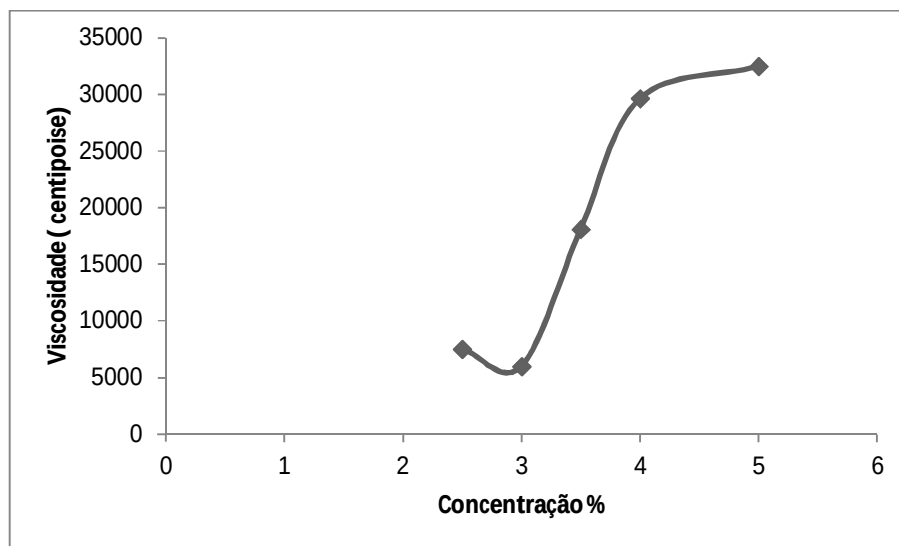


Figura 18. Resultados obtidos nas determinações de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC, após um período de armazenamento de 60 dias.

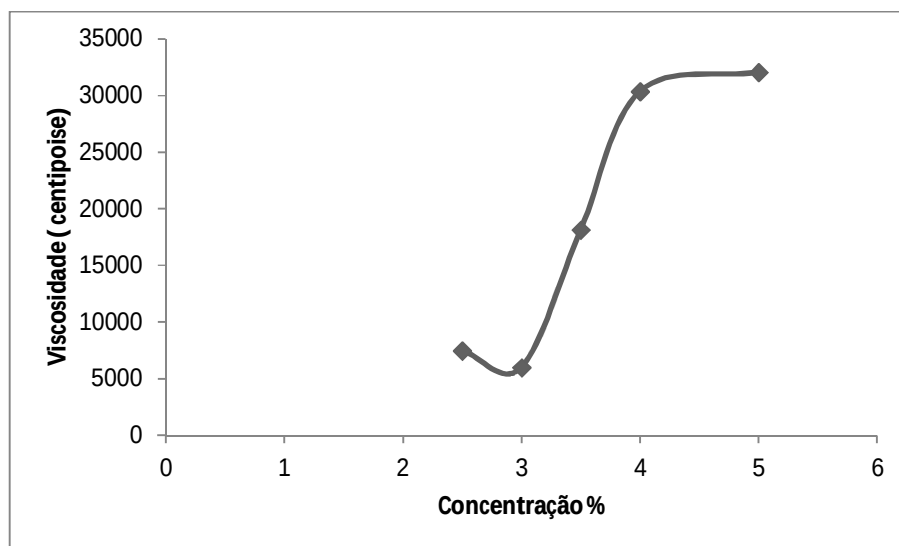


Figura 19. Resultados obtidos nas determinações de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC, após um período de armazenamento de 75 dias.

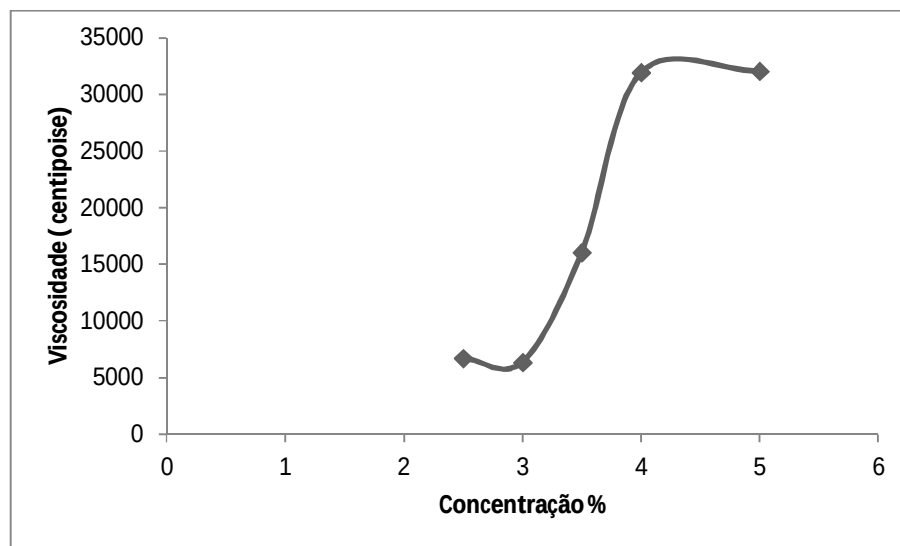
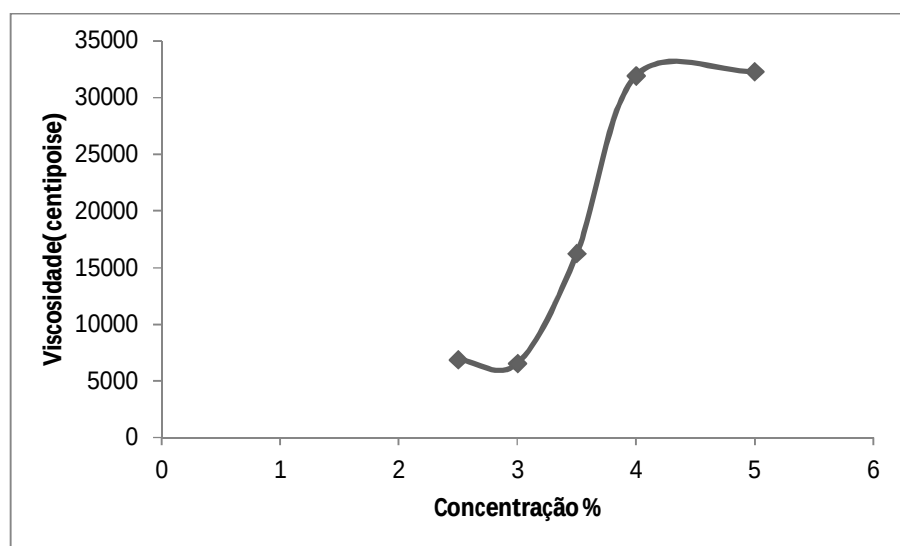


Figura 20. Resultados obtidos nas determinações de viscosidade dos géis produzidos em função da concentração mássica (%) de Aristoflex® AVC, após um período de armazenamento de 90 dias.



Avaliou-se também o comportamento reológico do gel produzido com 4,0% (m/m) de Aristoflex® AVC, uma vez que esta percentagem foi escolhida para

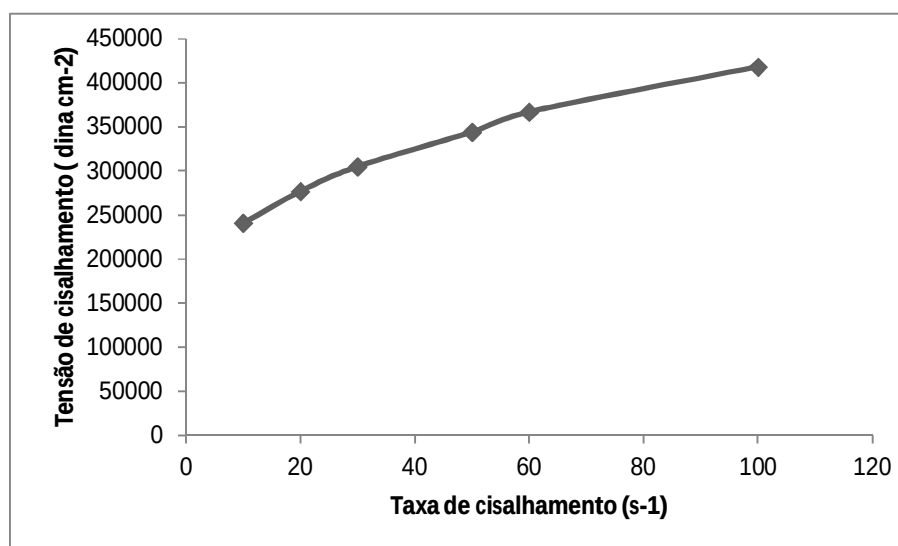
preparação da formulação otimizada para veiculação das micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada. Os fluídos são classificados em duas categorias gerais: Newtonianos e não-Newtonianos. O fluído Newtoniano caracteriza-se por apresentar uma viscosidade constante, independentemente da velocidade de cisalhamento (RPM) aplicada. Já o fluído não-Newtoniano apresenta uma mudança na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Nos sistemas não-Newtonianos, a extensão das interações entre as partículas é a principal responsável pela complexidade do comportamento reológico observado nas preparações. Neste sentido, os fluídos podem assumir diversos comportamentos reológicos, sendo definidos como plásticos, pseudoplásticos ou dilatantes (TAGLIARI, 2012).

O gel otimizado neste trabalho de pesquisa aplicada apresentou um comportamento pseudoplástico, pois a viscosidade aparente do mesmo diminui gradualmente à medida que se aumenta a tensão de cisalhamento. Os resultados obtidos estão plasmados na Tabela 6 e representados de forma gráfica na Figura 21.

Tabela 6. Resultados obtidos para a viscosidade, taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento do gel otimizado com 4,0% (m/m) de Aristoflex® AVC e incorporando micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada.

Viscosidade (centipoise)	Taxa de Cisalhamento (s ⁻¹)	Tensão de cisalhamento (dina cm ⁻²)
24100	10	241000
13850	20	277000
10167	30	305010
6882	50	344100
6117	60	367020
4180	100	418000

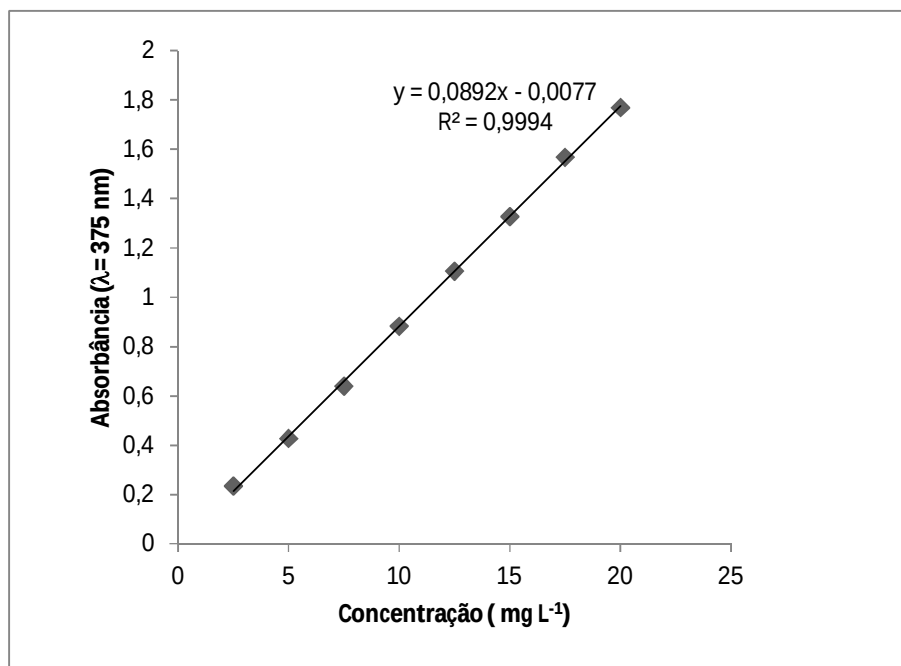
Figura 21. Reograma da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, para o gel otimizado com 4,0% (m/m) de Aristoflex® AVC e incorporando micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada.



5.4.2. Determinação da concentração de princípio ativo por espectrofotometria

Para a determinação da concentração de nitrofurazona no gel contendo as micropartículas de alginato de cálcio com nitrofurazona encapsulada, utilizou-se a técnica espectrofotométrica a um comprimento de onda de 375 nm (TUBINO, VILA, PALUMBO, 2009). Inicialmente, verificou-se a linearidade do método espectrofotométrico utilizando-se para tal soluções padrão de nitrofurazona num intervalo de concentrações de 2,0 mg L⁻¹ a 20,0 mg L⁻¹. O ajuste linear realizado aos resultados das leituras de absorvância a 375 nm das várias concentrações de nitrofurazona produziu uma curva de calibração descrita pela equação $Abs_{375nm} = 0,0892 \times [Nitrofurazona, mg \cdot L^{-1}] - 0,0077$. Obteve-se um coeficiente de determinação (R²) igual a 0,999, o que foi indicativo de uma excelente linearidade do método utilizado. Na Figura 22 pode ser encontrada a curva de calibração produzida.

Figura 22. Curva de calibração produzida no método espectrofotométrico utilizado (Absorbância a 375 nm em função da concentração de nitrofurazona) para dosagem de nitrofurazona. Valores de absorbância lidos num espectrofotômetro da marca Multispec (modelo – 1501, São Paulo, Brasil).



A precisão nas concentrações analisadas (2,5; 10; 12,5; 20 mg L⁻¹) apresentou um coeficiente de variação entre 0,27% e 0,47%. Considerando que o máximo tolerado é de 5% (BRASIL, 2003), o método utilizado pode ser considerado preciso. A exatidão para o método proposto variou entre 99,87% e 109,36% sendo, neste sentido, considerada adequada (BRASIL, 2003). O limite de quantificação e limite de detecção foram de 0,04 mg L⁻¹ e 0,01 mg L⁻¹, respectivamente, ou seja, valores adequados para a análise de produtos farmacêuticos.

Por análise dos resultados obtidos na determinação da concentração de nitrofurazona em amostras de géis contendo micropartículas de alginato de cálcio com nitrofurazona encapsulada, obteve-se um teor de princípio ativo de cerca de 0,18% ± 0,05%, ou seja, o gel otimizado apresentou 90% do princípio ativo estabelecido na formulação.

Normalmente, são utilizadas duas principais técnicas para produção de um gel contendo micro/nanopartículas. A técnica mais utilizada envolve a incorporação de uma parte da suspensão contendo micro/nanopartículas num gel preparado previamente. A outra técnica consiste em utilizar a própria suspensão de micro/nanopartículas como fase aquosa na preparação do gel, segundo Tagliari (2012). Este autor afirma que esta técnica é mais adequada para sistemas com menor concentração de partículas ou com baixo teor de fármaco, pois a formulação final mantém o teor da suspensão original. A técnica utilizada neste trabalho de pesquisa aplicada foi seguida agregando as

micropartículas ao gel. Talvez uma mudança na forma de preparação pudesse manter a concentração de 0,2% (m/m) de princípio ativo considerada apropriada para o fármaco utilizado, embora, de acordo com a Farmacopéia brasileira (2010), se aceite um teor de princípio ativo entre 90% a 110% daquele valor.

5.4.3. Ensaios de fotoestabilidade

Uma vez que a degradação de moléculas sensíveis à radiação é responsável por sérios problemas, é fundamental avaliar a estabilidade dos produtos que contêm substâncias fotossensíveis. A fotodegradação consiste na transformação de uma molécula em pequenos fragmentos de menor peso molecular mediante uma reação química causada pela absorção de radiação ultravioleta, visível ou infravermelha, que se manifesta em efeitos adversos tais como fototoxicidade, fotossensibilização e fotodecomposição (GRANIZO, 2012).

A nitrofurazona é um fármaco que quando exposto à luz solar sofre isomerização com a formação de compostos de coloração amarelo-avermelhado. O processo de fotodegradação da nitrofurazona pode ser explicado através de um modelo cinético envolvendo três reações de primeira ordem (DE LUCA, 2010).

Visando garantir a constante eficácia das formulações desenvolvidas, os géis produzidos foram submetidos à irradiação ultravioleta em câmara com lâmpada UV, de acordo com o procedimento descrito por Melo *et al.* (2007), e os teores de princípio ativo foram avaliados espectrofotometricamente de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Assim, foram feitas análises dos géis preparados nas concentrações de 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0% e 5,0% (m/m) de Aristoflex® AVC incorporando micropartículas de alginato de cálcio com nitrofurazona encapsulada. Para comparação dos resultados, foram submetidos às mesmas condições um gel preparado (2,0% (m/m) de Aristoflex® AVC) contendo nitrofurazona na forma livre e um gel (2,0% (m/m) de Aristoflex® AVC) sem adição de micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada ou de nitrofurazona na forma livre.

Na Tabela 7 podem encontrar-se os valores de concentração mássica (%) de nitrofurazona obtidos após exposição das amostras de géis à radiação ultravioleta, ao fim de 1 hora, 2 horas, 3 horas e 24 horas de exposição. Após um período de tempo de 3 horas de exposição à radiação ultravioleta, verificou-se que não houve variação

significativa nos teores de nitrofurazona, optando-se então pela determinação do teor de nitrofurazona após um período de 24 horas de exposição à radiação ultravioleta.

Pode observar-se, por inspeção da Tabela 7, que a partir de 24 horas de exposição à radiação ultravioleta o teor de nitrofurazona apresentou valores mais elevados em todas as formulações. Esta observação é indicativa de que houve degradação da nitrofurazona em todas as formulações de géis, uma vez que o método espectrofotométrico utilizado não permite a diferenciação entre os produtos de degradação e o princípio ativo. Pode assim concluir-se que a formulação farmacêutica desenvolvida exige proteção quanto à luz para manutenção da sua integridade e atividade antimicrobiana.

Tabela 7. Resultados obtidos nas determinações espectrofotométricas de nitrofurazona nos vários géis preparados, após exposição dos mesmos à radiação ultravioleta (em câmara especial com lâmpada UV da marca Mineralight Lamp, modelo UVGL-58 (254 nm), Berlim, Alemanha).

Géis produzidos com diferentes quantidades (%) de Aristoflex® AVC	Concentração de nitrofurazona (%) em função do tempo de exposição à radiação UV			
	1 hora	2 horas	3 horas	24 horas
2,5 % *	0,151	0,151	0,156	0,172
3,0 % *	0,203	0,203	0,196	0,228
3,5 % *	0,223	0,220	0,190	0,273
4,0 % *	0,129	0,150	0,132	0,191
5,0 % *	0,202	0,208	0,174	0,193
2,0% com nitrofurazona **	0,127	0,130	0,143	0,171
2,0% sem nitrofurazona ***	****	****	****	****

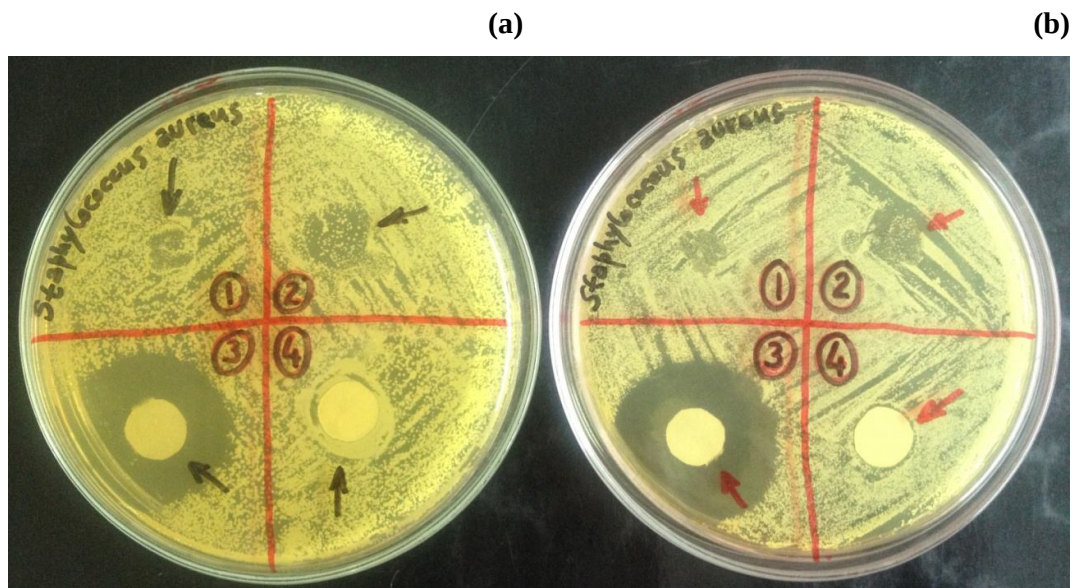
Nota: (*) Gel preparado com 0,2% (m/m) de micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada; (**) Gel preparado com 2,0% (m/m) de Aristoflex® AVC e 0,2% (m/m) de nitrofurazona livre; (***) Gel preparado com 2,0% (m/m) de Aristoflex® AVC, sem nitrofurazona; (****) Gel preparado com 2,0% (m/m) de Aristoflex® AVC, sem nitrofurazona, amostra com valores não detectáveis.

5.4.4. Ensaios de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar

O *Staphylococcus aureus* foi o microrganismo patogênico escolhido para testar a atividade antimicrobiana do gel otimizado incorporando as micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada. Tratando-se de um patógeno oportunista, o *S. aureus* é um dos principais responsáveis por infecções em feridas de queimaduras e cirúrgicas (STAPLETON & TAYLOR, 2002). Além disto, o *S. aureus* é um microrganismo suscetível à ação da nitrofurazona em doses iguais ou superiores a 4 µg mL⁻¹, segundo Yilmaz *et al.* (2002).

Por observação dos resultados obtidos (ver Figura 15) pode-se perceber que as micropartículas são capazes de liberar a nitrofurazona encapsulada, o que pode permitir o uso das micropartículas de alginato de cálcio com nitrofurazona encapsulada em formas farmacêuticas tópicas. Na verdade, uma inspeção cuidadosa da Figura 15 (ver quadrante 2) revela que a aplicação do gel contendo as micropartículas de alginato de cálcio com nitrofurazona encapsulada inibe o crescimento microbiano (ao contrário do gel sem micropartículas incorporadas (ver quadrante 1 na Figura 15)), enquanto que o disco impregnado com nitrofurazona a 0,2% (m/v) em propilenoglicol produziu um halo claro de inibição de crescimento da bactéria. Para eliminar qualquer possibilidade de ação antimicrobiana do solvente utilizado para a nitrofurazona, foi impregnado um disco com propilenoglicol e aplicado sobre a cultura inoculada, tendo o resultado sido claramente negativo em termos de inibição de crescimento bacteriano (ver quadrante 4 na Figura 15). Assim, os resultados obtidos demonstram claramente a atividade antimicrobiana do gel produzido neste trabalho de pesquisa aplicada, o qual incorporou micropartículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada.

Figura 23. Fotografias das placas de Petri (duas réplicas) após realização dos ensaios microbiológicos, mostrando os resultados obtidos. [Legenda das figuras: **quadrante 1** – Gel otimizado com 4% (m/m) de Aristoflex® AVC, sem partículas de nitrofurazona (padrão negativo de inibição); **quadrante 2** – Gel otimizado com 4% (m/m) de Aristoflex® AVC, incorporando partículas de alginato de cálcio contendo nitrofurazona encapsulada; **quadrante 3** – Disco de papel de filtro esterilizado, impregnado com solução de nitrofurazona a 0,2% (m/v) em propilenoglicol (padrão positivo de inibição); e **quadrante 4** – Disco de papel de filtro esterilizado, impregnado com propilenoglicol (padrão negativo de inibição); As setas mostram o local de aplicação das várias amostras a serem testadas].



6. CONCLUSÕES

O objetivo principal deste trabalho de pesquisa aplicada foi o desenvolvimento de um gel de uso tópico incorporando micropartículas de alginato de cálcio com nitrofurazona encapsulada. Considerando as etapas exigidas para a obtenção do produto final, alguns pontos podem ser destacados no processo de desenvolvimento deste trabalho.

O sistema utilizado (extrusão/ solidificação) para obtenção das micropartículas, à escala laboratorial, mostrou-se eficaz, com elevada taxa de encapsulação do ingrediente ativo. As análises físico-químicas realizadas indicaram a produção de micropartículas com uniformidade de tamanho e com pouca interação entre o ingrediente ativo e o polímero utilizado no processo de encapsulação. Estas características são adequadas para garantir a funcionalidade deste tipo de sistema de liberação de ativo quando incorporado num gel intencionado para aplicação tópica.

Inicialmente, a incorporação no gel das micropartículas de alginato de cálcio com nitrofurazona encapsulada provocou a sua desestabilização estrutural. Desta forma, foi fundamental a determinação do teor mínimo de agente gelificante necessário para assegurar a manutenção da viscosidade da formulação, sem ocorrer a sua desestruturação.

Após alteração da formulação inicial, o produto apresentou viscosidade estável e boa aparência. A aparência do gel é um fator determinante para a sua aceitação pelo mercado, e o produto desenvolvido neste trabalho de P&D também atendeu a esta exigência. O gel integrando as micropartículas de alginato de cálcio com nitrofurazona encapsulada apresentou ainda, atividade antimicrobiana adequada para um produto de uso tópico dérmico, e um teor de princípio ativo dentro dos parâmetros aceitáveis e

quanto a sua fotoestabilidade pode se concluir que a forma farmacêutica desenvolvida exige proteção quanto à luz para manutenção da sua integridade e atividade.

Pelos resultados obtidos, a forma farmacêutica proposta neste trabalho apresentou qualidades promissoras para utilização como antimicrobiano tópico. Evidentemente, para uma possível efetiva comercialização deste medicamento será necessária a realização de testes adicionais, tanto *in vitro* como *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ACCHETIN, P. S. C.; MORAES, Â. M.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química Nova**. 33(2): 263-268, 2010.

ADRIANO, J. **Desenvolvimento de forma farmacêutica tópica gel contendo extrato seco de Ipomoea pes-caprae**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas Universidade Vale do Itajaí, Itajaí, 2009.

AGRAWAL, Y.K.; PATEL, D.R. Spectrofotometric determination of nitrofurazone. **Analytical Letters** 19(11&12): 1289-1296, 1986.

AGUILERA, J.M. Why food microstructure? **Journal of Food Engineering** 67: 3-11, 2005.

ALBUQUERQUE, M.L.L. *et. al.* Análise dos pacientes com queimados com sequelas motoras em um hospital de referências na cidade de Fortaleza-CE. **Revista Brasileira de Queimaduras** 9 (3): 89-93, 2010.

ALENCASTRE, J. B. **Micropartículas de carboximetilcelulose/quitosana para liberação de vitamina E na pele: caracterização, avaliação da estabilidade e**

estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro*. Dissertação de Mestrado.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
Ribeirão Preto, 2002 .

ALLEN JR, L. V.; ANSEL, H.C.; POPOVICH, N. G.; **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 8ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2007.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BAUER, A.W; KIRBY, M.M; SHERRIS, J.C, **Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**, Am J Clin Pathol, 45:493-6, 1966.

BEMVINDO, M.C. **Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

BOSQUESI, P.L. **Avaliação da presença do grupo nitro na atividade antichagásica e mutagênica do candidato a fármaco hidroximetilnitrofural (NFOH).** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP , Araraquara, 2009.

BOSQUESI, P.L.; ALMEIDA, A.E.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicadas** 29(3): 231-238, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003.

BRASILEIRO, J.S.L. **Microencapsulação de compostos bioactivos: uma inovação em diferentes áreas.** Trabalho para obtenção do grau de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Fernando Pessoa, Porto/Portugal, 2010.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationery Office, 2010, vol 2 p 1519-1520.

CABRAL, P.K.A. **Sistemas de liberação controlada de drogas: uma revisão.** Monografia Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Curso de Medicina Veterinária. Patos – Pb, 2004.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental.** Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, 2000.

COELHO, S. L. **Desenvolvimento e caracterização de hidrogel para liberação de nitrofurazona,** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba. Sorocaba, Brasil, 2012.

CORREA, N. M.; CAMARGO JUNIOR, F. B; IGNACIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**41(1): 73-78, 2005.

CORREIA, D. **Nanoesferas de ácido poli – láctico co – glicólico(PLA) e complexos de inclusão com ciclodestrinas.** Dissertação em Biologia Funcional e Molecular. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Departamento de Bioquímica – IB Unicamp, 2005.

DALLAN, P.R.M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele.** Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade de Campinas. Campinas, 2005.

DE LUCA, M.; MAS, S.; IOELE, G.; OLIVERIO, F.; RAGNO, G.; TAULER, R. Kinetic studies of nitrofurazone photodegradation by multivariate curve resolution applied to UV-spectral data. **International Journal of Pharmaceutics** 386(1-2): 99-107, 2010.

DE SANTIS, A.C. **Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 2012/213.

DU, J.; HAO, L.; Li, Y.; LU, J. Flow injection chemiluminescence determination of nitrofurazone in pharmaceutical preparations and biological fluids based on oxidation by singlet oxygen generated in *N*- bromosuccinimide-hydrogen peroxide reaction. **Analytica Chimica Acta** 582: 98-102, 2007.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ª ed., vol1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FAULKNER, D.M *et al.* A new stable pluronic ®F68 gel carrier for antibiotics in contaminated wound treatment. **American Journal. Emergency. Medicine** 15 (11): 20-24, 1997.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal Food Technology** 11(2): 103-112, 2008.

FERREIRA, A. O.; BRANDÃO, M. F.; SILVA, M. A. D. C. G. **Guia prático da farmácia magistral.** 1ª ed. Juiz de Fora, 2002.

FERREIRA, E.; LUCAS, R.; ROSSI, L.A.; ANDRADE, D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Revista Escola Enfermagem USP**, 2003:37 (1): 44-51, 2003.

FUJIWARA, G. M; KAMINSKI, G. T. A.; FIN, M. T.; SASSO, D. G. B.; TIBERIO, C. C.; MIGUEL, M. D.; ZANIN, S. M. W. Comparação entre os perfis de liberação de azul

de metileno a partir de micropartículas de alginato-quitosana em pH ácido. **Visão Acadêmica**11(2): 51-58, 2010.

GERALDO, V.P.N. **Filmes nanoestruturados contendo lipossomos para liberação controlada do Ibuprofeno**. Mestrado em Engenharia de Materiais. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

GRANIZO, P.E.R. **Avaliação da fotoestabilidade daacetazolamida e loratadina e da capacidade de fotoproteção de seus complexos com ciclodextrina**. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GRATIERI,T.; GELFUSO,G.M.; LOPES, R. F.V. Princípios básicos e aplicação de iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Quimica Nova*31(6):1408-1418, 2008.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.. **Goodman e Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**, 10º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

HONARY, S.; MALEKI, M. KARAMI, M. The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/ chitosan microparticles containing prednisolone. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** 8 (1): 53-61, 2009.

JOHNSON, J. R., DELAVARI P., AZAR M. Activities of a nitrofurazone containing urinary catheter and a silver hydrogel catheter against multidrug-resistant bacteria characteristic of catheter associated urinary tract infection. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 43: 2990-2995, 1999.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica** 11^a ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAYSER, O.; LEMKE, A.; HERNÁNDEZ-TREJO, N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. **Current Pharmaceutical Biotechnology** 6: 3-5, 2005.

KHODARI, M.; MANSOUR, H.; MERSAL, G.A.M. Cathodic stripping voltammetric behaviour of nitrofurazone and its determination in pharmaceutical dosage form, urine and serum by linear sweep voltammetry. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**. 20: 579-586, 1999.

KIM, J. O.; PARK, J. K.; KIM, J. H.; JIN, S. G.; YONG, C. S.; LI, D. X.; CHOI, J. Y.; WOO, J. S.; YOO, B. K.; LYOO, W. S.; KIMA, J.; CHOI, H. Development of polyvinyl alcohol–sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. **International Journal of Pharmaceutics** 359: 79–86, 2008.

KLEEMANN, A.; ENGEL, J.; KUTSCHER, B. et al. **Pharmaceutical substances: syntheses, patentes , applications**, 4 ° ed. Thieme: Stugat, 2001.

LIRA, A. A. M. **Estudo de permeação *in vitro* e avaliação térmica de emulgel tópico a base de lapachol**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde do Departamento de Ciências Farmacêuticas. Recife, 2003.

LISBOA, M. S. **Obtenção e caracterização do sistema compósito de alginato de sódio-dióxido de titânio em formas de pó e de membrana**. Tese de doutorada. Pós-graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

LUNN, G. **Methods for pharmaceutical analysis**, New York: John Wiley & Sons Inc., v.3, p.1661-1666, 2000.

MADANE, A., JACQUOT, M., SCHER, J., DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, 41: 1-21, 2006.

MARCATO, P D.; DURAN, N. New Aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. 8: 1-14, 2008.

MARTINS, M.R.F.M. & VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**. 38(1): 33-53, 2002.

MÉLEGA, J.M. **Cirurgia plástica- fundamentos e arte: princípios gerais**, 1ª ed. Rio de Janeiro: Médisi, 2002.

MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; MORAES, C.M. et al. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil-ciclodextrina. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada** 28(1): 35-44, 2007.

MENEZES, F.F. **Avaliação da *Calendula officinalis* L. na cicatrização cutânea de cães: aspectos clínicos, histopatológicos e histológicos**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Materiais substitutivos de pele para o tratamento de queimaduras**. Centro Cochrane do Brasil, São Paulo, 2005. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/materiais_substitutivos_pele_queimaduras.pdf. Acesso em 26/04/2013.

MISHRA, A.K.; GODE, K.D. Electrochemical reduction of nitrofurazone and its determination in pharmaceutical dosage forms by D.c. polarography. **Analyst** 110: 1373-1374, 1985.

MOE, S. T. *et al.* Alginates. In A.M. Stephen (Ed.). **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker.p.245-286, 1995.

MORALES, A.; RICHTER, P.; TORAL, M.I. Polarographic determination of nitrofurazone and furazolidone in pharmaceuticals formulations and urine. **Analyst** 112(7): 971-973, 1987.

MORGAN, C.J.; RENWICK, A.G.; FRIEDMANN, P.S. The role of stratum corneum and dermal microvascular perfusion in penetration and tissue levels of water-soluble drugs investigated by microdialysis. **British Journal of Dermatology** 148:434-443. 2003.

NORONHA C., ALMEIDA A. Local burn treatment - topical antimicrobial agents. **Annals Burns and Fire Disasters** - vol. XIII - n. 4, 2000.

OGAJI, I.J.; NEP, E.I.; AUDU-PETER, J.D. Advances in natural polymers as pharmaceutical excipients. **Pharmaceutica Analytica Acta** 3:146-162, 2012.

OLIVEIRA, A.Z.M. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Farmacêutica. Universidade do Porto, Porto, 2009.

OLIVEIRA, S.T. Formulação de Confrei (*Symphytum Officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos, **Rev. Da FZVA Uruguaiana**, v. 7/8,n.1.p.65-74.2000/2001.

PAGANELA , C. J.; RIBAS,L.M.; SANTOS,C.A.; FEIJÓ,L.S.; NOGUEIRA,C.E.W.; FERNANDES,C.G. Abordagem clínica de feridas cutâneas. **Revista Portuguesa de CiênciasVeterinária** 104:569-572, 2009.

PALHARES, A. **Lesões causadas por queimaduras**. Disciplina de cirurgia plástica da Faculdade de Botucatu, 2010. Disponível em http://www.emv.fmb.unesp.br/aulas_on_line/plastica/Queimados2/lesoes_queimaduras.pdf. Acesso em 08 de maio d 2013

PARIZE, A. L. **Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-graduação em Química, Florianópolis, 2009.

PAULA, H. C. B.; OLIVEIRA, E.F.; ABREU, F.O.M. S.; PAULA, R.C.M.; MORAIS, S.L.; FORTE, M.M.C. Esferas (beads) de alginato como agente encapsulante de óleo de croton zehntneri Pax et Hoffm. **Polímeros** 20(2): 112-120, 2010.

PHARMA SPECIAL. **Informe técnico**. Disponível em http://www.pharmaspecial.com.br/imagens/literaturas/lit_aristoflex_avc.pdf. 2013.

PEDERSEN, P.M; JORGENSEN, H.S; KAMMERGAARD, L.P; NAKAYAMA,H.,
Manual and oral apraxia in acute stroke, frequency and influence on functional
outcome: The Copenhagen Stroke Study. *American Journal of Physical Medicine and
Rehabilitation* 80(9):685-92.1999.

PEREIRA, S.V. **Obtenção de dispersões sólidas microparticuladas de piroxicam
por spray congelando**, dissertação para mestrado,faculdade de ciências farmacêuticas
(USP), Ribeirão Preto, 2012.

PRISTA, L.V. **Tecnologia farmacêutica**. 6ª ed. vol I Fundação Calouste Gulbenkian:
Lisboa, 2002.

RECHIA, L.M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de gel a base de
extrato de *Melissa officinalis* L.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Florianópolis, 2010.

REDDAY, C.S.; REDDY, S.J. Electrochemical reduction of nitrofurazone and its
determination in pharmaceuticals dosage forms by differential pulse polarography.
Electroanalysis 4(5): 595-599, 1992.

REDESCHI, M. C. M. **Preparação e caracterização de filmes a base de xiloglucana
extraída de sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá).** 2006. 95 f. Dissertação de
Mestrado,universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

REIS, C. P.; NEUFELD, R.J.; VILELA,S.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. Review and
current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for
the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation* 23(3): 245–257, 2006.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. São Paulo: Pharmabooks,
2006.

ROCHA, C.L.J.V. Histofisiologia e classificação das queimaduras: consequências locais e sistêmicas das perdas teciduais em pacientes queimados. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**.1(3):140-147, 2009.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. **Handbook of pharmaceutical excipients**, 6 ed. Washington:Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.

SACCHETIN, P.S.C.; MORAES, Â. M.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H.C. P. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química Nova** 33 (2): 263-268, 2010.

SANGEETHA, S.; VENKATESH, D. N.; ADHIYAMAN, R.; SANTHI,K.; SURESH, B. Formulation of sodium alginate nanospheres containing amphotericin B for the treatment of systemic candidiasis. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** 6 (1): 653-659, 2007.

SANTANA, A. A. **Influência de características físicas e químicas de plastificantes na confecção e no comportamento estrutural e higroscópico de filmes de alginato de cálcio**, Dissertação de mestrado, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SAPRA,B.; JAIN,S.; TIWARY,A.K. Percutaneous Permeation Enhancement by terpenes: Mechanistic View. **The AAPS Journal** 10:120-132.2008.

SASTRY, B. S.; RAO, J.V.; RAO, T.T.; SASTRY, C. S.P. Four spectrophotometric methods for determination of nitrofurazone in pharmaceutical formulations. **Mikrochimica Acta** 108: 185-193, 1992.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova** 26 (5): 726-737, 2003.

SEVERINO, P; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C.; SOUTO, E.B. Polímeros sintéticos biodegradáveis: matérias-primas e métodos de produção de micropartículas para uso em *drug delivery* e liberação controlada. **Polímeros** 21(4): 286-292, 2011.

SHAJAHAN, M; ENEVER, R.P. A stability indicating assay for nitrofurazone by paper chromatography. **International Journal Pharmacy** 82(3): 215-221, 1992.

SHAJAHAN, M; SHALABY, A. Determination of nitrofurazone in some pharmaceuticals preparations. **International Journal Pharmacy**. 168(2): 169-172, 1998.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** 39 (1):1-20, 2003.

SIMÕES, S.I. Veiculação transdérmica de fármacos: I. A pele humana. II. Libertação transdérmica. **Revista Brasileira de Medicina**. Disponível http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=2004 em. Acesso 30 de maio de 2013.

SONI, M.L.; KUMAR, M.; NAMDEO, K.P. Sodium alginate microspheres for extending drug release: formulation and *in vitro* evaluation. **International Journal of Drug Delivery** 2: 64-68, 2010.

STAPLETON, PD & TAYLOR, PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science Program*, v.85, p.57-72, 2002.

STOCO, S. M. **Liberação de Ropivacaína através da pele: Aspectos biofarmacêuticos da incorporação de promotores de absorção e da encapsulação em nanopartículas**, Dissertação de Mestrado, Universidade de Campinas, Campinas 2001.

SUKSAMRAN, T.; OPANASOPIT, P.; ROJANARATA, T., NGAWHIRUNPAT, T.; RUKTANONCHAI, U.; SUPAPHOL, P. Biodegradable alginate microparticles

developed by electrohydrodynamic spraying techniques for oral delivery of protein. **Journal of Microencapsulation**, 26(7): 563–570, 2009.

TAGLIARI, M.P. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e alginato de sódio para incorporação de ácido glicirrízico, ácido salicílico ou cafeína visando liberação tópica.** Tese de Doutorado em Farmácia. Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

TANNER,T.; MARKS,R. Delivery drugs by the transdermal route:review and comment. **Skin Research and technology** 14:249-260.2008.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos.** São Paulo: Atheneu, 2001.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. THE NATIONAL FORMULARY. 28^o ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2005, p 138 -134.

THONG,H.Y.; ZHANG,H.; MAIBACH,H.I. Percutaneous penetration enhancers: An overview. **Skin Pharmacol Physiol** 20:272-282, 2007.

TRISSEL, L.A. **Trissel's stability of compounded formulations.** Washington: American Pharmacists Association, 411-412. 2009.

TUBINO, M.; VILA, M.D.C.; PALUMBO, M.N. Determination of nitrofurazone in topical pharmaceutical preparations: comparison of the UV-visible diffuse reflectance *versus* transmittance *versus* HPLC methods. **Journal Brazilian Chemical Society** 20(10): 1901-1907, 2009.

VALE, E.C.S. Primeiro atendimento em queimaduras e abordagem do dermatologista. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.80, n.1.p.9-19, 2005.

VILLANOVA, J.C.O.; ORÈFICE, R.L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros Ciência Tecnologia** 20(1): 51-64, 2010.

WALASH, M.I.; EL-BRASHY. A.M.; SULTAN, M.A. Colorimetric determination of some aromatic nitrocompounds of pharmaceutical interest. **Analytical Letters** 26(3): 499-512, 1993.

WANG, S.B.; LIU, Y.G. , WENG, L.J.; MA, X.J. Effect of sodium alginate concentration on membrane strength and permeating property of poly-*l*-arginine group microcapsule. **Chinese Chemical Letters** 15(7): 849-852, 2004.

WILLIAN, A.C.; BARRY,B.W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 56:603-618. 2004.

ZATZ, J.L.; KUSHLA, G.P. Gels In: LIEBERMAN, H.A.; RIEGER, M.M.; BANKER, G.S. **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems**, vol 2. New York: Marcel Dekker, 1996.