



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Elayne Karine Souto de Melo

Desenvolvimento de termogéis de metronidazol e avaliação da permeação cutânea *in vitro* (Dermatofarmacocinética) e *in vivo* (Microdiálise)

Recife – PE
2016

Elayne Karine Souto de Melo

Desenvolvimento de termogéis de metronidazol e avaliação da permeação cutânea *in vitro* (Dermatofarmacocinética) e *in vivo* (Microdiálise)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Leila Bastos Leal

Recife – PE
2016

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

- M528d Melo, Elayne Karine Souto de.
Desenvolvimento de termogéis de metronidazol e avaliação da permeação cutânea *in vitro* (Dermatofarmacocinética) e *in vivo* (Microdiálise) / Elayne Karine Souto de Melo. – 2016.
129 f: il.; tab.; 30 cm.
- Orientadora: Leila Bastos Leal.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Neoplasias cutâneas. 2. Cuidados paliativos. 3. Feridas. 4. Metronidazol. 5. Poloxâmero. I. Leal, Leila Bastos (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-046)

ELAYNE KARINE SOUTO DE MELO

Desenvolvimento de termogéis de metronidazol e avaliação da permeação cutânea *in vitro* (Dermatofarmacocinética) e *in vivo* (Microdiálise)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 30/11/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Leila Bastos Leal (Orientadora e Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Examinador Interno)
Universidade Federal do Pernambuco

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Examinador Interno)
Universidade Federal do Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Noely Camila Tavares Cavalcanti Bedor (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Homero de Souza Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

Diretor de Ciências da Saúde – CCS

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antônio Rodolfo de Faria

Vice – Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Almir Gonçalves Wanderley

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

Rafael Matos Ximenes

Aos meus pais, Valdereis e Moura

AGRADECIMENTOS

A Deus e Maria Santíssima;

Aos meus pais, Valdereis e Moura, minha fortaleza, meu aconchego, meus exemplos. Aos meus irmãos, Erika e Mourinha, meus grandes parceiros, todo o meu amor. Aos meus sobrinhos, Maria, Henrique e Laurinha, enchem minha vida de cor e luz.

A minha orientadora, Profa. Dra. Leila Bastos Leal, obrigada pela orientação, pela amizade, parceria, apoio e confiança. Ao Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, por tantos anos de acolhimento no NUDFAC, viabilização do projeto, pela orientação e confiança.

A Prof. Dra. Eulália Ximenes, pela amizade e interesse no estudo da atividade antimicrobiana das formulações. Obrigada Lili e Luane, pela contribuição. A gente também sai construindo amizades.

A Profa. Dra. Ivone Souza, pela contribuição com os animais para a realização do estudo de permeação.

Ao Prof. Dr. Danilo Bedor, pela contribuição nas análises de quantificação por CLAE-UV e LC-MS/MS; A Carlos Eduardo, Atamai, Diego e Henrique pela ajuda durante as análises.

A Dra Flavia Orange e a Mirella Rebello da Unidade de cuidados paliativos do IMIP pela parceria e empenho para que possamos realizar a avaliação clínica.

Aos Profs. Willian Couet e Sandrine Marchand da Universidade de Poitiers, França, e toda sua equipe, em especial Isabelle Lamarche, Patrice Gobin e Julian Laroche pelo acolhimento, pelo suporte técnico e científico e aprendizado durante o estudo de microdiálise através do período sanduíche;

A Aila Santana e Bety Córdula do Lafepe pela disponibilização de material durante o desenvolvimento do projeto;

Ao Laboratório de Tecnologia dos medicamentos nas pessoas do Prof. Dr. Pedro Rolim e Lamartine pelas análises de espectroscopia no infravermelho, termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial;

A Wilson Souza do Cetene pelas análises de reologia, MEV e Granulometria por difração a laser;

Aos amigos e parceiros do NUDFAC, Noely, Thalita, Ana Rosa, Wellithon, Mariana, Karol, Giovana, Gustavo, Maira; Anelise, Irla, Isabele, Juliana e a Virna pela contribuição com as análises estatísticas e a todos da família FECDA.

Aos meus grandes amigos e pessoas especiais Alice, Daniel, Ellison, Vanessa, Carol Tavares, André, Adriane, Rodolfo, Tereza Raquel, Valderes, Bety Cris e Tereza Antunes. Muuuito obrigada! A Fernando Nóbrega.

Aos colegas, professores, ex-funcionários e funcionários do PPGCF em especial a Nerylin e Julia.

À CAPES pela concessão das bolsas doutorado demanda social e doutorado sanduíche.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste projeto, agradeço de coração.

RESUMO

O metronidazol tópico (MTZ) tem sido amplamente utilizado de forma *off-label* no controle de odor de feridas crônicas a partir de formas farmacêuticas como gel, solução ou comprimidos macerados. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi preparar gel termoreversível contendo metronidazol 0,75% e avaliar a permeação cutânea *in vitro* e *in vivo* pelos métodos de dermatofarmacocinética e microdiálise, respectivamente. O metronidazol foi avaliado quanto às características térmicas, perfil difratométrico, espectroscopia FT-IR, teor por Clae-UV, distribuição granulométrica e MEV. Os géis de MTZ contendo ou não propilenoglicol (PG), denominados F11 e F12, foram preparados através de “cold-method” e a solubilidade do fármaco avaliada. Também foi determinado do pH, a temperatura de transição de fase sol-gel e as características reológicas. Além disso, o estudo de permeação cutânea *in vitro* e *in vivo* foi realizado através de pele de rato íntegra e lesionada por *tape stripping*. A permeação do MTZ nos termogéis foi avaliada frente ao medicamento de referência (Rozex[®]). O fármaco apresentou faixa de fusão entre 157,41 e 162,88 °C, perfil espectrométrico FT-IR sobreponível ao da substância química de referência, teor $99,62 \pm 5,86\%$, granulometria média de 202,40 μm e hábito cristalino colunar. O fármaco apresentou solubilidade maior em propilenoglicol dentre os meios avaliados. Após a preparação dos termogéis, foram obtidos sistemas límpidos com pH $6,36 \pm 0,04$ para F11 e $6,24 \pm 0,03$ para F12. A T_{sol-gel} foi determinada entre 34,5 e 36,5 °C onde os géis apresentaram propriedades pseudoplásticas e tixotrópicas. Na avaliação da permeação cutânea *in vitro*, após 21 h, a quantidade de MTZ permeada foi maior a partir do Rozex[®], tanto em pele íntegra quanto na pele lesionada. Ao mesmo tempo, a quantidade de MTZ retida na epiderme/derme foi superior para os termogéis na pele íntegra, não apresentando diferenças entre as três formulações na retenção na pele lesionada. Quanto ao estrato córneo (EC), o MTZ ficou retido em maior quantidade a partir do termogel sem PG. Foi também verificado que EC foi limitante para a permeação cutânea do MTZ tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Sobre o estudo de microdiálise obteve-se uma alta variabilidade dos resultados levando a dados inconclusivos.

Palavras-chave: Neoplasias cutâneas. Cuidados paliativos. Feridas. Metronidazol. Poloxâmero.

ABSTRACT

Topical metronidazole (MTZ) has been widely used in an off-label way in odor control of chronic wounds from pharmaceutical forms such as gel, solution or macerated tablets. Therefore, the objective of this work was to prepare thermoreversible gel containing 0.75% metronidazole and to evaluate cutaneous permeation in vitro and in vivo by dermatopharmacokinetics and microdialysis methods, respectively. Metronidazole was evaluated for thermal characteristics, diffraction profile, spectroscopy FT-IR, HPLC-UV content, granulometric distribution and SEM. MTZ gels containing or not propylene glycol (PG), designated F11 and F12, were prepared by cold-method and the solubility of the drug evaluated. pH, sol-gel phase transition temperature and the rheological characteristics were also determined. In addition, the in vitro and in vivo cutaneous permeation study was performed through intact rat skin and injured by tape stripping. The permeation of MTZ in thermogels was evaluated against the reference medicine (Rozex[®]). The drug had a melting range between 157.41 and 162.88 °C, an FT-IR spectrometric profile that was available to the reference chemical, content 99.62 ± 5.86%, mean particle size of 202.40 µm and columnar crystalline habit. The drug had higher solubility in propylene glycol among the evaluated media. After preparation of the thermogels, clear systems were obtained with pH 6.36 ± 0.04 for F11 and 6.24 ± 0.03 for F12. T_{sol-gel} was determined between 34.5 and 36.5 °C where the gels had pseudoplastic and thixotropic properties. In the evaluation of skin permeation in vitro, after 21 h, the amount of MTZ permeated was higher from Rozex[®], both in healthy skin and in the injured skin. At the same time, the amount of MTZ retained in the epidermis / dermis was higher for the thermogels in the healthy skin, showing no differences between the three formulations in retention on the injured skin. As for the stratum corneum (SC), the MTZ was retained in greater quantity from the thermogel without PG. It has also been found that SC was limiting to cutaneous permeation of MTZ both in vitro and in vivo. On the microdialysis study a high variability of the results was obtained leading to inconclusive data.

Key-words: Skin neoplasma. Palliative care. Wounds. Metronidazole. Poloxamer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Locais mais comuns de surgimento das feridas neoplásicas	25
Figura 2 – Esquema da progressão de ferida tumoral em função do tempo	26
Figura 3 – Estrutura química do metronidazol	29
Figura 4 – Representação esquemática do mecanismo de gelificação do P-407 em solução.	33
Figura 5 – Remoção do estrato córneo com uso de fita adesiva	35
Figura 6 – Representação esquemática da célula de difusão de Franz	36
Figura 7 – Desenho esquemático do princípio da microdiálise cutânea	37
Figura 8 – Representação esquemática das sondas a) linear e b) concêntrica inseridas na pele	38
Figura 9 – Preparação dos termogéis de MTZ. a) solubilização do fármaco; b) adição do P-407	49
Figura 10 – Pele de rato após dissecação	51
Figura 11 – Corte da pele para uso nas células de difusão	52
Figura 12 – Sistema automatizado de células de Franz Vision® MicroetteTM	53
Figura 13 – Corte de pele sobre compartimento receptor	54
Figura 14 – Sonda de microdiálise CMA/20	58
Figura 15 – Fixação do anel-depósito do gel	59
Figura 16 – Montagem do experimento de microdiálise	60
Figura 17 – Fotomicrografia do MTZ insumo farmacêutico ativo	64
Figura 18 – Morfologia dos Cristais de metronidazol nas magnificações: (a) 40x, (b) 120x e (c) 200x, respectivamente	65
Figura 19 – Calorimetria diferencial exploratória do MTZ IFA e substância química de referência entre 100 e 200 °C	65
Figura 20 – Espectros de infravermelho do MTZ IFA e substância química de referência	66
Figura 21 – Cromatograma do metronidazol	67
Figura 22 – Difratoograma de raios-x do metronidazol	68
Figura 23 – Curva termogravimétrica do MTZ	70
Figura 24 – Calorimetria diferencial exploratória do MTZ entre 25 e 400 °C	70
Figura 25 – Formulações termoreversíveis de MTZ 0,75%, F11 e F12	72

Figura 26 – Gráfico de viscosidade x taxa de cisalhamento a 37 °C dos géis F11, F12 e Rozex®	75
Figura 27 – Gráfico de tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento a 37 °C dos géis F11, F12 e Rozex®	75
Figura 28 – Temperatura de transição de fase sol-gel para gel F11	77
Figura 29 – Temperatura de transição de fase sol-gel para gel F12	78
Figura 30 – Quantidade de MTZ no estrato córneo após 21 h	79
Figura 31 – Quantidade de MTZ retida na epiderme/derme após 21 h – Pele íntegra	80
Figura 32 – Quantidade de MTZ retida na epiderme/derme após 21 h - Pele lesionada	81
Figura 33 – Perfil de permeação do MTZ durante 21 h – Pele íntegra	82
Figura 34 – Perfil de permeação do MTZ durante 21 h – Pele lesionada	82
Figura 35 – Sonda implantada na pele	85
Figura 36 – Anel-depósito fixada sobre a pele do animal	85
Figura 37 – Concentração x tempo do MTZ in vivo durante 21 h – Pele íntegra e pele lesionada	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação do odor de feridas tumorais	28
Tabela 2 – Composição e percentuais dos termogéis de metronidazol 0,75%.....	46
Tabela 3 – Distribuição do tamanho de particular do metronidazol	69
Tabela 4 – Solubilidade do MTZ a 36 °C	73
Tabela 5 – Parâmetros de permeação do MTZ nas formulações	82
Tabela 6 – Porcentagem de MTZ retido na EP/D e permeado em função da quantidade administrada	83
Tabela 7 – Número de animais por DMD	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

Cin: concentração de entrada

Cout: concentração de saída

CV: coeficiente de variação

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta

DSC: calorimetria exploratória diferencial

DP: desvio padrão

DPK: dermatofarmacocinética

DMD: microdiálise cutânea

EC: estrato córneo

ECF: espaço extracelular

EP / D: epiderme / derme

FDA: *Food and Drug Administration*

F. BRAS: Farmacopéia Brasileira

F11: Termogel 11

F12: Termogel 12

FT-IR: Infravermelho com transformada de Fourier

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IFA: insumo farmacêutico ativo

CL-EM/EM: cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas

KBr: Brometo de potássio

MD: microdiálise

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MTZ: metronidazol

PG: propilenoglicol

PEO: óxido de etileno

PPO: óxido de polietileno

P-407: Poloxamer 407

RR: recuperação relativa

RPM: rotação por minuto

SQR: substância química de referência

TEWL: perda de água transepidérmica

TG: termogravimetria

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem
g – grama
mg – miligrama
 μg – micrograma
ng - nanograma
mL – mililitro
 μL - microlitro
m - metro
cm – centímetro
mm – milímetro
 μm – micrômetro
 $^{\circ}\text{C}$ – grau celsius
h – hora
min – minuto
s - segundo
pH – potencial hidrogeniônico
 k_p – constant de permeabilidade
KV: quilovolts
J– fluxo
kDa – quilodalton
mM – milimolar
 m/z – relação massa/carga
v/v – relação volume/volume
 $\geq$ - maior ou igual a que
 $\leq$ - menor ou igual a que
n– número
UI – unidade internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 FERIDAS ONCOLÓGICAS	25
3.2 CONTROLE DE ODOR	28
3.3 METRONIDAZOL	29
3.3.1 Propriedades farmacocinéticas	30
3.3.2 Propriedades farmacodinâmicas	31
3.3.3 Metronidazol no controle de odor de feridas	31
3.4 GÉIS TERMOREVERSÍVEIS	32
3.5 DERMATOFARMACOCINÉTICA	34
3.6 MICRODIÁLISE CUTÂNEA	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 INSUMOS, REAGENTES E ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS	42
4.2 EQUIPAMENTOS E SOFTWARES	43
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO METRONIDAZOL (IFA)....	44
4.3.1 Descrição do ifa e microscopia eletrônica de varredura	44
4.3.2 Faixa de fusão	44
4.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier	45
4.3.4 Teor por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV)	45
4.3.5 Perfil difratométrico	45
4.3.6 Distribuição granulométrica por difração a laser	45
4.3.7 Caracterização térmica	45
4.4 DELINEAMENTO DOS GÉIS TERMOREVERSÍVEIS DE METRONIDAZOL 0,75%	46
4.4.1 Preparação dos géis termoreversíveis	46
4.4.2 Estudo de solubilidade	47
4.4.3 Determinação do pH	48

4.4.4 Avaliação viscosimétrica	48
4.4.5 Determinação da temperatura de transição SOL-GEL.....	48
4.4.5.1 Técnica do tubo	49
4.5 BIODISPONIBILIDADE CUTÂNEA: DPK <i>IN VITRO</i> E MICRODIÁLISE <i>IN VIVO</i>	49
4.5.1 <i>Tape stripping</i>	50
4.5.2 Obtenção e preparação da pele	50
4.5.3 Perda de água transepidermica	52
4.5.4 Permeação cutânea <i>in vitro</i>	52
4.5.5 Dermatofarmacocinética <i>in vitro</i>	55
4.5.6 Microdiálise <i>in vivo</i>	56
4.5.6.1 Animais	56
4.5.6.2 Implantação do cateter arterial femoral.....	57
4.5.6.3 Implantação da sonda de microdiálise e anel-depósito na pele	58
4.5.6.4 Procedimento de microdiálise cutânea	59
4.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS POR CL-EM/EM	61
4.7 ANÁLISE DE AMOSTRAS POR CLAE-UV	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO METRONIDAZOL (IFA).....	64
5.1.1 Descrição do ifa e microscopia eletrônica de varredura	64
5.1.2 Faixa de fusão	65
5.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	66
5.1.4 Teor por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV)	67
5.1.5 Perfil difratométrico	67
5.1.6 Distribuição granulométrica por difração a laser	68
5.1.7 Caracterização térmica	69
5.2 DELINEAMENTO DOS GÉIS TERMOREVERSÍVEIS DE METRONIDAZOL 0,75%	71
5.2.1 Preparação dos géis termoreversíveis.....	71
5.2.2 Estudo de solubilidade	72
5.2.3 Determinação do pH	73

5.2.4 Avaliação viscosimétrica	74
5.2.5 Determinação da temperatura de transição sol-gel	76
5.3 BIODISPONIBILIDADE CUTÂNEA: DPK <i>IN VITRO</i> E MICRODIÁLISE <i>IN VIVO</i>	78
5.3.1 Estudo da permeação cutânea e avaliação da DPK <i>In vitro</i>	78
5.3.2 Permeação cutânea <i>in vivo</i> (DMD)	83
5.3.2.1 Implantação do cateter arterial femoral.....	83
5.3.2.2 Implantação da sonda de microdiálise e anel de depósito	84
5.3.2.3 Microdiálise cutânea	86
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	90
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICES	101
ANEXOS	110
ANEXO A – Carta de aceitação do artigo “Metronidazole thermogel improves retention and decreases permeation through the skin” publicado na revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences	110
ANEXO B – Artigo “Metronidazole thermogel improves retention and decreases permeation through the skin” aceito na revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences	111

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Feridas oncológicas são lesões complexas que surgem a partir de metástases ou mesmo de um câncer primário sendo mais frequentes nas mamas, cabeça e face, genitais, virilha e costas. (PROBST; ARBER; FAITHFULL, 2013; DAVIS et al, 2011).

Contribuem com o aspecto desagradável das feridas, a presença de exsudato e sangramento, a dor e o odor fétido que provocam no paciente uma inquietude com a própria imagem, sensação de abandono, humilhação e isolamento do convívio social (AGRA et al, 2013). Além disso, são lesões sem perspectivas de cura e o tratamento visa diminuir o sofrimento físico e psicológico e promover melhora na qualidade de vida dos pacientes (FIRMINO, 2005; WOO, SIBBALD, 2010).

O odor desagradável dessas feridas é, principalmente, provocado pelos produtos metabólicos das bactérias anaeróbias que incluem a volatilização de ácidos graxos (propiónico, butírico, valérico, isobutírico e isovalérico), compostos sulfúricos, putrescina e cadaverina (WOO, SIBBALD, 2010; PERCIVAL, CUTTING, 2010; O'BRIEN, 2012).

O uso do metronidazol tópico no controle da infecção e, portanto, do odor tem sido amplamente difundido nos centros de cuidado paliativos, além de ser preconizado pelo Instituto Nacional do câncer. Todavia, se trata do uso *off-label* através da aplicação de géis, soluções e comprimidos macerados no leito da ferida (FIRMINO, 2005; INCA, 2009; LIPSKY, HOEY, 2009; SANTOS, PIMENTA, NOBRE, 2010; WOO, SIBBALD, 2010; CHRISMAN, 2010, AGRA et al, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Além do uso de comprimidos macerados (procedimento utilizado comumente na rotina destes centros), a aplicação de géis termoreversíveis contendo metronidazol poderia ser uma alternativa no manejo dessas lesões. Os termogéis a base de Poloxamer 407 são soluções a temperatura ambiente e semi-sólidos na temperatura corporal. Essa característica lhes confere fácil aplicação sem necessidade de espalhamento, gelificação *in situ* e liberação controlada do fármaco tornando-a atrativa para o uso sobre as feridas. Além disso, são pontos favoráveis as propriedades de biodegradabilidade, estabilidade e baixa toxicidade conferida aos polímeros de Poloxamer (LU et al, 2015).

Além da avaliação dos parâmetros de controle de qualidade dos produtos medicamentosos desenvolvidos, a avaliação da performance deve ser feita mediante

ensaios de liberação e permeação *in vitro*. Neste contexto, a dermatofarmacocinética (DPK) bem como a microdiálise dérmica (MD), têm sido amplamente utilizadas para a avaliação da biodisponibilidade dos produtos tópicos.

A DPK é um método não invasivo de aplicação *in vitro* e *in vivo* e de fácil execução para avaliar do fármaco presente no estrato córneo em função da aplicação e pós-remoção da formulação através a técnica de *tape stripping* (N'DRI-STEMPFER et al., 2008). O *tape stripping* compreende, portanto, a remoção do EC com o uso sequencial de fitas adesivas (PINKUS, 1951).

A microdiálise (MD) é uma técnica *in vivo* de amostragem capaz de mensurar em tempo real a concentração de fármacos livres e substâncias endógenas no espaço extracelular do tecido alvo. (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010). O princípio da MD consiste na difusão substâncias regida por gradiente de concentração através de sonda com uma membrana semipermeável (HERKENNE et al., 2008a). Na microdiálise cutânea (DMD), a sonda é inserida na derme e perfundida por uma solução fisiológica favorecendo a troca de substâncias através da membrana (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010). Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, amostras finais da perfusão são coletas e doseadas por técnicas sensíveis.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver formas farmacêuticas seguras e eficazes à base do metronidazol, visando sua utilização na diminuição do odor de feridas oncológicas.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar a biodisponibilidade de géis termoreversíveis contendo metronidazol 0,75% através da dermatofarmacocinética e microdiálise cutânea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar e realizar controle de qualidade físico-químico o insumo farmacêutico ativo;
- Desenvolver géis termoreversíveis de MTZ; líquidos a temperatura ambiente e géis a temperatura corporal;
- Caracterizar as formulações desenvolvidas (determinar pH, temperatura de transição de fase sol-gel e propriedades reológicas das preparações obtidas);
- Avaliar a permeação cutânea in vitro dos termogéis em pele de rato íntegra e lesionada;
- Avaliar a biodisponibilidade das preparações de MTZ através da Dermatofarmacocinética e compará-la ao medicamento de referência;
- Avaliar a biodisponibilidade das preparações de MTZ através da microdiálise dérmica e compará-la ao medicamento de referência.
- Avaliar a correlação in vitro/ in vivo entre as diferentes técnicas.

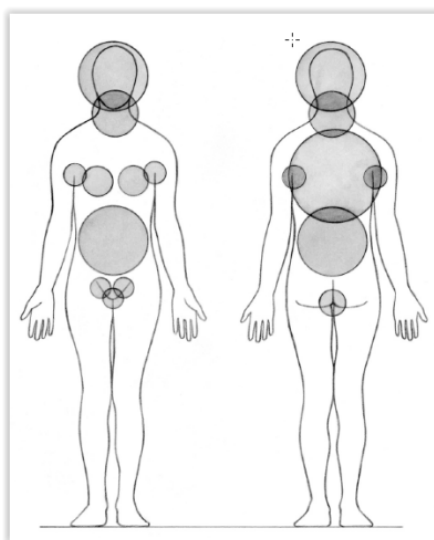
Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FERIDAS ONCOLÓGICAS

As feridas oncológicas, ou tumorais, constituem lesões complexas que podem ser decorrentes de metástases ou mesmo de um câncer primário (DAVIS et al, 2011). Os locais onde frequentemente aparecem são: a mama (62%), seguido pela cabeça e face (24%), genitais, virilha e costas (3%) (PROBST; ARBER; FAITHFULL, 2013) (Figura 1):

Figura 1 - Locais mais comuns de surgimento das feridas neoplásicas



Fonte: Extraído de CLARK, 2012.

O surgimento dessas feridas se dá pela invasão das células malignas no tecido epitelial que se infiltram nos vasos linfáticos ou sanguíneos e alcançam a epiderme levando a perda da integridade da pele (BENBOW, 2009; O'BRIEN, 2012).

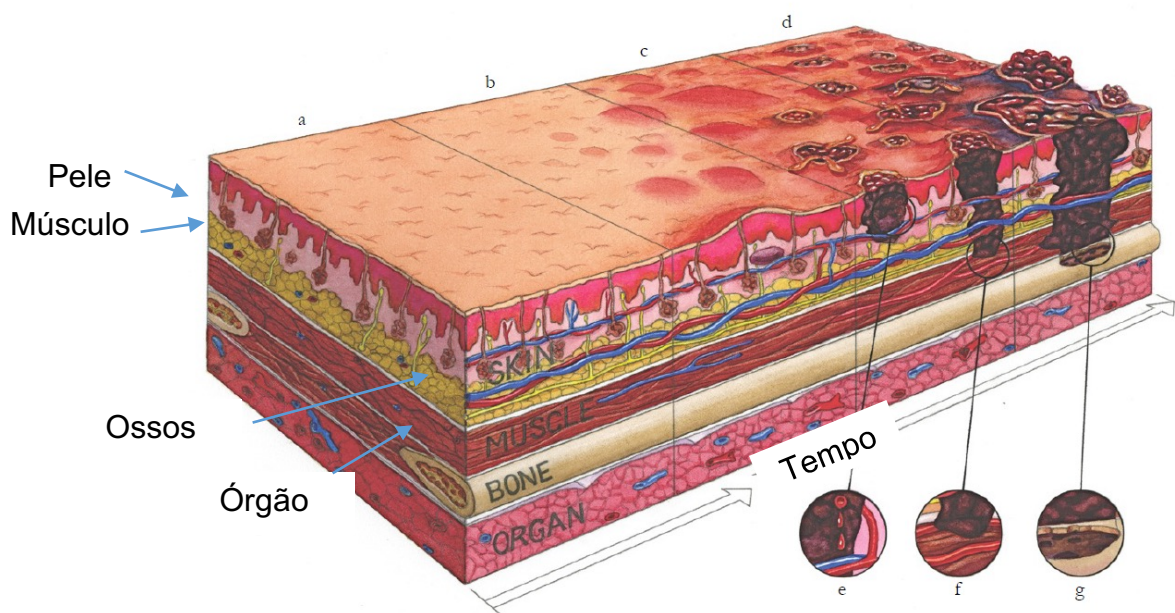
De acordo com o “Guia de Cuidados Paliativos para o Tratamento e Controle de Feridas Tumorais e Úlceras por Pressão no Câncer Avançado” do INCA, o processo de formação das feridas tumorais compreende basicamente três etapas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009):

- 1) Crescimento tumoral: caracterizado pelo crescimento desordenado e anormal do tumor, levando a ruptura da pele. A partir desse evento, no sítio da ferida forma-se uma massa tumoral necrótica, local propício para o desenvolvimento de micro-organismos aeróbios e anaeróbios.

- 2) Neovascularização, necessária para prover substratos à massa tumoral crescente.
- 3) Invasão às células: expansão da ferida.

Através do esquema seguinte é possível uma melhor visualização dos processos ocorridos no desenvolvimento da ferida neoplásica (Figura 2):

Figura 2 - Esquema da progressão de ferida tumoral em função do tempo.



Fonte: Extraído de CLARK, 2012.

- a) Tecido epitelial saudável, sem alteração;
- b) Infiltração do câncer em estágio inicial na forma de nódulos;
- c) Quebra da integridade da pele, formação de exsudato e invasão para outros tecidos;
- d) Último estágio apresentando ulcerações e lesões fungosas, tecidos profundos afetados;
- e) Sangramento;
- f) Invasão para os vasos sanguíneos e linfáticos e para o tecido muscular;
- g) Erosão óssea, complicações sistêmicas.

Sobre a morfologia das feridas tumorais, um levantamento publicado por Probst e cols, em 2009, a maioria se manifesta como uma úlcera (59%), seguido por uma forma fungosa (31%), uma crosta (25%), nodular (24%), a forma da cratera (23%) e outros (6%) (PROBST; ARBER; FAITHFULL, 2009). Todavia, é comum o aparecimento de lesões múltiplas com formas combinadas ou não.

Quando a pele é lesionada, um conjunto de processos bioquímicos é requerido a fim de promover a cicatrização. A cicatrização compreende um evento complexo e pode ser dividida em três fases: Inflamatória, Proliferativa e a de Remodelação (LI, CHEN, KIRSNER, 2007). No que concerne à cicatrização das feridas tumorais, apenas a fase inflamatória é presenciada, não evoluindo para as etapas proliferativas e de remodelação (LUND-NIELSEN, 2011).

Na prática clínica é observado que pacientes submetidos a tratamento rádio e quimioterápicos apresentam redução e involução das feridas. Todavia, nos estágios mais avançados em que a terapia curativa é substituída pelos Cuidados Paliativos, é questionável o uso de substâncias cicatrizantes, visto que essas favorecem a divisão celular para fins de reparo tecidual (AGUIAR; SILVA, 2012).

Dessa forma, o manejo dessas lesões está centrado no gerenciamento dos sintomas e na tentativa de prevenir a exacerbação das feridas existentes (WOO; SIBBALD, 2010).

Para que se possa escolher a melhor forma de cuidado, faz-se necessária a avaliação clínica pelos profissionais de saúde. Esta avaliação é feita com base na anamnese do paciente ou cuidador, localização da lesão, tamanho, grau de odor, quantidade de exsudato, prurido, fístulas, dor ou presença de sangramento e a classificação realizada de acordo com o estadiamento (LEITE, 2007).

É importante ressaltar que o aspecto desagradável das feridas, a excreção de exsudato e sangramento, a dor e o odor fétido liberado, provocam no paciente uma inquietude com a própria imagem, sensação de abandono, humilhação e isolamento do convívio social. Além disso, a deformação corporal e o procedimento terapêutico fazem com que o paciente perceba que não há chances de cura da doença e o insucesso terapêutico sugere a aproximação da morte (AGRA et al, 2013).

Portanto, a conduta dos cuidados das feridas oncológicas está direcionada para diminuir o sofrimento físico e psicológico e para a melhora na qualidade de vida

dos pacientes através do controle da dor, sangramento, odor fétido, exsudato e infecção (FIRMINO, 2005; WOO, SIBBALD, 2010).

3.2 CONTROLE DE ODOR

O mau odor exalado pelas feridas oncológicas é um dos principais motivos que levam os pacientes portadores de feridas oncológicas ao isolamento social, além de agravar a sensação de abandono, angustia e humilhação (PONTE, FERREIRA, COSTA, 2012).

Com o crescimento desorganizado das células tumorais, formam-se no sítio da ferida agregados de massa tumoral necrótica que facilita a proliferação bacteriana de micro-organismos aeróbios (*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) e, predominantemente, anaeróbios, em sua maioria, *Peptostreptococcus* e *Bacteroides* spp. (GROCOTT, 2002; POLETTI et al, 2002).

O odor desagradável dessas feridas é, principalmente, provocado pelos produtos metabólicos das bactérias anaeróbias que incluem a volatilização de ácidos graxos (propiónico, butírico, valérico, isobutírico e isovalérico), compostos sulfúricos, putrescina e cadaverina (WOO, SIBBALD, 2010; PERCIVAL, CUTTING, 2010; O'BRIEN, 2012).

Em 1984, foi proposta por Ashford e cols. a primeira escala de classificação de odor de feridas tumorais. Outra classificação é sugerida no manual de condutas de cuidados paliativos de feridas crônicas. Ambas as classificações estão descritas na tabela abaixo (Tabela 1):

Tabela 1 - Classificação do odor de feridas tumorais

Ashfor et al, 1984		Ministério da Saúde, 2009	
Nível de odor	Característica	Grau de odor	Características
Nível 0 (zero)	Ausência de odor	-	-
Nível 1	Odor não ofensivo;	Grau 1	Sentido ao abrir o curativo
Nível 2	Ofensivo, mas tolerável	Grau 2	Sentido ao se aproximar do paciente, sem abrir o curativo
Nível 3	Ofensivo e intolerável	Grau 3	Sentido no ambiente, sem abrir o curativo. É caracteristicamente forte e/ou nauseante

Fonte: Ashfor, R., 1984. Ministério da Saúde, 2009.

O controle de odor de feridas tem se tornado um desafio aos Centros de Cuidados Paliativos. A literatura cita a utilização das mais variadas substâncias, tais como: carvão ativado, alginato de cálcio, hidrogéis, hidrocolóides, enzimas debridantes, pensos de prata, mel, açúcar granulado, iogurte, leite de cabra, extrato de chá-verde, óleos essenciais e sulfadiazina de prata (GETHIN et al., 2014; LIPSKY; HOEY, 2009).

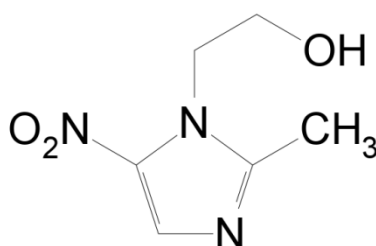
Todavia, o metronidazol é a substância referência utilizada no controle de odor das feridas oncológicas (CHRISMAN, 2010; DA COSTA SANTOS; DE MATTOS PIMENTA; NOBRE, 2010; FINLAY et al., 1996; FIRMINO, 2005; GETHIN et al., 2014; LIPSKY; HOEY, 2009; PAUL; PIEPER, 2008; WOO; SIBBALD, 2010)

3.3 METRONIDAZOL

O metronidazol (MTZ) (2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-etanol) é um fármaco sintético derivado do nitroimidazol que possui amplo espectro contra protozoários e bactérias anaeróbias (GOODMAN, GILMAN, 2003; ZIP, 2010) (Figura 3).

Comercialmente, o fármaco está disponível em especialidades farmacêuticas de uso oral (comprimidos revestidos), intravenosa, vaginal (gel e creme) e tópica (gel), associado ou não a outros compostos.

Figura 3 - Estrutura química do metronidazol



Fonte: autoria própria

Quanto às características do fármaco, apresenta-se como um pó cristalino branco ou levemente amarelado, de peso molecular 171,15 g / mol, fórmula molecular C₆H₉N₃O₃ e faixa de fusão entre 159 e 163 °C (F. BRAS, 2010).

É indicado para o tratamento de tricomoniase, amebíase e giardíase, bem como em diversos processos infecciosos provocados por bactérias anaeróbicas

obrigatórias, do gênero, *Bacteróides* e *Clostridium* (GOODMAN, GILMAN, 2003). Apesar de não haver bons resultados em estudos clínicos comparativos, o metronidazol é fármaco de escolha em infecções anaeróbicas intra-abdominais e intrapélvicas e em abscessos cerebrais (FUCHS, WANNAMACHER, FERREIRA, 2004; LÖFMARK; EDLUND; NORD, 2010).

O MTZ é utilizado na clínica médica há quase 50 anos sendo considerado um fármaco seguro. São raros os efeitos colaterais graves com necessidade de suspensão da terapia. Os efeitos adversos mais comuns são cefaleia, náusea, boca seca e gosto metálico. Também o paciente pode apresentar vômitos, diarreia e mal-estar abdominal (GOODMAN, GILMAN, 2003).

3.3.1 Propriedades farmacocinéticas

O MTZ apresenta rápida e completa absorção após a administração via oral, já pela via tópica a absorção sistêmica é declaradamente baixa. Após a administração de 1g do gel (0,75%) na face de adultos com rosácea, as concentrações séricas resultantes variaram entre indetectável e 66 µg/ L em 24 horas seguintes (FREEMAN; KLUTMAN; LAMP, 1997).

A ligação às proteínas plasmáticas é menor do que 20% após a administração oral, após a aplicação tópica não foi relatada. Apresenta boa penetração celular e distribui-se bem por todos os tecidos e líquidos do organismo. Níveis terapêuticos são encontrados nos líquidos seminal e vaginal, na saliva, no leite, na placenta e no líquido cefalorraquiano (CLARK, 2013; FREEMAN; KLUTMAN; LAMP, 1997; MCCLELLAN & NOBLE, 2000).

O MTZ sofre biotransformação, principalmente por metabolismo oxidativo seguido pela glicuronização, com a formação de diversos compostos que são encontrados na urina. Esses incluem os metabólitos hidroxí [1- (2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol] e o metabólito ácido (1-ácido acético-2- metil-5-nitorimidazol). O principal metabólito é o hidroximetronidazol. O fármaco inalterado e os metabólitos oxidativos excretados na urina representam cerca de 35 a 65 % da dose administrada (RALPH, 1983; CLARK, 2013).

3.3.2 Propriedades farmacodinâmicas

O mecanismo de ação do MTZ ainda não foi totalmente elucidado, mas inclui a inibição da síntese de DNA e danos no DNA do micro-organismo, por oxidação, levando a quebra das fitas simples e dupla ocasionando degradação de DNA e morte celular (LÖFMARK; EDLUND; NORD, 2010). Em infecções por anaeróbicas o grupo nitro do MTZ é capaz de servir como aceptor de elétrons, formando compostos citotóxicos que se ligam às proteínas e ao DNA levando a morte celular (CLARK et al., 2013).

O MTZ é bem tolerado quando administrado na forma gel, creme ou loção. O problema mais comum após o uso tópico é a reação local (ardor), mas isso tem sido relatado em $\leq 2\%$ dos doentes em ensaios clínicos e é de difícil distinção em relação aos sintomas da rosácea. As concentrações de MTZ absorvidas sistemicamente após aplicação tópica são insignificantes, o que evita possíveis reações associadas ao uso do MTZ oral a longo prazo. (GOODMAN & GILMAN, 2003; MCCLELLAN & NOBLE, 2000).

3.3.3 Metronidazol no controle de odor de feridas

Um dos primeiros relatos da utilização do MTZ no controle de odor de feridas oncológicas foi atribuído a Ashfor e cols, 1984, que realizou estudo duplo-cego com a administração de 200 mg do fármaco 3 vezes ao dia durante 14 dias frente ao placebo numa amostra de 6 pacientes. Os pesquisadores observaram que o MTZ foi eficaz na eliminação de bactérias anaeróbias e reduziu o odor das feridas.

A utilização tópica *off-label* do MTZ no controle de odor de feridas é amplamente citada na literatura e preconizada pelo INCA (FIRMINO, 2005; INCA, 2009; LIPSKY, HOEY, 2009; SANTOS, PIMENTA, NOBRE, 2010; WOO, SIBBALD, 2010; CHRISMAN, 2010, AGRA et al, 2013).

A orientação do INCA é que para as lesões cutâneas de grau I e II seja utilizado o MTZ tópico na forma de gel. Para os casos de indisponibilidade do gel a 0,8%, uma suspensão pode ser preparada a partir da maceração de um comprimido de MTZ 250 mg para 50 mL de soro fisiológico 0,9%, água destilada ou solução injetável. Para as

lesões de grau III, a indicação é associar o metronidazol sistêmico (endovenoso ou oral) ao tratamento tópico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Além disso, do uso do MTZ em gel ou suspensão (obtida a partir dos comprimidos), é prática clínica também a aplicação de comprimidos macerados diretamente sobre as lesões de acordo com a sua extensão (ZIP, 2010).

3.4 GÉIS TERMOREVERSÍVEIS

Géis termoreversíveis, termosensíveis ou termogéis são sistemas de formação *in situ* que se comportam como líquidos a baixas temperaturas e como géis acima de uma temperatura específica conhecida como temperatura de transição sol-gel (DUMORTIER et al., 2006; PEREIRA et al., 2013).

Na área farmacêutica, o Poloxamer® é um conjunto de blocos poliméricos que tem sido utilizados em formulações direcionadas para administração oral, parenteral, oftálmica, vaginal, retal, tópica e transdérmica (DUMORTIER et al., 2006; ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006; PEREIRA et al., 2013).

O Poloxamer® foi introduzido comercialmente nos EUA a partir de 1950 e encontra-se registrado com as marcas: Pluronic®, Synperonic®, Tetronic®. Se trata de um grupo de copolímeros anfifílicos de óxido de etileno (PEO, hidrofílico) e óxido de polietileno (PPO, hidrofóbico) organizados em uma estrutura de triblocos PEOX-PPOY-PEOX (DUMORTIER et al., 2006; YAPAR; INAL, 2012).

Os tipos de poloxamers mais comumente utilizados são 188 (F-68), 237 (F-87), 338 (F-108) e o 407 (F-127), a letra “F” se refere a forma de flocos que o produto se encontra disponível (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006).

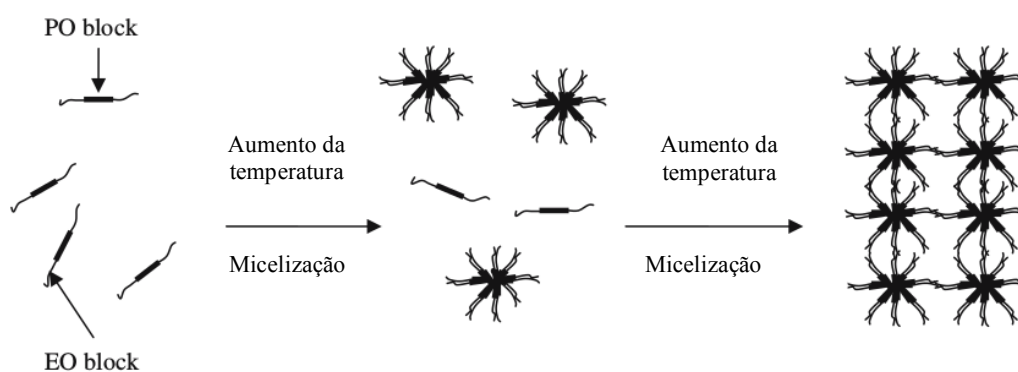
O Poloxamer 407 (P-407) conta com um arranjo de 70% de PEO que lhe confere maior hidrofília. É um copolímero com peso molecular de 13.000, baixa toxicidade e maior solubilidade em água fria. A temperatura próxima de 4 °C forma sistemas líquidos transparentes e adquire consistência semi-sólida a temperatura corporal em concentrações acima de 15% formando géis translúcidos (ALMEIDA et al., 2012; ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006; YAPAR; INAL, 2012).

O P-407 é identificado como grânulos (flocos) brancos, com fluxo livre, inodoro e insípido. Em baixas temperaturas quando em contato com a água, o P-407 forma

uma solução pela solvatação das unidades poliméricas e a formação de pontes de hidrogênio com a porção hidrofílica do polímero. Com o aumento da temperatura, as cadeias poliméricas desidratam como resultado da quebra das ligações hidrogênio favorecendo a interação entre as cadeias hidrofóbicas de PPO iniciando a formação de micelas (DUMORTIER et al., 2006; ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006).

Em um primeiro momento durante essa nova interação, ocorre a formação de micelas, primeira etapa da gelificação. Com o aumento gradual da temperatura, as micelas tendem a se organizar em uma estrutura cúbica que leva ao aumento da viscosidade resultando na formação do gel (CABANA; AIT-KADI; JUHASZ, 1997; DUMORTIER et al., 2006; KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002) (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática do mecanismo de gelificação do P-407 em solução.



Fonte: Extraído de DUMORTIER, 2006

A temperatura de transição da fase sol-gel ($T_{sol-gel}$) dos sistemas de P-407 varia de acordo com a concentração do polímero na solução, quanto maior a concentração utilizada menor a temperatura de transição de estado físico (VINTILOIU; LEROUX, 2007). Na temperatura corporal o P-407 formará gel à concentrações entre 10% - 25% (RICCI; et al., 2004). O viscosidade géis de P-407 dependerá, portanto, da concentração do polímero em função da temperatura alcançando valor máximo a temperatura entre 30 e 50 °C (ALMEIDA et al., 2012).

Além da concentração do polímero, excipientes e insumos farmacêuticos ativos (IFA) podem afetar a temperatura tais como: sais, agentes geleificantes, solventes, lidocaína, morfina, diclofenaco e vitamina B12 (DUMORTIER; et al., 2006). A alteração

na Tsol-gel, irá afetar propriedades reológicas do gel, quando formado, e consequente alterações na adesividade e força do gel (VINTILOIU; LEROUX, 2007).

O P-407 tem sido amplamente utilizado em produtos de uso tópicos e transdérmico. A aplicação tem sido voltada ao desenvolvimento formulações quando se pretende promover, retardar ou melhorar a permeação de fármacos na pele. Deve-se considerar que na administração tópica é desejável acúmulo do fármaco com permeação mínima (ALMEIDA et al., 2012).

O principal foco do uso tópico e transdérmico do P-407 tem sido na veiculação de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-infecciosos por ter o potencial de entrega do fármaco em baixas dosagens através pele para o tratamento da dor local e inflamações (ALMEIDA et al., 2012; BONACUCINA et al., 2011).

Dentre as aplicações do Poloxamer®, sistemas de liberação têm sido desenvolvidos para o tratamento de feridas crônicas. Du, et al (2016) empregaram o polímero para a veiculação de um complexo de cúrcuma-fosfolípido visando acelerar a cicatrização tecidual. Com o objetivo de diminuir a dor causada por queimaduras severas, Heilmann e colaboradores (2013) prepararam um hidrogel de P-407 contendo morfina. Pereira, et al (2013) usaram o poloxamer para obtenção de formulações contendo ácido hialurônico e micropartículas de Aloe vera / quitosana / vitamina E / polisorbato 80 também para o tratamento de queimaduras graves.

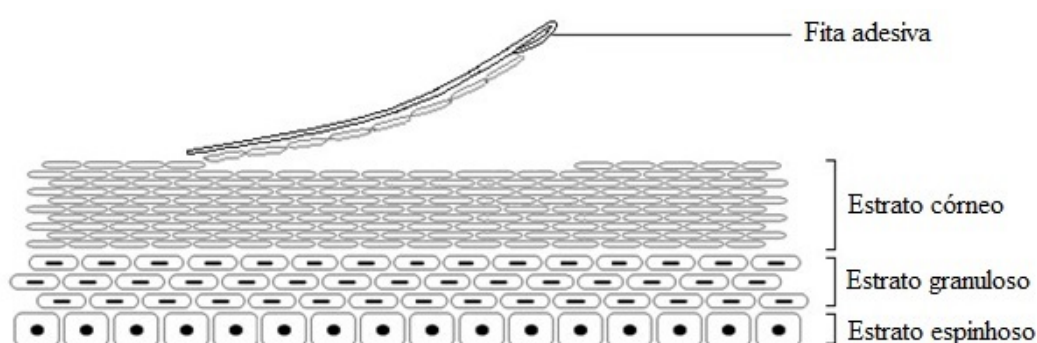
De um modo geral, a característica termoreversível desses hidrogéis de fácil aplicação sem necessidade de espalhamento, gelificação in situ e liberação controlada tem sido um atrativo para o uso sobre as feridas. Além disso, são pontos favoráveis as propriedades de biodegradabilidade, estabilidade e baixa toxicidade conferida aos polímeros de Poloxamer (LU et al, 2015).

3.5 DERMATOFARMACOCINÉTICA

A dermatofarmacocinética (DPK) é um método de fácil execução e não invasivo para a avaliação da quantidade de fármaco presente no estrato córneo (EC) em função da aplicação e pós-remoção do produto testado empregando a técnica de *tape stripping* (N'DRI-STEMPFER et al., 2008). A técnica de *tape stripping* compreende assim, a remoção do EC com o uso sequencial de fitas adesivas (Figura 5) (PINKUS, 1951).

A DPK pode ser utilizada na obtenção de informações sobre a absorção e eliminação do fármaco fazendo uma abordagem comparável a farmacocinética de sangue, plasma e urina, porém aplicada a pele (USFDA, 1998). Considerando que o EC é principal barreira a entrada substâncias na pele, a biodisponibilidade tópica pode ser estimada através da concentração do fármaco nas fitas removidas e relacionada com a concentração no sítio alvo, ou seja epiderme viável ou derme (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008).

Figura 5 - Remoção do estrato córneo com uso de fita adesiva.



Fonte: Extraído de KANFER, 2010.

Em *estudos in vivo* é considerado que o emprego de cerca de 30 fitas seja suficiente para remoção do EC (PINKUS, 1951). A eficiência do *tape stripping* pode ser avaliada em função da hidratação da pele (FLUHR; FEINGOLD; ELIAS, 2006). Com a remoção das camadas córneas, a retenção de água na pele é diminuída. Dessa forma, a medida da perda de água transepidérmica (TEWL) é preditiva para assegurar a retirada total do EC (GAO et al., 2013; KLANG et al., 2013).

A avaliação de DPK também tem sido realizada *in vitro*, utilizando pele de porco (ARAUJO, 2016). No entanto, considerando que os mecanismos de eliminação da pele, nesse estado, não se encontram em pleno funcionamento e isto, somado principalmente a natureza lipofílica de alguns fármacos, como o econazol28, pode tornar mais difícil a análise de DPK no tempo de eliminação usualmente empregado *in vivo*.

Desta forma, através da avaliação comparativa entre *tape stripping in vitro* e *in vivo*, Saeheng e colaboradores (2012) verificaram que a pele de porco *in vitro* tem

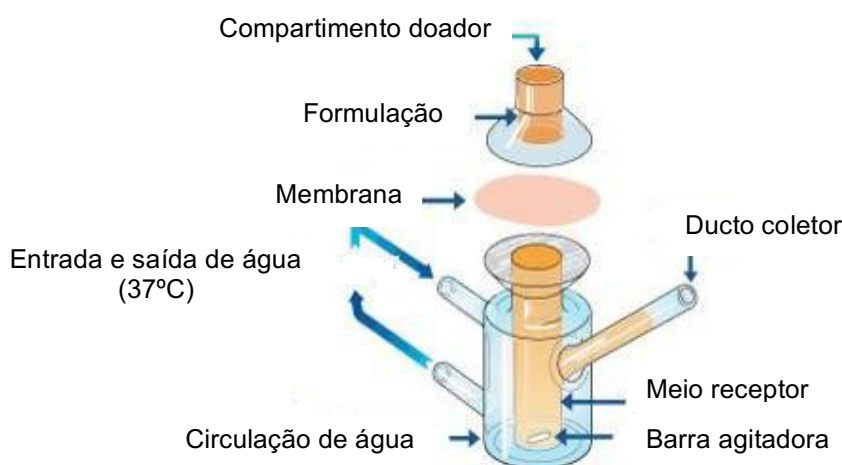
potencial para representar a pele humana em estudos in vivo da biodisponibilidade / bioequivalência tópica de creme de cloridrato de terbinafina 1% (SAEHENG et al., 2012). Resultado semelhante foi verificado por Klang et al (2012) na avaliação in vitro e in vivo por tape stripping nos mesmos modelos de pele (KLING et al., 2012).

A DPK in vivo realizada em voluntários humanos tem se mostrado uma alternativa aos testes clínicos (USFDA, 1998). O método é mais simples, rápido, de menor custo, realizado com um número menor de voluntários e na teoria pode ser aplicada a todos os fármacos de uso tópico (BRADDY et al., 2015).

Previamente aos estudos de biodisponibilidade, métodos para avaliação da performance da forma farmacêutica; como o estudo de liberação e permeação in vitro devem ser conduzidos. Tratam-se de procedimentos já normalmente utilizados na rotina de desenvolvimento e avaliação de medicamentos, pesticidas, cosméticos, entre outros.

Esses testes são, via de regra, realizados por meio de células de difusão vertical, conhecida como célula de Franz (Figura 6) e propõem a avaliação da cinética de liberação (membrana artificial) ou permeação (membrana biológica) de substâncias a partir de formulações, normalmente semi-sólidas.

Figura 6 - Representação esquemática da célula de difusão de Franz.



Fonte: Adaptado de SILVA, 2008.

Os testes de liberação, todavia, são inábeis para correlação com os resultados in vivo devido a impossibilidade da obtenção de dados sobre a interação entre a formulação e a pele, em particular, com o estrato córneo (ARAUJO, 2016). É

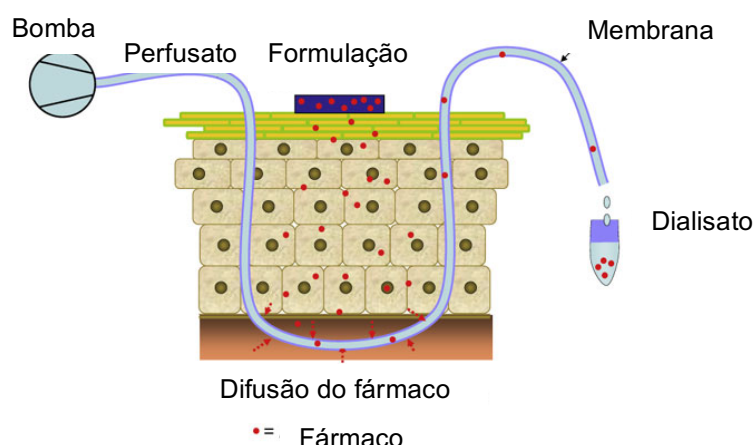
importante destacar que os testes de liberação têm por objetivo avaliar o desempenho da forma farmacêutica na entrega no fármaco e não de simular a permeação através da pele (SIEWERT et al, 2015).

3.6 MICRODIÁLISE CUTÂNEA

A microdiálise (MD) tem se apresentado com uma promissora técnica a avaliação de fármacos administrados topicamente. De um modo geral, a microdiálise é uma técnica *in vivo* de amostragem que visa em tempo real mensurar a concentração de fármacos livres e substâncias endógenas no espaço extracelular (ECF) no tecido alvo. Até então, a MD é a única técnica que promove a obtenção de dados farmacocinéticos em tempo real (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010).

O princípio da MD consiste na difusão passiva de substâncias direcionada por gradiente de concentração através de sonda com uma membrana semipermeável (HERKENNE et al., 2008a). Na microdiálise cutânea (DMD), a sonda é inserida na derme em posição paralela à superfície da pele com ou sem anestesia local com auxílio de uma cânula guia (SCHNETZ; FARTASCH, 2000). Durante a microdiálise, a sonda é perfundida por uma solução fisiológica que é equilibrada com o meio extracelular favorecendo a troca de substâncias através da membrana (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010).

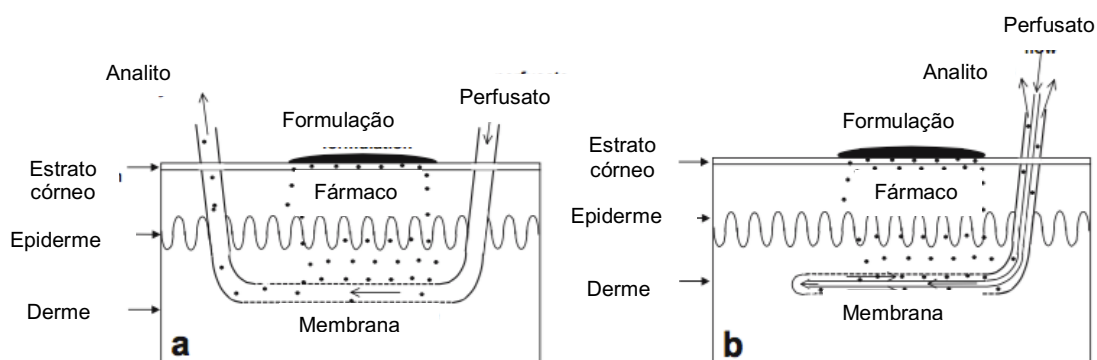
Figura 7 - Desenho esquemático do princípio da microdiálise cutânea.



Fonte: <http://www.skin-care-forum.basf.com/en/articles/skin/strategies-for-skin-penetration-enhancement/2004/08/12?id=5b9a9164-6148-4d66-bd84-6df76bd6d111&mode=Detail>

Os tipos de sonda mais comumente empregados na DMD são a linear e a concêntrica, com preferência a linear (Figura 8) (HERKENNE et al., 2008a). A sonda linear é mais flexível, tem fluxo unidirecional e *cut-off* 6 kDa. Por ser unidirecional, precisa penetrar na pele durante a inserção uma vez que tem uma entrada e uma saída no mesmo filamento. Já a sonda concêntrica tem formato de “Y” possuindo um circuito fechado, *cut-off* entre 20 a 100 kDa e é mais frequentemente aplicada no músculo, coração, pele e tecido adiposo (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010).

Figura 8 - Representação esquemática das sondas **a)** linear e **b)** concêntrica inseridas na pele.



Fonte: Extraída de HERKENNE et al., 2008.

As sondas de microdiálise além de uma ferramenta de amostragem, também podem ser empregadas para a administração de fármaco. A administração ocorre através da perfusão de compostos que ao chegarem a membrana são entregues (“lost”) no tecido alvo por difusão (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010).

Como técnica de amostragem in vivo, a DMD tem se mostrado bastante útil nas seguintes situações:

- Avaliação da concentração de fármaco livre na derme ou tecido subcutâneo após administração tópica do produto teste;
- Comparação entre produtos com o objetivo de avaliar a biodisponibilidade / bioequivalência;
- Avaliação da concentração de fármaco em determinada camada da pele tem ação terapêutica (HERKENNE et al., 2008a).

A otimização de um experimento de DMD depende da obtenção de uma recuperação reprodutível da amostra (dialisato) para uma estimativa confiável das concentrações teciduais. De uma forma geral, a recuperação do dialisato está relacionada a fatores técnicos e biológicos. Quanto aos fatores técnicos devem ser considerados: a seleção da sonda, a composição do líquido de perfusão (de acordo com a hidrofília ou lipofília do fármaco em estudo), o fluxo de perfusão e o intervalo de coleta das amostras, a estabilidade do analito, a temperatura e a esterilidade da sonda. No que concerne aos fatores biológicos, são criteriosos o trauma causado na inserção e as características do tecido, o efeito da anestesia e a profundidade de sonda no tecido (SCHNETZ; FARTASCH, 2000; SHUKLA et al., 2014).

Devido ao fluxo contínuo de perfusão, a concentração do fármaco na amostra de dialisato será menor do que a presente no tecido (ECF)(PLOCK; KLOFT, 2005). A recuperação que reflete a concentração do fármaco livre no tecido, denominada recuperação relativa (RR)(SCHNETZ; FARTASCH, 2000; SHUKLA et al., 2014). A RR pode ser obtida pela razão entre a concentração do fármaco no dialisato e a concentração no tecido (PLOCK; KLOFT, 2005).

Diferentes técnicas podem ser sugeridas para a determinação da recuperação in vivo, sendo a recuperação por perda ou retrodiálise a mais adequada e mais rápida (HERKENNE et al., 2008a).

Na retrodiálise, a sonda é perfundida com uma solução com concentração conhecida do fármaco que então é distribuída para o tecido (para fora da membrana), logo a proporção pode ser calculada através da equação 1 (PLOCK; KLOFT, 2005):

$$RR_{\text{invivo}} = \left[\frac{C_{\text{in}} - C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Onde: C_{in} é a concentração de fármaco no líquido de perfusão e C_{out} é a concentração de fármaco no dialisato.

De um modo geral, diante dos ajustes necessários a otimização do experimento, a microdiálise oferece vantagens para o estudo da farmacocinética cutânea, tais como:

- As concentrações do dialisato refletem as do fármaco no ECF;
- A amostra do dialisato é limpa sem necessidade de extração;

- Permite a obtenção de dados farmacocinéticos em tempo real;
- Pode ser realizada na pele íntegra ou lesionada e independe da via de permeação do fármaco (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010; SHUKLA et al., 2014).

Por outro lado, a técnica também apresenta as suas limitações: para a inserção da sonda na pele é preciso que o manipulador esteja adequadamente treinado; a recuperação é dependente do fluxo, a concentração recuperada do analito diminui com o aumento do fluxo e o contrário acontece. Ademais, fármacos lipossolúveis tem sido um desafio para a aplicação da técnica. Além disso, devido ao baixo volume das amostras é necessário o emprego de técnicas bastante sensíveis de quantificação (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010; SHUKLA et al., 2014).

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INSUMOS, REAGENTES E ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS

- Metronidazol base – Fagron do Brasil, SP, Brasil;
- Metronidazol substância química de referência lote: 16754 – INCQS – FIOCRUZ;
- Rozex® gel (metronidazol 0,75%) – Galderma do Brasil – Galderma, SP, Brasil;
- Rozagel® gel (metronidazol 0,75%) – Bailleul-Biorga – Galderma, França;
- Solução isotônica injetável de metronidazol 0,75% - B. Braun Medical, PA, EUA;
- Metronidazol-D4 (padrão interno) – Doação MED-UMR S 1070 Universidade de Poitiers – França;
- Poloxamer407 – Via Farma, SP, Brasil;
- Propilenoglicol – diferentes fornecedores;
- EDTA dissódico – Fagron do Brasil, SP, Brasil;
- Parabenos (metil e propil) – Fagron do Brasil, SP, Brasil;
- Fosfato de sódio monobásico – Fagron do Brasil, SP, Brasil;
- Acetonitrila – diferentes fornecedores;
- Ácido fórmico – Vetec Química, Sigma-Aldrich Brasil, SP, Brasil;
- Hidróxido de sódio –diferentes fornecedores;
- Solução de Ringer (Líquido de perfusão T1) – CMA microdialysis, Phymep, Paris, França;
- Solução Fisiológica de cloreto de sódio 0,9% - diferentes fornecedores;
- Isoflurano – Forene; Abbot, Rungis, França;
- Água purificada por destilação seguida de deionização - Milli-Q® Merck Millipore, Damstadt, Alemanha;
- Fita adesiva 3M Book tape 845 Scotch – 3M Scotch, St. Paul, EUA;
- Cola cirúrgica Surgibond - SMI AG, St. Vith, Bélgica;
- Filme curativo transparente 3M Tegaderm Film – 3M, St. Paul, EUA;
- Fita médica hipoalergênica transparente 3M Transpore Surgical Tape – 3M, Breslávia, Polônia;
- Sonda de microdiálise CMA 20 – CMA microdialysis, Phymep, Paris, França;
- Cânula-guia para sonda de microdiálise CMA 20 Split Tubing –CMA microdialysis, Phymep, Paris, França.

4.2 EQUIPAMENTOS E SOFTWARES

- Aparador de pelo elétrico Chromini Cordless Clipper - Phymep, Paris, França;
- Banho Dubnoff microprocessado Q226M2 – Quimis, Diadema, Brasil;
- Bomba de perfusão CMA 100 microdialysis pump – CMA microdialysis Phymep, Paris, França;
- Coluna cromatográfica C18 Xbridge™ BEH300 5 µm, 150 x 2.1mm ID - Waters, St-Quentin en Yvelines, França;
- Coluna cromatográfica de fase reversa C18 5 µm, 150 x 4.60 mm ID - Shimadzu®, Kyoto, Japão;
- Chapa magnética com aquecimento – Fisaton, SP, Brasil;
- Calorímetro Diferencial DSC-60 com software TA-60WS - Shimadzu®, Kyoto, Japão;
- Coletor de amostras automático Univentor 820 - Univentor, Zejtun, Malta;
- Difrator de raios-x modelo D5000 - Siemens®, Berlin, Alemanha;
- Espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier IFS66 - Bruker®, Ettlingen, Alemanha;
- Evaporímetro Tewameter® TM 300 - Courage-Khazaka, Cologne, Alemanha;
- Freezer e Refrigerador – diversos;
- Fusiômetro 430D – Fisaton, SP, Brasil;
- Microscópio eletrônico de varredura SS-550 - Shimadzu®, Kyoto, Japão;
- pHmetro digital modelo pH 21- Hanna Instruments, Ilha de Rodes, EUA;
- Viscosímetro RI:2:M-H - Rheology International Shannon, Shannon, Irlanda;
- Reômetro rotacional com cilindros concêntricos - Anton Paar MCR 500, Graz, Austria;
- Sistema de anestesia gasosa Anesthesia Unity, Univentor 400 – Univentor, Phymep, Paris, França;
- Sistema automatizado para teste de difusão com células de Franz Vision® Microette™ - Hanson, EUA;
- Tapete acoplado com sonda para manutenção da temperatura corporal CMA 450 Temperature Controller - Phymep, Paris, França;
- Termômetro de mercúrio graduado;
- Pré-coluna Gemini® C18 5 µm, 4 x 3 mm ID - Phenomenex, Torrance, EUA;

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta – Shimadzu®, Kyoto, Japão;
- Sistema de cromatografia líquida acoplado a espectrômetro de massas CL-EM/EM SCIEX API 3000 – Applied Biosystems, Foster, Califórnia, EUA;
- Termobalança DTG-60H - Shimadzu®, Kyoto, Japão;
- Rheoplus® v. 3.40 - Anton Paar, Graz, Austria;
- Office Excel® (diferentes versões) - Microsoft, Novo México, EUA;
- GraphPad Prism® 5.0 - GraphPad Software, Califórnia, EUA;

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO METRONIDAZOL (IFA)

O IFA metronidazol foi adquirido através de doação do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE, lote: 16754. O padrão substância química de referência do MTZ foi obtido do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz (INCQS – FIOCRUZ), Lote: W2F01, teor 99.6%. Todos os solventes e reagentes utilizados nos ensaios foram de grau analítico. A caracterização do MTZ IFA foi realizada utilizando os métodos físicos, químicos e térmicos abaixo descritos:

4.3.1 Descrição do ifa e microscopia eletrônica de varredura

Para descrição do IFA a olho nu, uma quantidade suficiente do pó foi colocada sobre placa de Petri e foram observados o aspecto, a cor e odor. Para realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram inicialmente recobertas com ouro (25 nm) durante 2,5 minutos. Em seguida, fotomicrografias foram obtidas por MEV operado com voltagem 15 KV, distância de trabalho de 16 mm e magnificação de 40, 120 e 200 vezes (USP, 2007).

4.3.2 Faixa de fusão

A faixa de fusão foi observada em equipamento Fusiômetro seguindo o método geral da F. BRAS (2010) e através de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC, do inglês Differential Scanning Calorimetry).

4.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia na região do infravermelho do MTZ, IFA e SQR, foi realizada utilizando pastilha de KBr e o espectro traçado na faixa de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} (LEITE et al, 2007).

4.3.4 Teor por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV)

Para avaliação do teor, diluições a partir de uma solução mãe 100 μg / mL em solução ACN/ H_2O (1:1) foram analisadas utilizando uma curva de calibração com concentrações 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 μg mL⁻¹. As amostras em triplicatas foram quantificadas por CLAE-UV através de método desenvolvido e validado pelo NUDFAC – UFPE (dados não publicados).

4.3.5 Perfil difratométrico

Os difratogramas de raios X foram obtidos através difratômetro operando com corrente de 40 mA, sob tensão de 40 kV, com intervalo de análise entre 5° a 50° (2 θ), com 0,05 ° por passo e um tempo de 5 segundos por passo (CARINI, 2009).

4.3.6 Distribuição granulométrica por difração a laser

A granulometria dos cristais de MTZ foi verificada por difração a laser em via úmida. Acetona foi utilizada como agente dispersante.

4.3.7 Caracterização térmica

A caracterização térmica do MTZ foi realizada através de técnicas de termogravimétrica (TG) e DSC.

A análise de TG utilizando ~ 5 mg da amostra, acondicionadas em célula de platina fechada, numa atmosfera com fluxo de nitrogênio a 50 mL / min. A faixa de temperatura foi de 30 a 600 °C com razão de aquecimento de 10°C / min. Antes do ensaio, o equipamento foi calibrado oxalato de cálcio monohidratado (AULTON, 2005). A análise de DSC foi efetuada em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL

/ min sendo a massa da amostra ~ 2 mg acondicionadas em célula de alumínio na faixa de temperatura de 25 °C a 400 °C, numa razão de aquecimento de 10 °C / min. Índio foi utilizado para calibração (OLIVEIRA, YOSHIDA, GOMES, 2011).

4.4 DELINEAMENTO DOS GÉIS TERMOREVERSÍVEIS DE METRONIDAZOL 0,75%

4.4.1 Preparação dos géis termoreversíveis

As formulações termoreversíveis foram preparadas utilizando Poloxamer® como polímero termoreversível. O método de preparação empregado foi a de técnica de solubilização do polímero a frio (*“cold method”*) descrita por (SCHMOLKA, 1972). Foram preparadas duas formulações gelificadas termoreversíveis contendo metronidazol (0,75%) e denominadas F11 e F12, cuja composição está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição e percentuais dos termogéis de metronidazol 0,75%.

Composição/Formulações	F11	F12
Metronidazol	0,75%	0,75%
Poloxamer 407	15%	15%
Propilenoglicol	10%	-
EDTA	0.1%	0.1%
Metilparabeno	0.1%	0.1%
Propilparabeno	0.05%	0.05%
Água purificada qsp	100 g	100 g

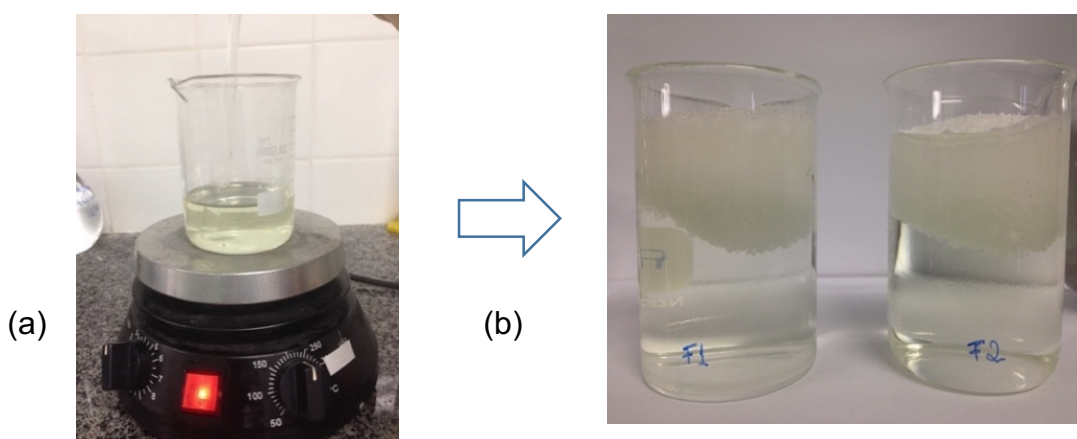
Fonte: dados da pesquisa

Os termogéis foram preparados usando como polímero o Poloxamer 407 (P-407). A diferença entre as formulações está na presença do agente solubilizante do metronidazol propilenoglicol no termogel F11 e a sua ausência na formulação F12.

Para obtenção das preparações, fármaco, conservantes e estabilizante foram dissolvidos em água purificada aquecida a 70 °C sobre agitação magnética (Figura 9a). Após dissolução e arrefecimento, o polímero foi adicionado e a preparação submetida a resfriamento (4 °C) até solubilização do P-407, aproximadamente 24 h (Figura 9b). Após esse período foi possível obter formulações límpidas e transparentes. As soluções foram acondicionadas em frascos de vidro e mantidas a temperatura ambiente (~25 °C).

Para a formulação F11, o propilenoglicol foi adicionado à solução durante a etapa de solubilização do fármaco.

Figura 9 - Preparação dos termogéis de MTZ. a) solubilização do fármaco; b) adição do P-407.



Fonte: arquivo pessoal

Após 24 h e à temperatura ambiente, as preparações foram visualmente avaliadas quanto aos parâmetros de aspecto, cor e homogeneidade. Essas observações foram feitas com as soluções contidas em béquer de vidro transparente.

4.4.2 Estudo de solubilidade

A solubilidade do MTZ foi verificada em diferentes solventes e sistemas: água, PG, poloxamer 407 (P407) gel, PG/água (1:10, v/v) e PG/P407 gel (1;10, v/v).

Um excesso de fármaco foi adicionado a frascos de vidro âmbar com capacidade para 20 mL. Em seguida, foram acrescentados 5 mL de cada meio e as suspensões foram então colocadas em agitação constante em banho termostaticado

a 36 °C durante 72 h. Após este período, as soluções sobrenadantes foram centrifugadas a 605 x g por 30 min. Por fim, as soluções foram filtradas e a concentração determinada por CLAE-UV. A solubilidade para cada meio foi avaliada em triplicata. Os resultados foram expressos em média ($\pm$ DP) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA).

4.4.3 Determinação do pH

O pH das preparações foi verificado utilizando um pHmetro digital previamente calibrado com soluções tampão fosfato pH 4,0 e 7,0 a temperatura de 25 °C. O pH foi medido em triplicata para cada formulação e os resultados apresentados por média ($\pm$ DP).

4.4.4 Avaliação viscosimétrica

A avaliação da viscosidade e comportamento reológico foi feita por meio do viscosímetro RI:2:M-H. A viscosidade aparente de cada formulação (15 g) foi avaliada 37 °C ($\pm$ 1) a uma rotação de 100 RPM e taxa de cisalhamento de 20 s⁻¹ e os resultados apresentados em valores da média e desvio padrão.

Medidas de viscosidade dinâmica e curvas de fluxo (ascendentes e descendentes) foram obtidas a mesma temperatura com velocidades de rotação entre 10 e 100 RPM e taxa de cisalhamento entre 2 e 20 s⁻¹. O mesmo ensaio foi feito com a formulação referência a fim de comparação dos dados entre as três formulações. As análises foram realizadas em triplicatas.

4.4.5 Determinação da temperatura de transição sol-gel

A temperatura de transição sol-gel (Ts-g) foi determinada através de análise em reômetro rotacional com cilindros concêntricos usando o software Rheoplus® para coleta de dados.

Durante o ensaio, a temperatura dos termogéis foi aumentada de 20 °C para 45 °C a uma razão de aquecimento de 01 °C / min e os dados de módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') foram obtidos.

O gráfico G' e G'' versus a temperatura foi plotado e a temperatura de transição foi definida como a interseção dos pontos de G' e G'' sobre a curva.

4.4.5.1 Técnica do tubo

Outro modo utilizado para determinação da temperatura de transição sol-gel foi o método visual por meio de tubo de ensaio.

Aproximadamente 01 g de cada formulação foi colocado individualmente em um tubo de ensaio e este submetido a banho-maria sobre chapa de aquecimento, inicialmente a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Simultaneamente, outro tubo de ensaio contendo 01 mL de água, e neste inserido um termômetro, foi também colocado no banho-maria.

A temperatura do banho foi gradativamente aumentada e a cada variação de 01°C o tubo contendo a formulação foi inclinado a um ângulo de 90° . A temperatura de formação do gel (t_1) foi registrada quando a solução parou de fluir após a inclinação do tubo.

Posteriormente, o aquecimento do banho foi suspenso e registrada a temperatura na qual o gel tornava-se fluido novamente (t_2). A temperatura de transição sol-gel foi calculada através da média aritmética entre t_1 e $t_2 \pm \text{D.P}$ (UR-REHMAN; TAVELIN; GRÖBNER, 2011).

4.5 BIODISPONIBILIDADE CUTÂNEA: DPK IN VITRO E MICRODIÁLISE IN VIVO

A biodisponibilidade do MTZ a partir das formulações termoreversíveis e do medicamento de referência Rozex® foi avaliada por meio de métodos in vitro e in vivo, utilizando pele de rato como membrana modelo.

Para a avaliação do DPK e permeação in vitro, foram empregadas células de difusão de Franz. A quantidade de fármaco retida no estrato córneo (EC) foi avaliada através de dermatofarmacocinética (DPK) (ARAUJO, 2016). A presença do MTZ na pele remanescente, epiderme viável e derme, também foi avaliada, sendo possível determinar a quantidade do MTZ em diferentes camadas da pele.

Em ambos os estudos *in vitro* e *in vivo*, a passagem do MTZ foi avaliada na pele de rato em estado íntegra e lesionada. Neste trabalho, para indução da lesão foi empregada a técnica de *tape stripping*.

4.5.1 *Tape stripping*

A técnica de *tape stripping* consiste na remoção do EC da epiderme com o emprego de fitas adesivas.

Esse procedimento foi utilizado em duas condições diferentes neste estudo:

- 1) A primeira foi visando reproduzir o modelo de lesão *in vitro* e *in vivo*. Para lesão *in vitro*, a técnica foi aplicada após a dissecação da pele do animal e antes do posicionamento sobre as células de Franz e deposição do gel. Para lesão *in vivo*, o mesmo procedimento foi realizado no animal, após retirada o pelo.
- 2) Na segunda condição o *tape stripping* foi empregado na avaliação da dermatofarmacocinética *in vitro*, em pele íntegra, após os experimentos em células de Franz para obtenção da quantidade de fármaco retida no EC.

Tanto no estudo *in vitro* quanto *in vivo*, um total de 30 fitas adesivas tipo “book tape” foram cortados e um por um, e pressionados sobre a pele do animal e em seguida removidos (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008).

4.5.2 Obtenção e preparação da pele

Neste estudo foram utilizadas peles de ratos machos Wistar (n = 6), pesando entre 300 – 400 g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. Para a realização do experimento, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE sob o Processo n. 23076.050654/2015-91.

Para a obtenção da pele, o rato foi colocado em uma câmara de indução de anestesia alimentada com uma mistura de ar-isoflurano (5%) a um fluxo de 500 mL / min para indução a sonolência seguida de eutanásia do animal.

Após a morte do animal, foi efetuada a raspagem do pelo através aparador de pelo elétrico. Em seguida, a pele do dorso e ventre do animal foi removida por meio do uso de pinça e tesoura cirúrgica. O tecido adiposo foi retirado com auxílio de bisturi e então, a pele foi lavada com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (Figura 10).

Figura 10 - Pele de rato após dissecação.



Fonte: arquivo pessoal.

Posteriormente, a pele foi recortada com tamanho superior ao diâmetro do compartimento doador das células de difusão de Franz (1,77 cm²) e as unidades obtidas foram embaladas em películas de Parafilm M® e armazenadas a temperatura -20 °C até uso sequencial no experimento (Figura 11). Para o modelo de pele lesionada, empregou-se a técnica de *tape stripping* conforme descrito anteriormente.

Figura 11- Corte da pele para uso nas células de difusão.



Fonte: arquivo pessoal

4.5.3 Perda de água transepidérmica

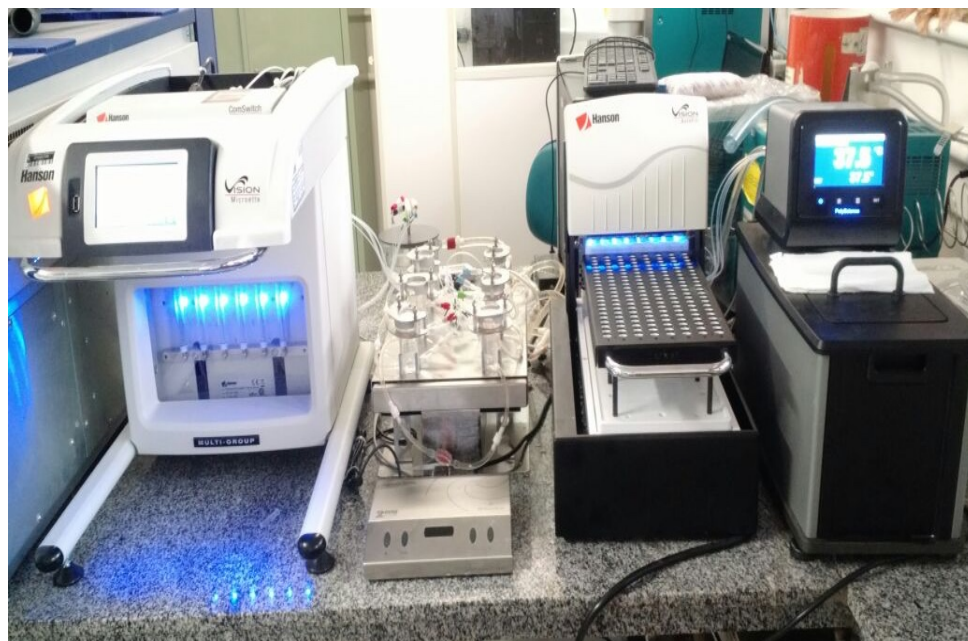
A medida da perda de água transepidérmica (TEWL) foi utilizada como parâmetro para avaliação da integridade da pele e eficiência da lesão no estudo de permeação *in vitro* após *otape stripping*.

A TEWL foi mensurada por evaporimetria por meio de *tewâmetro*. Após o procedimento de *tape stripping*, o sensor do aparelho foi colocado em contato com a pele animal e os dados de TEWL apresentados no monitor do aparelho em unidades de g/h/m². As medidas foram realizadas com cinco replicatas e a lesão da pele assumida quando os valores obtidos foram superiores a 40 g/h/m² (OSTROWSKI et al., 2014).

4.5.4 Permeação cutânea *in vitro*

Cerca de trinta minutos antes do início do experimento, a pele animal foi retirada do freezer e mantida a temperatura ambiente até montagem das células de difusão. Este estudo foi realizado em equipamento para teste de difusão automatizado. O sistema automatizado é composto de um banho de circulação de água com temperatura programável, seis células verticais de difusão tipo Franz sobrepostas sobre uma placa magnética agitadora, um coletor de amostras automático e o software Vision® Microette™ para programação do aparelho (Figura 12).

Figura 12 - Sistema automatizado de células de Franz Vision® Microette™.



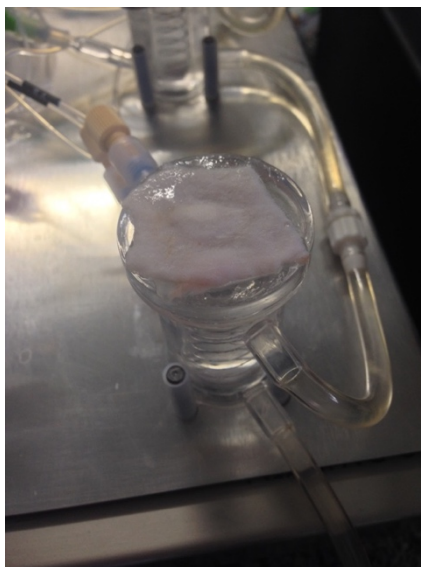
Fonte: arquivo pessoal

Antes do início do experimento, o compartimento receptor da célula de Franz foi preenchido com solução tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4.

Em seguida, sobre esse compartimento, as frações de pele ($n = 6$) foram sobrepostas com a epiderme voltada para compartimento doador e a derme em contato com o líquido receptor (Figura 13).

Sobre a pele e dentro de um anel demarcador do compartimento doador de diâmetro mencionado, foi aplicada cerca de 166 mg da formulação a ser testada (F11, F12 ou Rozex®) correspondente 0,70 mg/cm² de MTZ. Em seguida, o compartimento foi ocluído com tampa de acrílico e garra de segurança.

Figura 13 - Corte de pele sobre compartimento receptor.



Fonte: arquivo pessoal.

Durante todo o período de experimento o líquido receptor foi mantido em agitação magnética de 300 rpm e a temperatura a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por meio do banho termostatzado de circulação.

Em intervalos de 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18 e 21 h, uma alíquota de 01 mL do meio receptor foi coletada e o mesmo volume automaticamente repostado com o líquido receptor para manutenção constante do volume. O ensaio foi realizado em sextuplicatas para cada formulação e para ambos modelos de pele.

As amostras coletadas foram filtradas com membranas de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e analisadas ao fim do experimento por CL/EM-EM. Este método está descrito posteriormente sendo o mesmo a ser utilizado para quantificação do MTZ nas amostras de microdiálise in vivo.

A quantidade de MTZ acumulada no líquido receptor durante as 21 h foi calculada considerando: o volume total da célula (6 mL), o volume coletado a cada intervalo (01 mL), a quantidade de fármaco retirada a cada coleta e a área de depósito da formulação ($1,77\text{ cm}^2$) no compartimento doador (equação 2).

$$Q_{\text{real},t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad (2)$$

Onde:

$Q_{\text{real}, t}$ = quantidade real permeada referente ao tempo t ;

C_t = concentração obtida referente ao tempo t ;

V_r = volume da solução receptora

C_c = concentração da amostragem anterior

V_c = volume coletado

Um gráfico da quantidade permeada versus tempo foi plotado e o J calculado no estado de equilíbrio (*steady-state*) a partir do coeficiente angular da porção linear da equação da reta conforme dados da literatura (OZGUNEY et al, 2006; PANIGRAHI; PATTNAIK & GHOSAL, 2005). O coeficiente de permeabilidade (K_p) foi calculado a partir da relação do fluxo (J) com a concentração de MTZ aplicado sobre a pele (C_{doador}) conforme equação 3 (OZGUNEY et al., 2006):

$$K_p = \frac{J}{C_{\text{doador}}} \quad (3)$$

4.5.5 Dermatofarmacocinética *in vitro*

Ao fim do ensaio de permeação *in vitro*, para a pele íntegra remanescente foi realizado o experimento de DPK através da técnica de *tape stripping* descrita anteriormente.

Para tanto, a formulação restante sobre a pele foi removida com swab de álcool isopropílico, posicionada sobre uma superfície de isopor e em seguida aplicado procedimento de *tape stripping*.

Posteriormente, as fitas foram colocadas individualmente em tubos eppendorf (2 mL, 30 unidades) e adicionado 01 mL de acetronitrila como solvente extrator. Os tubos foram submetidos a banho termostatzado sobre agitação a temperatura de 36°C durante seis horas. Após este período, foi acrescentado a cada tubo 01 mL de água purificada, as fitas foram retiradas, as soluções filtradas (45 µm) e quantificadas por CLAE-UV.

A pele restante, compreendendo a epiderme viável e a derme (EP/D), foi cortada e os fragmentos colocados também em tubos eppendorf (2mL) contendo o mesmo solvente extrator e a mesma metodologia de extração acima citada foi aplicada.

4.5.6 Microdiálise *in vivo*

4.5.6.1 Animais

Este estudo foi realizado com 33 ratos machos da espécie *Sprague-Dawley* oriundos do biotério Janvier Labs (Le Genest-St-Isle, França), pesando entre 280 – 402 g e aclimatizados em gaiolas individuais com ciclos de 12 h claro-escuro e livre acesso a água e ração (4RF21 Mucedola, Flash Aptitude, Gif-sur-Yvette, França). Os animais foram assim mantidos por no mínimo um dia antes do início da microdiálise.

Os experimentos foram feitos com a administração por via tópica dos termogéis e o medicamento de referência a uma dose de 3,75 mg do fármaco (500 mg de formulação). Do mesmo modo que os estudos *in vitro*, duas condições de pele foram avaliadas: pele íntegra e pele lesionada. Os experimentos foram divididos em 6 grupos segundo a formulação teste e o modelo de pele:

- Grupo F11: Termogel F11 / pele íntegra (n = 8);
- Grupo F11TS: Termogel F11 / pele após tape stripping (n = 5);
- Grupo F12: Termogel F11 / pele íntegra (n = 7);
- Grupo F12TS: Termogel F12 / pele após tape stripping (n = 4);
- Grupo RZ: medicamento referência / pele íntegra (n = 6);
- Grupo RZTS: medicamento referência / pele após tape stripping (n = 3).

O estudo foi conduzido no Laboratório de Farmacologia de Anti-infecciosos MED-UMR S 1070 da Universidade de Poitiers, França, e em concordância com o Conselho Nacional de Pesquisa, Guia para Cuidados e Uso de Animais em Laboratório (National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) protocolo 86.051, França.

4.5.6.2 Implantação do cateter arterial femoral

Um dia antes do experimento de microdiálise e após remoção do pelo por raspagem, os animais foram submetidos a uma cirurgia para implantação do cateter arterial femoral e inserção da sonda na pele.

Foi utilizado um pequeno cateter com dimensões interna 0,28 mm e externa 0,61 mm conectado a um cateter de maior diâmetro (interno 0,58 mm e externo 0,96 mm) para inserção na artéria femoral esquerda do animal. O cateter arterial foi empregado para coleta sanguínea em intervalos de tempo pré-estabelecidas (0; 2; 4h após administração do fármaco).

Para inserção do cateter, primeiramente, os ratos foram anestesiados por inalação gasosa de isoflurano. Os animais foram colocados em uma câmara fechada com fluxo 500 mL / min de uma mistura de ar-isoflurano (3,8%).

Após adormecerem, os ratos foram transferidos para um tapete de aquecimento e inserida uma sonda retal para manutenção da temperatura corporal. Ao focinho dos ratos foi colocada uma máscara com mistura ar-isoflurano (1,8 – 2,0%) e mantida durante todo o período de implante do cateter e colocação do anel de depósito do gel sobre a pele.

Ao término da cirurgia, os ratos foram colocados em suas gaiolas e sob luz de aquecimento até sinais dos primeiros movimentos. Água e comida foram fornecidas livremente até o experimento.

Ao fim do experimento, o animal foi eutanasiado com a administração intraperitoneal de pentobarbital ou por exsanguinação através de punção cardíaca após anestesia por inalação gasosa de uma mistura de ar-isoflurano (3,8%).

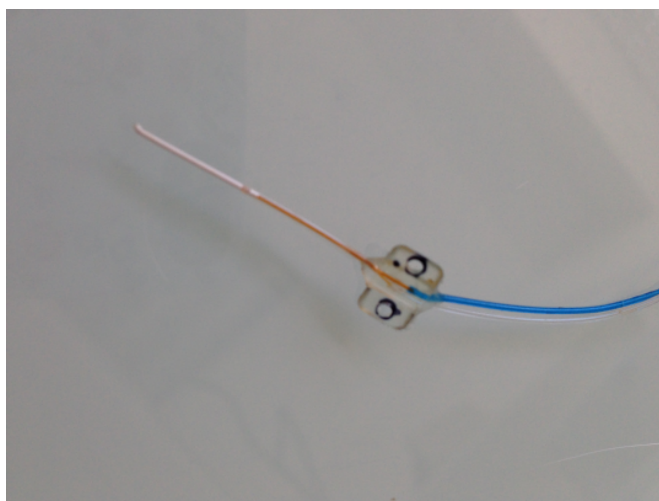
Em seguida, com auxílio de tesoura cirúrgica e pinça, a pele do animal foi separada do músculo para visualização da posição da sonda no interior da pele. Em seguida, a sonda foi retirada e lavada por perfusão de água deionizada por um período mínimo de 3 h.

Após a eutanásia, a carcaça do animal foi colocada uma embalagem plástica e congelada a - 20°C até destino correto pelo órgão responsável.

4.5.6.3 Implantação da sonda de microdiálise e anel-depósito na pele

Após a implantação do cateter arterial, a sonda de microdiálise concêntrica CMA/20 foi inserida horizontalmente na pele do lado direito da região dorsal do animal com o auxílio de uma cânula guia que foi removida após o procedimento (Figura 14).

Figura 14- Sonda de microdiálise CMA/20.

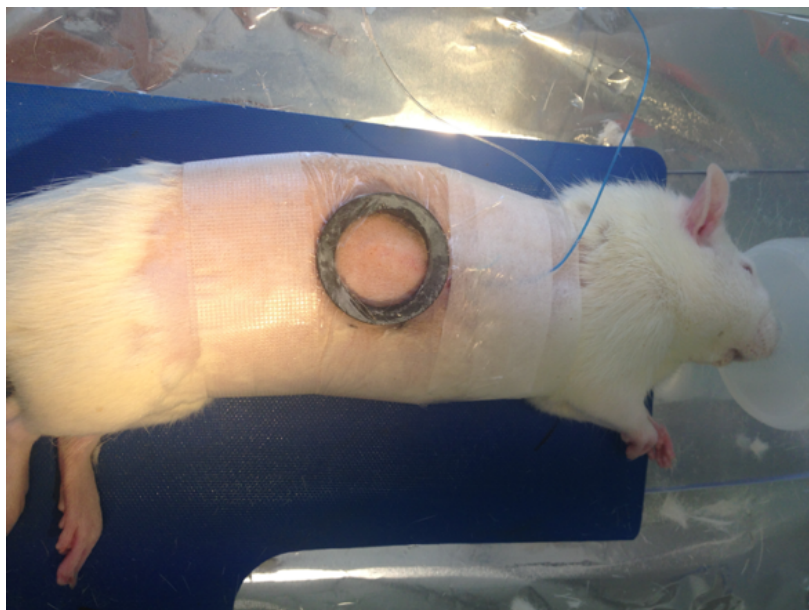


Fonte: arquivo pessoal

Durante a cirurgia, a sonda foi perfundida com solução de Ringer através de uma bomba de perfusão a um fluxo de 2,0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Após a fixação da sonda, o fluxo foi aumentado para 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 10 min para remoção de ocasionais bolhas de ar e, em seguida, diminuído e mantido o valor de fluxo inicial até o fim da cirurgia.

O próximo passo consistiu na colocação do anel para depósito do gel teste sobre a pele. Um anel de borracha foi colado com cola de uso veterinário acima da sonda de microdiálise para delimitação da área de depósito. Posteriormente, a região envolvida com um filme curativo transparente para evitar deslocamento do anel e então, a região foi coberta com fita médica hipoalergênica transparente até o momento de administração do gel (Figura 15).

Figura 15 - Fixação do anel-depósito do gel.



Fonte: arquivo pessoal

4.5.6.4 Procedimento de microdiálise cutânea

Um dia após a cirurgia, o rato foi colocado dentro de um *bowl* conectado a um braço mecânico e preso a um colar que permitia a livre movimentação e acesso a comida e água (Figura 16). A extremidade de entrada da sonda foi conectada a bomba de perfusão e a extremidade de saída conectada a um coletor automático.

Em seguida, foi iniciado a etapa de equilíbrio da sonda com o tecido cutâneo. Uma solução de Ringer contendo metronidazol (50 ng / mL) foi perfundida a um fluxo de 2,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 15 min e então, o fluxo foi reduzido para 0,7 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 45 min. Este fluxo foi mantido durante todo o experimento.

Figura 16 - Montagem do experimento de microdiálise.



Fonte: arquivo pessoal

Após o período de equilíbrio, três amostras do dialisato (Cout) foram coletadas a cada 30 min durante 90 min para a avaliação da recuperação da sonda por retrodiálise (RR). A solução de MTZ 50 ng / mL (Cin) e os dialisatos foram congelados a -20 °C e para análise posterior por CL-EM/EM.

A RR in vivo por perda foi expressa como porcentagem e calculada de acordo com a equação 1.

$$RR_{in vivo} = \left[\frac{C_{in} - C_{out}}{C_{in}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Onde: *Cin* é a concentração de fármaco no líquido de perfusão e Cout é a concentração de fármaco no dialisato.

A média dos valores ($\pm$ DP) de RR in vivo foi obtida a partir de três determinações individuais e foram usadas para a correção das concentrações do microdialisatos.

Ao final da etapa de recuperação, a sonda foi perfundida com uma solução de Ringer para lavagem com um fluxo de 2,0 μ L/min durante 30 min e, e, seguida a 0,7 μ L/min por mais 30 min antes da administração do metronidazol tópico.

Para a administração da formulação, o rato e a sonda foram desconectados do sistema e o animal anestesiado com isoflurano conforme descrito anteriormente. Em seguida, 500 mg do gel teste foi aplicado no anel-depósito sobreposto a sonda. Posteriormente, a área foi coberta com um filme curativo transparente e o animal reposto no bowl, reconectado ao colar e a sonda à bomba de perfusão e ao coletor automático.

Após 24 min, tempo calculado para que o líquido percorresse a tubulação entre a sonda e coletor automático, as coletas do dialisato foram iniciadas e efetuadas a cada 01 hora durante 21 horas, correspondendo a um volume de 42 µL cada.

Ao final, as amostras foram congeladas a – 20 °C para posterior quantificação por LC-MS/MS.

4.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS POR CL-EM/EM

A determinação do MTZ nas amostras do dialisato in vivo foi feita através de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM/EM). O método foi desenvolvido e validado de acordo com as normas da FDA pelo Laboratório de Farmacologia de Anti-infecciosos MED-UMR S 1070 da Universidade de Poitiers, França.

Para a cromatografia de fase reversa foi empregada uma coluna C18 (5 µm, 150x2.1mm ID). Como fase móvel foi utilizada uma mistura de acetonitrila / água / ácido fórmico (25: 75: 0,1 v/v) a um fluxo de 0,16 mL / min.

O sistema de cromatografia líquida foi conectado a espectrômetro de massas SCIEX API 3000 operado em modo turbo íon spray positivo. Os íons foram monitorados em modo de reações múltiplas (MRM) para detecção do MTZ m/z 172.1 (íon precursor: [M+H]⁺) e m/z 128 (ou 82) (produto) e m/z 176.1 (íon precursor: [M+H]⁺) e m/z 128 (ou 82) (produto) para MTZ D4 (padrão interno).

Um volume de 5 µL de amostras de dialisato, curva padrão e controles foram diluídos em 45 µL de padrão interno (0,05 ng / µL MTZ D4 em solução aquosa de formiato de amônio 10 mM) e 20 µL da mistura foi injetada no equipamento.

As amostras coletadas de líquido receptor também foram submetidas ao mesmo tratamento, porém se verificou a necessidade de diluição prévia antes da incorporação do padrão interno.

Essas diluições foram feitas em solução tampão fosfato de sódio monobásico 10 mM pH 7,4 na razão de 1: 100 (v/v) para as amostras oriundas da permeação através da pele íntegra e 1: 200 (v/v) para as amostras provenientes do estudo com a pele lesionada.

A curva de calibração foi preparada em solução de Ringer numa faixa linear com oito pontos de concentrações entre 5 e 250 ng / mL para as amostras de dialisato e entre 10 e 500 ng / mL para as amostras de líquido receptor.

A variabilidade intra e interdia foi caracterizada a 5; 10; 50 e 250 ng / mL com coeficientes de variação (CV%) e vieses (%) sempre menores que 15%. A variabilidade interdia foi caracterizada a 10; 50 e 175 ng / mL com CV% e vieses também sempre menores que 15%.

4.7 ANÁLISE DE AMOSTRAS POR CLAE-UV

As amostras provenientes do estudo de solubilidade do fármaco e as amostras de DPK e retenção EP/D foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (320 nm).

Para essas análises foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (5 µm, 150 x 4.60 mm ID) e pré-coluna C18 5 µm, 4 x 3 mm ID, 35 °C. A fase móvel consistiu de uma mistura binária de acetonitrila / tampão fosfato de sódio monobásico 20 mM pH 3,0 (12 : 88, v/v) a uma taxa de fluxo de 1,0 mL / min e volume de injeção de 20 µL.

A curva de calibração foi preparada em solução acetonitrila / água (50 : 50, v/v) numa faixa linear com sete pontos de concentrações entre 0,1 e 20 µg / mL. O procedimento foi previamente validado e descrito por Melo e colaboradores (2016).

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO METRONIDAZOL (IFA)

5.1.1 Descrição do ifa e microscopia eletrônica de varredura

O metronidazol, observado a olho nu, apresenta-se como um pó branco ou quase branco com aspecto cristalino (Figura 17). Essas características estão de acordo com as descritas na monografia do fármaco na Farmacopeia Brasileira, 2010 (F. BRAS, 2010).

Figura 17 - Fotomicrografia do MTZ insumo farmacêutico ativo

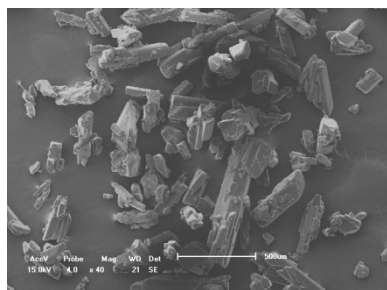


Fonte: arquivo pessoal

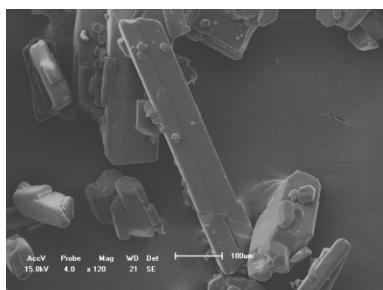
A microscopia eletrônica de varredura é uma importante ferramenta para caracterização de fármacos, pois através dela pode-se observar o hábito cristalino de um composto e o tamanho do cristal (AGUIAR, 2009; BRITAIN, 1999).

A Figura 18 mostra as imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura, sendo observado o comportamento cristalino das partículas, corroborando com o resultado do difratograma apresentado na técnica de difração de raios X. Também pôde ser verificado claramente que esses cristais apresentam hábito cristalino colunar (stick-shaped).

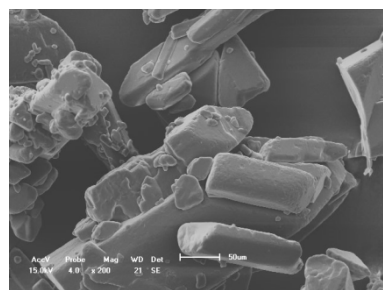
Figura 18 - Morfologia dos Cristais de metronidazol nas magnificações: (a) 40x, (b) 120x e (c) 200x, respectivamente.



(a)



(b)



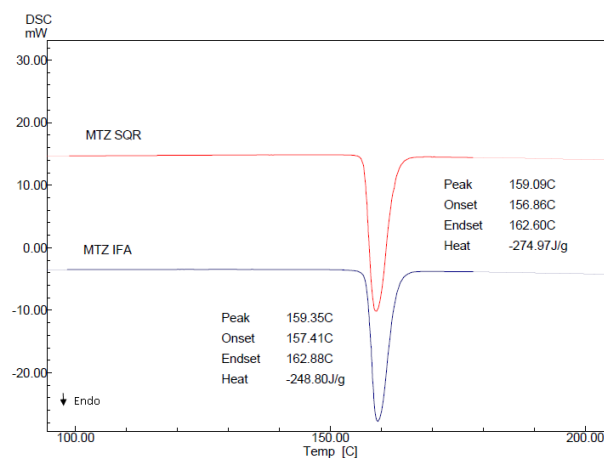
(c)

Fonte: arquivo pessoal

5.1.2 Faixa de fusão

A faixa de fusão observada, empregando o método geral da F. BRAS, 2010 encontra-se entre 160 e 162 °C estando de acordo com a F. BRAS, 2010. Os resultados das análises de DSC do IFA e SQR compreendem uma faixa de Tonset de 157,41 °C a Tendset de 162,88 °C com pico em 159,35 °C e Tonset de 154,86 °C a Tendsetde 162,60 °C com pico em 159,09 °C, respectivamente (Figura 19).

Figura 19 - Calorimetria diferencial exploratória do MTZ IFA e substância química de referência entre 100 e 200 °C

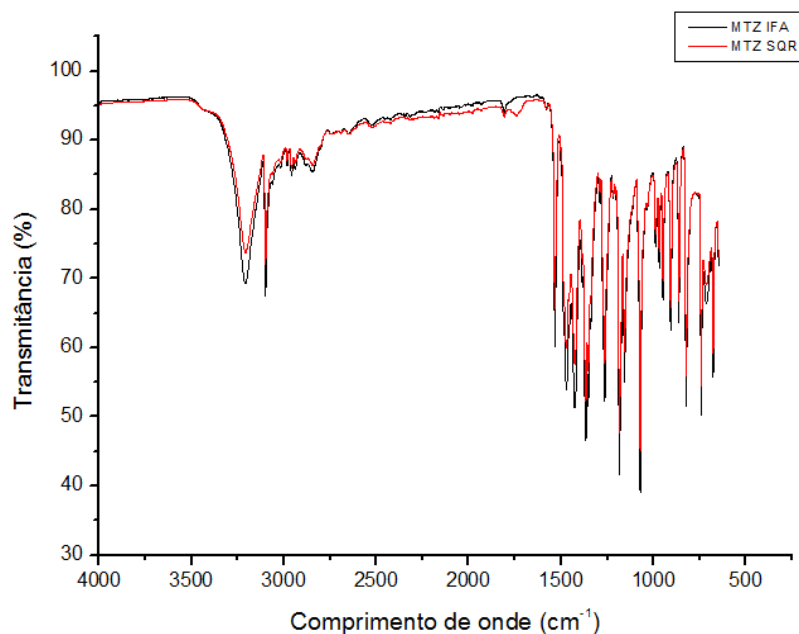


5.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica de identificação que se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas. Desse modo, essa técnica constitui hoje uma das principais ferramentas analíticas para identificação e elucidação estruturais de compostos orgânicos (BURNS, 2001). Na área farmacêutica, suas principais aplicações encontram-se no controle de qualidade de insumos, caracterização de fármacos, identificação de polimorfismos, entre outras (FREITAS-NETO et al, 2012; AGUIAR, 2009).

Os espectros de infravermelho do MTZ IFA e SQR são sobreponíveis e possuem as seguintes bandas de absorção: 3209 e 1269 $\nu(\text{OH})$, 3099 $\nu(\text{CH})$, 2955 e 2835 $\nu(\text{CH}_3)$, 1535 $\nu(\text{NO})$ e 1370 $\nu(\text{NO}_2)$, 1188 $\nu(\text{C=O})$ (Figura 20). As mesmas frequências vibracionais foram observadas por Ramukutty e Ramachandran (2012).

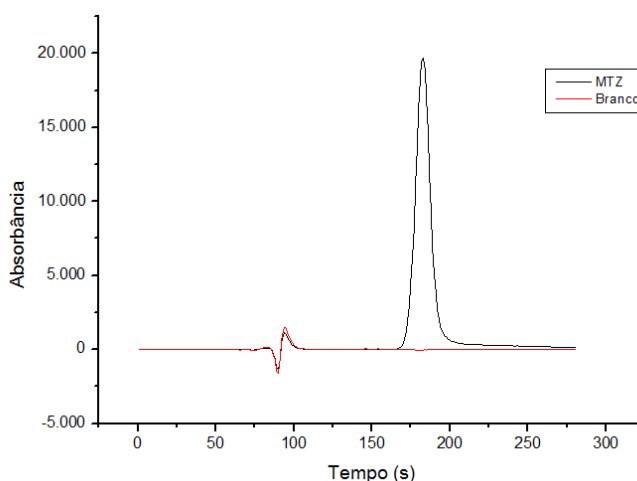
Figura 20 - Espectros de infravermelho do MTZ IFA e substância química de referência



5.1.4 Teor por cromatografia liquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV)

Garantir a qualidade de insumos farmacêuticos é um pré-requisito imprescindível durante o desenvolvimento de medicamentos para que se possa assegurar sua segurança e eficácia. Um dos ensaios comumente adotados para avaliar a qualidade de fármacos é o doseamento por CLAE (HOLFER et al, 2007). O teor de metronidazol em solução foi determinado a partir dos dados fornecidos pelo cromatograma do padrão do metronidazol. O pico do IFA (Figura 21) foi identificado de acordo com o tempo de retenção do padrão de metronidazol e seu teor determinado através das áreas dos picos. O MTZ IFA apresentou teor de $99,62 \pm 5,86\%$ apresentando-se dentro do limite especificado pela F. BRAS (2010).

Figura 21 - Cromatograma do metronidazol

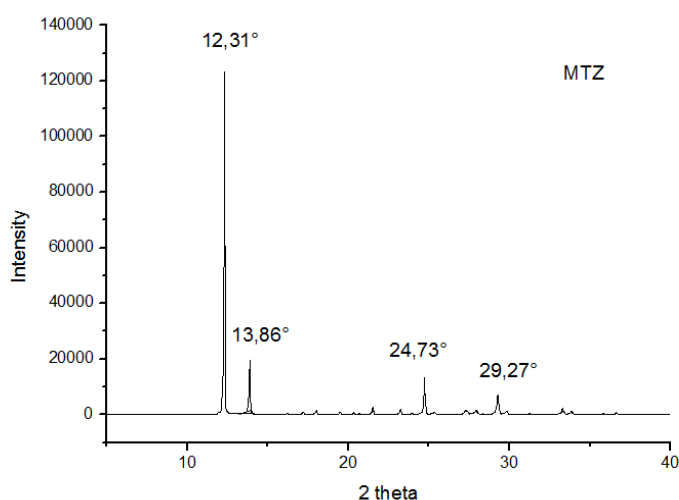


5.1.5 Perfil difratométrico

A difratometria de raios X (DR-X) corresponde a um dos principais métodos de caracterização de materiais cristalinos. Essa técnica tem sido importante no monitoramento da forma cristalina de um fármaco durante os vários estágios de desenvolvimento, pois qualquer mudança no grau de cristalinidade pode alterar a solubilidade do fármaco e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade (KARJALAINEN et al., 2005; AGUIAR, 2009).

O resultado do perfil difratográfico do MTZ apresenta uma série de picos intensos e bem definidos, revelando o típico padrão de um composto cristalino com pico principal em $12,31^\circ$ (2θ) e picos secundários em $13,86^\circ$; $24,73^\circ$ e $29,27^\circ$ (Figura 22). Através das fotomicrografias por MEV, apresentadas anteriormente, foi possível a visualização dos cristais de MTZ analisados e a ratificação da estrutura cristalina.

Figura 22 - Difratograma de raios-x do metronidazol



5.1.6 Distribuição granulométrica por difração a laser

A medida do tamanho de partículas é uma das principais análises efetuadas na caracterização de pós (KATDARE, CHAUBAL, 2006). Esta análise se faz necessária, uma vez que, este parâmetro pode alterar a eficácia de uma forma farmacêutica. (STORPIRTIS et al., 2009). A difração a laser é um método rápido e que traz uma descrição detalhada da distribuição granulométrica.

A distribuição de tamanho de partículas pode ser representada pelo valor médio e percentuais da população: 10 (P10), 50 (P50) e 90 (P90). Os dados comparativos de diâmetros médios para diferentes populações percentuais de MTZ estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição do tamanho de partícula do metronidazol

Lote	Tamanho da partícula - Percentuais (μm)			
	Média	P10	P50	P90
MTZ IFA	202.40	75.63	177.70	409.10

Fonte: dados da pesquisa

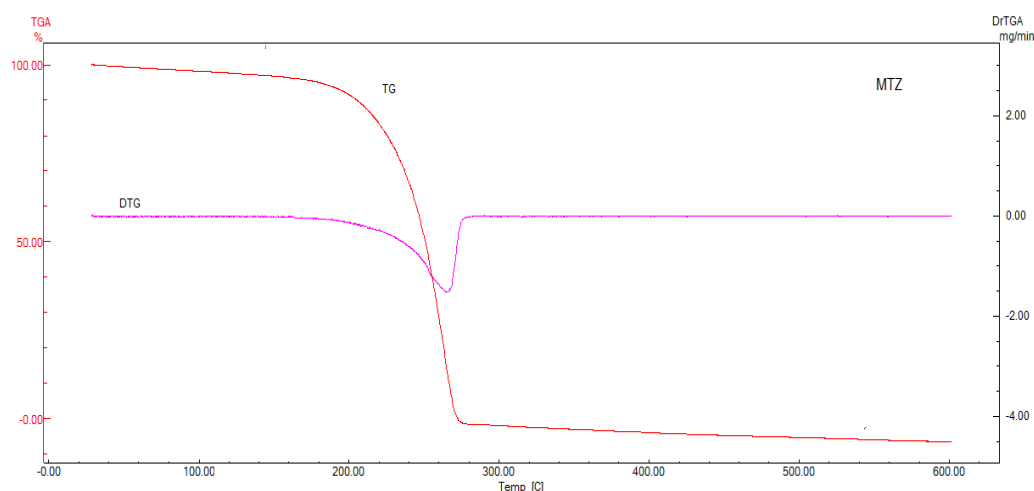
5.1.7 Caracterização térmica

A análise térmica é uma técnica valiosa na caracterização de fármacos e na avaliação da qualidade de medicamentos, pois permite a identificação de composto e de polimorfos, a determinação de pureza, o teor de umidade, a avaliação da estabilidade e da compatibilidade fármaco-excipiente (SINKO, SINGH, 2011).

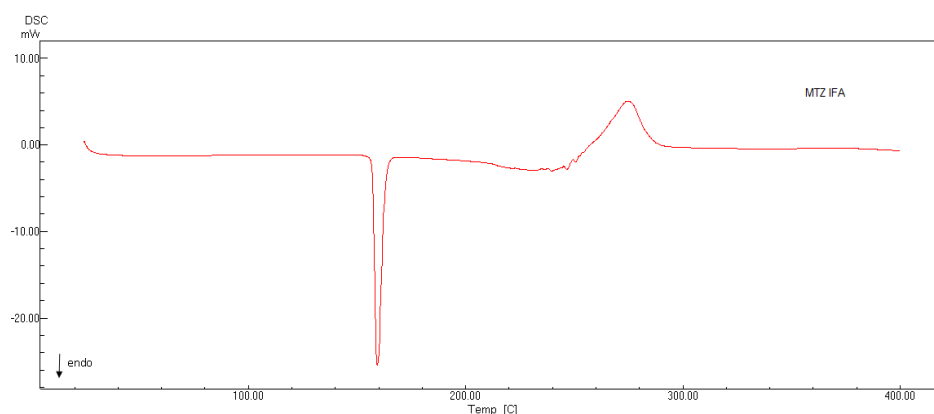
De modo geral, as técnicas termo-analíticas se baseiam no monitoramento de uma propriedade física do analito em função da temperatura ou do tempo, enquanto a amostra é aquecida ou resfriada, sob condições controladas (GIRON, 2002).

A caracterização térmica do MTZ foi realizada através das técnicas de Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). A TG é empregada para avaliar a variação de massa de uma substância em função da temperatura sob um programa de aquecimento e atmosfera controlados. Por sua vez, a DSC é utilizada com o propósito de medir a diferença de fluxo de calor entre uma analito e uma substância referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento (OLIVEIRA, YOSHIDA, GOMES, 2011).

Ao analisar a curva termogravimétrica TG/DTG do MTZ (Figura 23) observa-se apenas um evento que pode ser atribuído à decomposição do fármaco, conforme verificado por Pinto e cols, 2010. Este evento foi verificado na faixa de temperatura entre 253,05 e 270,94 °C e corresponde a uma perda de massa total de 95,12%. Portanto, é possível, predizer que o MTZ apresenta estabilidade térmica até a temperatura de 253,05 °C.

Figura 23 - Curva termogravimétrica do MTZ

A análise da curva de DSC (Figura 24) apresenta um primeiro evento nas temperaturas Tonset157,41 °C e Tendset162,88 °C com pico endotérmico em 159,35 °C e variação de entalpia $\Delta H = -248,80$ J/g. Esse evento está relacionado à fusão do fármaco conforme discutido anteriormente (item 3.1.2). O segundo evento foi observado na faixa de temperatura de 251,34 a 284,27 °C é indicativo da decomposição do fármaco, com liberação de energia ($\Delta H = 345,95$ J/g) (curva exotérmica) e perda de massa verificada na curva de TG. Resultados semelhantes foram verificados por Ramukutty e Ramachandran (2012).

Figura 24 - Calorimetria diferencial exploratória do MTZ entre 25 e 400 °C

5.2 DELINEAMENTO DOS GÉIS TERMOREVERSÍVEIS DE METRONIDAZOL 0,75%

5.2.1 Preparação dos géis termoreversíveis

Além da indicação clínica usual, o MTZ tem sido também utilizado de forma off-label no controle de odor de feridas oncológicas em diferentes centros de cuidados paliativos do Brasil.

Nessa prática, são empregadas diversas formas farmacêuticas como cremes, géis, soluções ou mesmo comprimidos macerados e pulverizados sobre as lesões (DA COSTA SANTOS; DE MATTOS PIMENTA; NOBRE, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Os termogéis, denominados F11 e F12, foram desenvolvidos com o objetivo de facilitar a administração do MTZ, manter a liberação controlada, favorecer a sua retenção na pele e em feridas crônicas e diminuir a absorção sistêmica.

Essa forma farmacêutica foi escolhida por ser líquida a temperatura ambiente e gelificar a temperatura corporal. Devido a essa característica, a aplicação é facilitada pela irrigação da solução sobre a ferida sem necessidade de espalhamento manual. Ademais, a formação do gel in situ impede o escoamento da solução e conduz a um sistema controlado de liberação do fármaco (BEYNON et al., 2003; HEILMANN et al., 2013; PEREIRA et al., 2013). Outros pontos a serem considerados são os termogéis de Poloxamer apresentarem-se como sistemas biodegradáveis, estáveis, de baixa toxicidade e, portanto, favoráveis para uso sobre lesões cutâneas (LU et al., 2015).

As formulações foram preparadas através de adaptação do "cold method" - método a frio descrito por Schmolka (1972). O método foi escolhido por acelerar a solubilização do P-407, além da sua praticidade (sem necessidade de grandes recursos tecnológicos) podendo ser facilmente reproduzido na farmacotécnica hospitalar.

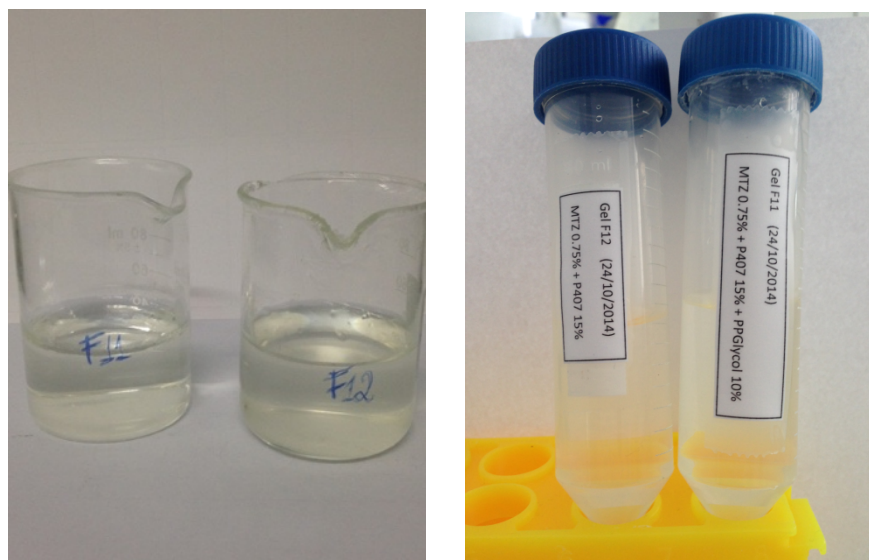
O Poloxamer® 407 é composto por polímeros anfifílicos de óxido de etileno e óxido de polietileno organizados em uma estrutura de triblocos que promovem a obtenção de sistemas com propriedades termoreversíveis (DUMORTIER et al., 2006).

Entre os estados líquido e sólido a depender da temperatura, esses polímeros assumem diferentes arranjos compreendendo as fases de solubilização (solvatação), micelização e gelificação.

O resfriamento facilita a solvatação das unidades poliméricas e a formação de pontes de hidrogênio com a porção hidrofílica do polímero, PEO, dando origem as soluções de P-407 (DUMORTIER et al., 2006; ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006).

Dessa forma, ao final de 24h de resfriamento foram obtidas soluções incolores e translúcidas que foram acondicionadas em tubos plástico ou bisnagas metálicas e mantidas a temperatura ambiente (Figura 25).

Figura 25 - Formulações termoreversíveis de MTZ 0,75%, F11 e F12.



Fonte: arquivo pessoal

5.2.2 Estudo de solubilidade

O MTZ é um fármaco ligeiramente solúvel em água a temperatura ambiente (~10 mg / mL) e acordo com os valores obtidos à temperatura corporal também (Tabela 2) (F. BRAS, 2010; BERSANI et al., 2005).

O PG foi adicionado a solução visando o incremento da solubilidade do fármaco. Dentre os álcoois polivalentes, o PG é o mais frequentemente utilizado como co-solvente em produtos de aplicação tópica (TROMMER, NEUBERT, 2006; PATEL, WELSH, BAKER, 1985).

Tabela 4 - Solubilidade do MTZ a 36 °C.

Solventes	mg/mL $\pm$ D.P
Água	9,89 $\pm$ 0,64
PG	38,90 $\pm$ 11,47
P407 gel (F12)	11,75 $\pm$ 1,13
PG/água (1:10, v/v)	17,04 $\pm$ 2,25
PG/P407 (1:10, v/v) (F11)	14.96 1 $\pm$ 2,35

Fonte: dados da pesquisa

Além do aumento da solubilidade do MTZ promovida pelo PG é importante destacar que o P-407 também é empregado como agente solubilizante de fármacos pouco solúveis em água (CAFAGGI et al., 2008). A ação solubilizante é conferida às micelas formadas em solução que são capazes de incorporar os fármacos insolúveis (DUMORTIER et al., 2006). Em estudo realizado por Shin, et al (1997), a solubilidade da indometacina foi aumentada com adição de 22,5% de poloxamer (SHIN; CHO, 1997). No nosso estudo, a solubilidade do MTZ com a adição do P-407 foi aumentada, porém de forma discreta. O aumento da solubilidade é dependente da concentração de polímero utilizada (SHIN; CHO, 1997).

Quando comparadas as formulações F11 e F12 não foi observada diferença na solubilidade do MTZ nos dois meios ($P \geq 0,05$), ou seja, a presença do PG não modificou a solubilidade do MTZ nos termogéis.

5.2.3 Determinação do pH

A pele saudável possui pH variável entre 4,2 – 5,6 mantido por ácidos, gorduras, queratina e secreções de glândulas sudoríparas que formam um filme sobre o estrato córneo oferecendo proteção bactericida e fungicida superfície da pele (LEONARDI; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2002; ONO et al., 2015).

A perda da integridade da pele causa aumento do pH local tornando este, um ambiente propício ao desenvolvimento bacteriano. Em feridas crônicas, o pH está

alterado apresentando valores entre 7,0 – 9,0 ou maior (GETHIN, 2007; ONO et al., 2015; SCHREML et al., 2010).

Dessa forma, é importante que as formulações a serem utilizadas em lesões cutâneas não favoreçam o aumento do pH local e, por conseguinte um ambiente propício ao crescimento microbiano.

Os valores de pH verificados para os termogéis foram $6,36 \pm 0,04$ e $6,24 \pm 0,03$ para F 11 e F12, respectivamente. Portanto, as formulações apresentam valores de pH adequados para administração tópica e intralesional.

5.2.4 Avaliação viscosimétrica

O estudo viscosimétrico e de comportamento reológico é um importante parâmetro a ser avaliado nas formulações cuja viscosidade é dependente da temperatura e da concentração de polímero.

A Figura 26 apresenta o gráfico da viscosidade em função da taxa de cisalhamento a 37 °C. Através dele pode-se verificar curvas de descendentes da viscosidade com o aumento da deformação para todas formulações indicando que estas se apresentam como fluidos não-Newtoniano do tipo pseudoplástico (PEREIRA et al., 2013; RICCI et al., 2002).

As curvas de fluxo das formulações F11 e F12 apresentadas na Figura 27 confirmam a pseudoplastia e indicam ainda que os termogéis possuem propriedades tixotrópicas, evidenciadas no gráfico pela formação da área de histerese.

Figura 26 - Gráfico de viscosidade x taxa de cisalhamento a 37 °C dos géis F11, F12 e Rozex®.

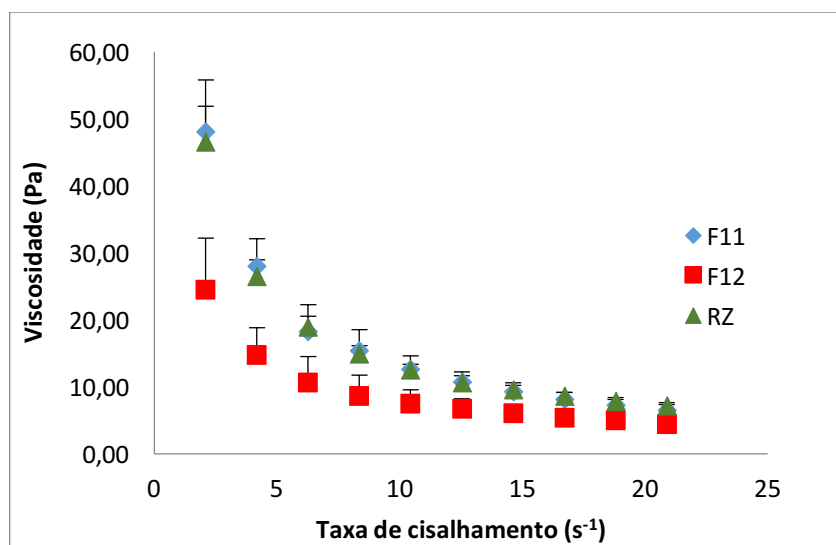
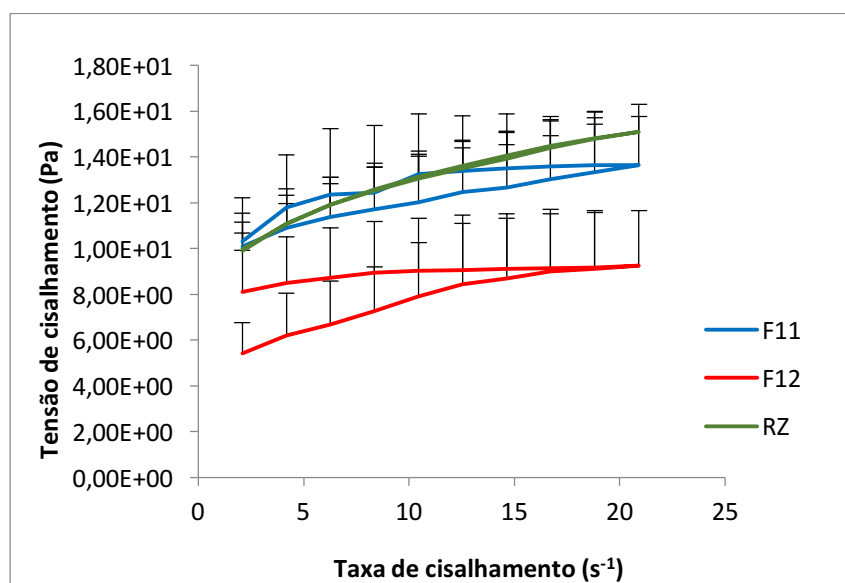


Figura 27 - Gráfico de tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento a 37 °C dos géis F11, F12 e Rozex®



O comportamento pseudoplástico com tixotropia é previsível e desejável para géis de Poloxamer, principalmente quando se trata de preparações de uso tópico e em cavidades. A tixotropia é favorável porque facilita a administração e a espalhabilidade dos termogéis em feridas abertas sem necessidade de fricção (RICCI, 2002; PEREIRA et al, 2013).

Além disso, uma maior viscosidade do termogel evita o escoamento da formulação após aplicação. Por outro lado, quando há necessidade de desbridamento da ferida, a diminuição da viscosidade é importante para não causar desconforto e sofrimento dos pacientes durante a aplicação (PEREIRA et al., 2013).

Os dados da Figura 26 mostram ainda uma menor viscosidade para o gel F12 em relação ao gel F11 e o Rozex® a temperatura corporal ($P \leq 0,05$). Esses resultados corroboram com os dados da viscosidade aparente que apresentaram os seguintes valores: $6,55 \pm 1$ Pa e $4,45 \pm 1,18$ Pa para os géis F11 e F12, respectivamente. O Rozex® apresentou média de $7,23 \pm 0,57$ Pa.

A menor viscosidade de F12 em relação a F11 pode ser atribuída a presença do PG em F11. Durante a micelização, o PG contribui para a desidratação dos blocos de PPO, estágio precedente a formação do gel. A presença de PG diminui o espaço entre as micelas gerando sistemas mais rígidos, culminando no incremento da viscosidade (IVANOVA, LINDMAN, ALEXANDRIDIS, 2002; MILLER, DRABIK, 1984; PEREIRA ET AL, 2013).

5.2.5 Determinação da temperatura de transição sol-gel

A medida da temperatura de transição sol-gel (T_{s-g}) é um parâmetro-chave a ser avaliado nos sistemas termoreversíveis.

Conforme descrito, em baixas temperaturas, as moléculas do polímero encontram-se em solução. Quando a temperatura é elevada, as cadeias poliméricas desidratam como resultado da quebra das ligações hidrogênio favorecendo a interação entre as cadeias hidrofóbicas de PPO (DUMORTIER et al., 2006; ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006).

Em um primeiro momento durante essa nova interação, ocorre a formação de micelas, estágio precedente a gelificação. Conforme a temperatura aumenta, as micelas tendem a se organizar (empacotar), esse processo leva ao aumento da viscosidade resultando na formação do gel. A gelificação portanto, é dependente da temperatura e da concentração micelar crítica (CABANA; AIT-KADI; JUHASZ, 1997; DUMORTIER et al., 2006; KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002).

Neste sentido, análise de parâmetros reológicos é uma importante ferramenta na determinação da Ts-g.

Além de fluidos pseudoplásticos, os géis de P-407 apresentam propriedades viscoelásticas possuindo características de materiais sólidos e líquidos (RICCI et al., 2002).

As propriedades viscoelásticas medidas foram apresentadas em módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') nas Figuras 28 e 29. Esses módulos estão relacionados com a energia envolvida durante o ciclo de deformação as quais as formulações foram submetidas em função da temperatura.

Os módulos G' e G'' são característicos de materiais sólido e líquido, respectivamente. O módulo G' apresenta valor baixo para os líquidos e aumenta de forma acentuada com a temperatura resultando na formação de gel. Ao ocorrer a transição sol-gel o G' torna-se independente da temperatura (RICCI et al., 2002).

A Figura 28 e 29 mostram a variação dos parâmetros G' e G'' dos géis F11 e F12 em função da temperatura. A Ts-g verificada foi 40.9 °C para F11 e 40,6 °C para F12.

Figura 28 - Temperatura de transição de fase sol-gel para gel F11.

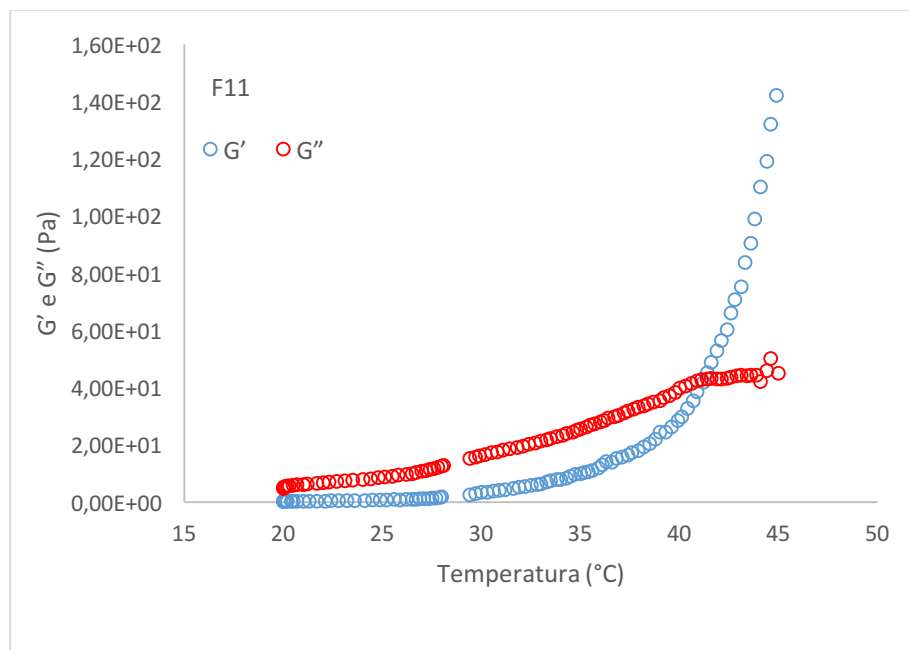
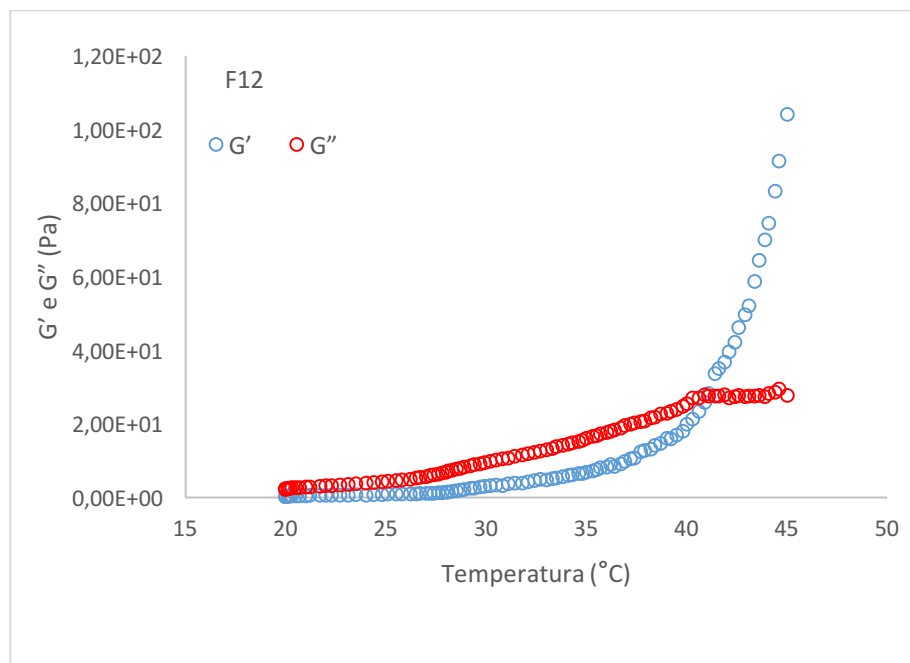


Figura 29 - Temperatura de transição de fase sol-gel para gel F12.



Os valores encontrados estão acima da temperatura fisiológica, todavia é observado o aumento pronunciado da viscosidade a partir de 35 °C.

Através do método visual de inclinação do tubo, os valores obtidos foram 36,5 °C $\pm$ 1,8 para F11 e 34,5 °C $\pm$ 1,0 para F12. O maior valor de Ts-g para o gel F11 em relação a F12 ($P \leq 0,05$) pode ser atribuído a presença do PG no primeiro gel.

Sobre as técnicas utilizadas é importante destacar que frente a técnica do tubo, as técnicas de avaliação reológica são mais sensíveis e precisas. No entanto, o método visual do tubo mostra-se bastante simples, rápido, de baixo custo e amplamente citado na literatura (BENTLEY et al., 1999; LIHONG et al., 2014; LU et al., 2015; UR-REHMAN; TAVELIN; GR??BNER, 2011).

5.3 BIODISPONIBILIDADE CUTÂNEA: DPK IN VITRO E MICRODIÁLISE *IN VIVO*

5.3.1 Estudo da permeação cutânea e avaliação da DPK *in vitro*

O estudo da permeação cutânea teve por objetivo avaliar a performance dos termogéis na entrega do MTZ no local de ação e compara-los ao medicamento de referência lembrando que este é usado de forma off-label. Além disso, os estudos in

vitro são importantes na predição do perfil de concentração do fármaco na pele para estudos in vivo (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008).

Além da quantidade de fármaco que chega ao líquido receptor, ou seja, que atravessa a pele, foi também avaliado o fármaco retido no estrato córneo e na epiderme viável para a pele íntegra. Em contrapartida, na pele lesionada o MTZ foi quantificado apenas no líquido receptor e na epiderme.

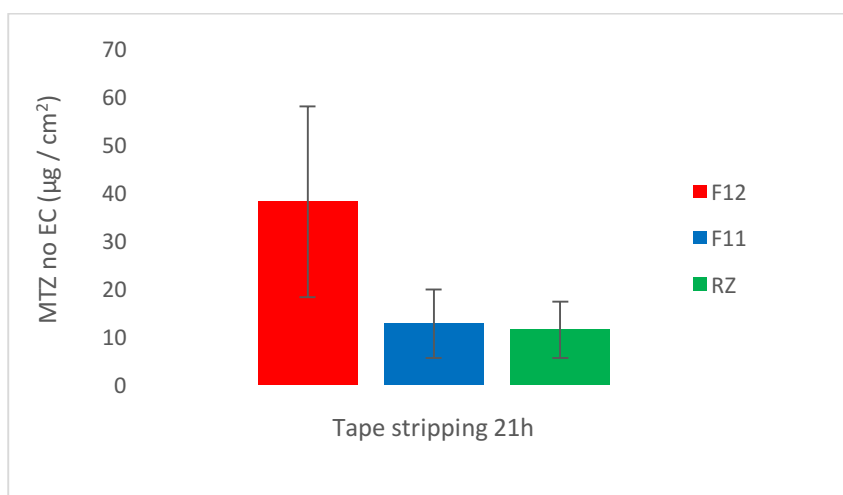
Mesmo visando a administração do MTZ na pele lesionada ou sobre feridas, a análise da passagem do fármaco através da pele saudável é colocada como um controle diante das três formulações.

A penetração do fármaco na pele está diretamente relacionada com o grau de lesão, avaliado pela medida da TEWL (FLUHR; FEINGOLD; ELIAS, 2006). A perda de água transepidérmica mensurada foi de $47,45 \pm 1,35$ g / m² / h. Diante dos valores obtidos, a pele do animal foi considerada lesionada de acordo com Ostrowski, et al (2014) assume para isso valores de TEWL acima de 40 g / m² / h.

A hidratação da pele é um dos maiores indicativos da pele saudável. A presença do EC limita a perda de água por evaporação. Dessa forma, a evaporimetria tem se mostrado eficaz na avaliação da remoção do EC e, portanto, da integridade e permeabilidade da pele (FLUHR; FEINGOLD; ELIAS, 2006; GAO et al., 2013; OSTROWSKI et al., 2014).

Para a pele íntegra, a quantidade total (µg/cm²) de MTZ no estrato córneo para cada formulação após 21 h é apresentada na Figura 30.

Figura 30 - Quantidade de MTZ no estrato córneo após 21 h.



Após avaliação estatística foi verificado que a quantidade de MTZ no EC foi maior ($P \leq 0,05$) para F12 do que para F11 e RZ que mostraram resultados semelhantes entre si ($P \geq 0,05$).

O termogel F11 e o RZ contém PG. De acordo com a literatura, o PG pode modificar as propriedades de barreira do EC promovendo a passagem do fármaco na pele (PATEL, WELSH, BAKER, 1985). Essa ação é mais pronunciada para fármacos de maior solubilidade em álcool do que em água e esta característica foi verificado para o MTZ no estudo de solubilidade (TROMMER, NEUBERT, 2006).

Devido a ação solubilizante é sugerido que o PG promova a solvatação da queratina nos queratinócitos e se ligue aos lipídios do EC aumentando a solubilidade do fármaco no meio favorecendo a difusão (TAKEUCHI et al., 1993; TROMMER; NEUBERT, 2006). Ao mesmo tempo, o PG tem função umectante, aumentando a hidratação do EC resultando no incremento da penetração do fármaco (PATEL, WELSH, BAKER, 1985). Para o MTZ a hidratação tem mostrado um fator considerável no aumento da permeabilidade do EC (MIRON et al., 2014).

As médias da quantidade ($\mu\text{g} / \text{cm}^2$) de MTZ retida na EP/D para as peles íntegra e lesionada estão mostradas nas Figuras 31 e 32.

Figura 31 - Quantidade de MTZ retida na epiderme/derme após 21 h – Pele íntegra.

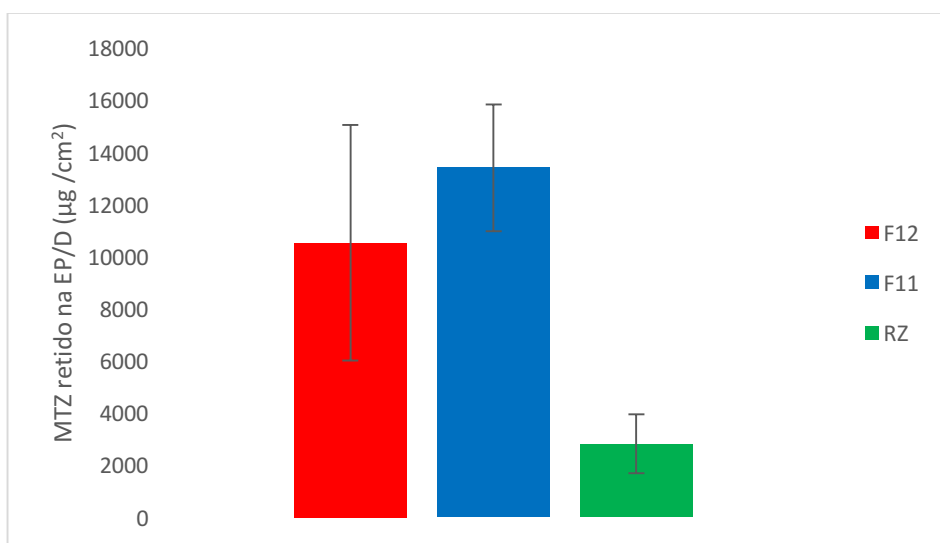
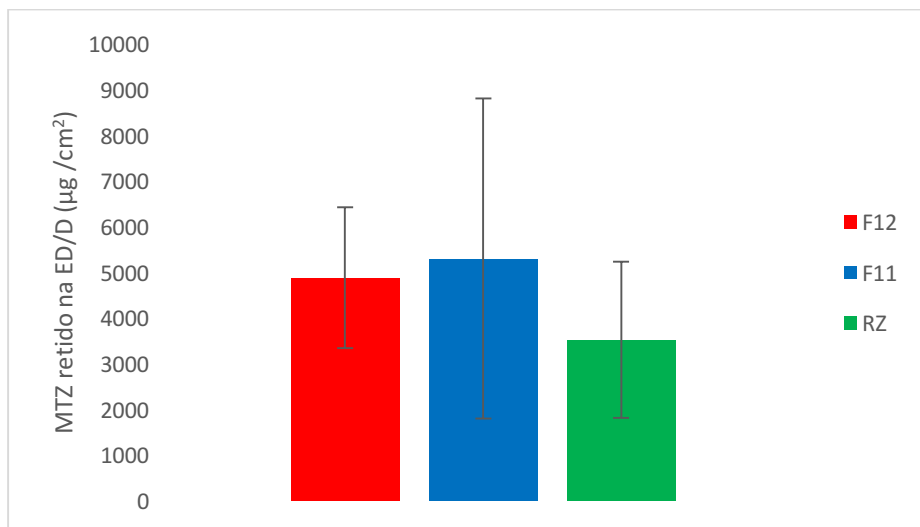


Figura 32 - Quantidade de MTZ retida na epiderme/derme após 21 h – Pele lesionada.



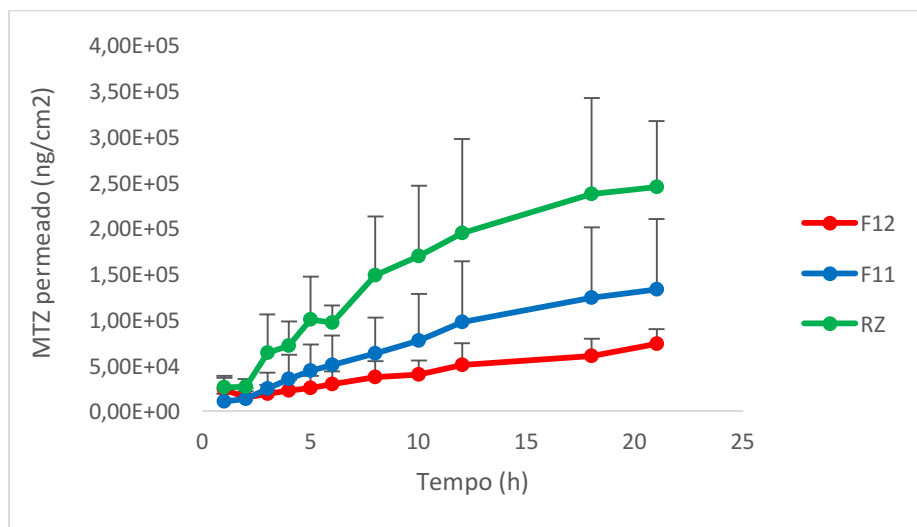
A retenção do MTZ na EP/D da pele íntegra foi similar para F11 e F12 ($P \geq 0,05$), mas menor para RZ ($P \leq 0,05$) (Figura 31). Para a pele lesionada foi observado que para todas as formulações a retenção foi similar ($P \geq 0,05$) (Figura 32).

Quando comparados os dados de retenção entre os modelos de pele, foi visto que a retenção para a F12 foi menor (cerca da metade) na pele sem EC. Estes dados demonstram a capacidade barreira seletiva do EC a permeação de fármacos, principalmente para substâncias hidrofílicas como o MTZ (BOLZINGER et al, 2012).

Para F11 e RZ não houve diferença na quantidade de MTZ retida independente do modelo de pele ($P \geq 0,05$). Esse resultado ratifica a função promotora da penetração do fármaco na camada córnea conferida ao PG.

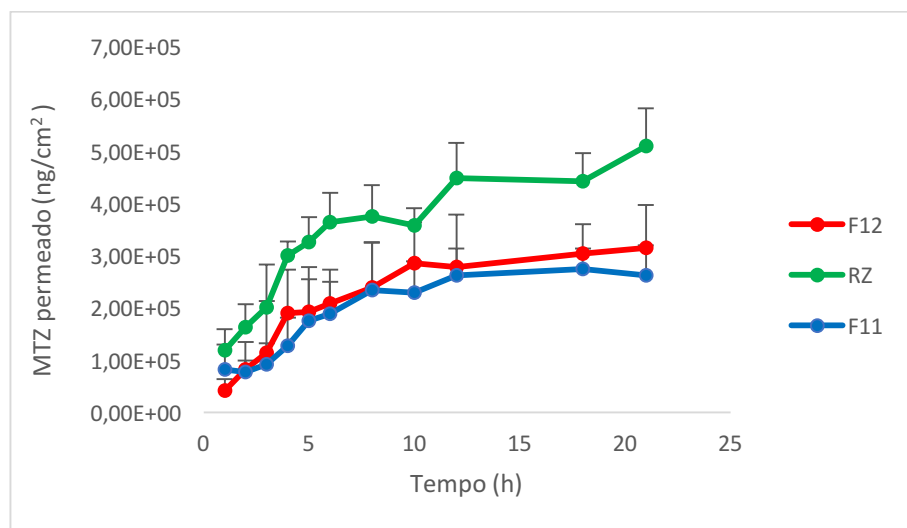
O gráfico da quantidade de MTZ permeada versus tempo para a pele íntegra e lesionada foram plotados (Figura 25 e 26) e calculados os parâmetros de permeação: Q21h (quantidade permeada de MTZ em 21 h), J e Kp (Tabela 5).

A figura 10 mostra permeação similar do MTZ através da pele de rato íntegra para F11 e F12 ($P \geq 0,05$) e superior para o RZ ($P \leq 0,05$). A média da quantidade permeada (Q21h) e o fluxo (J) após 21h para RZ foi 2 a 4 vezes maior do que nos termogéis F11 e F12, respectivamente (Tabela 5). Resultados similares foram observados para a permeação na pele lesionada (Figura 34).

Figura 33 - Perfil de permeação do MTZ durante 21 h – Pele íntegra**Tabela 5** - Parâmetros de permeação do MTZ nas formulações.

Formulações/Parâmetros	Pele íntegra			Pele lesionada		
	F11	F12	RZ	F11	F12	RZ
$Q_{21h}^a \times 10^2 (\pm D.P)$	$2,19 \pm 1,09$	$1,30 \pm 0,27$	$4,33 \pm 1,28$	$4,64 \pm 1,03$	$5,57 \pm 1,44$	$9,02 \pm 1,27$
$J^b (\pm D.P)$	$5,31 \pm 2,43$	$2,81 \pm 0,60$	$14,10 \pm 4,83$	$10,20 \pm 2,34$	$13,50 \pm 3,26$	$16,80 \pm 2,57$
$Kp^c \times 10^{-6} (\pm D.P)$	$0,70 \pm 0,32$	$0,37 \pm 0,07$	$1,88 \pm 0,64$	$1,36 \pm 0,31$	$1,80 \pm 0,43$	$2,24 \pm 0,34$

Resultados foram expressos como média $\pm$ D.P^a Q_{21h} (μ g): MTZ total no meio receptor após 21 h. ^b J (μ g/cm²/h): MTZ fluxo após 21 h. ^c Kp : constante de permeabilidade.

Figura 34 - Perfil de permeação do MTZ durante 21 h – Pele lesionada

Em ambos os modelos de pele foi verificado que o fluxo foi menor para as formulações a base de Poloxamer® comparado com o RZ (formulado com carbopol). Como já descrito, um sistema de Poloxamer promove a liberação controlada do fármaco devido a sua estrutura micelar.

Estudo realizado por Heilmann e colaboradores (2013) comparou a permeação da morfina contida em preparações de Poloxamer e hidroxietilcelulose. Neste estudo, foi verificado que uso do P-407 25% proporcionou uma liberação de 10% do fármaco após 6h, definindo o sistema como adequado para administração tópica por promover uma liberação prolongada da morfina (HEILMANN et al., 2013).

A Tabela 4 apresenta o balanço de massa feito pela média da quantidade do MTZ retidas no EP/D e líquido receptor comparadas com a quantidade de fármaco administrado.

Tabela 6 - Porcentagem de MTZ retido na EP/D e permeado em função da quantidade administrada.

Formulações/Pele	F11	F12	RZ
Pele íntegra	18,6%	11,3%	35%
Pele lesionada	37,7%	45,1%	72,7%

Fonte: dados da pesquisa

Com base nos dados da Tabela 6 observa-se que o EC foi determinante na permeação do MTZ, principalmente devido a hidrofília do fármaco. Além disso, ao analisar o balanço de massas de F11 e RZ, percebe-se de forma mais clara que o PG contribuiu para a difusão do MTZ. Por fim, os resultados inferiores de permeação dos termogéis reiteram a habilidade de liberação controlada dessas formas farmacêuticas.

5.3.2 Permeação cutânea *in vivo* (DMD)

5.3.2.1 Implantação do cateter arterial femoral

Nos procedimentos cirúrgicos de inserção de cateter realizados, em apenas uma cirurgia ocorreu ruptura da artéria durante a perfuração para inserção do cateter. Neste caso, a artéria foi bloqueada e o cateter foi inserido no lado direito. Os demais foram conduzidos sem maiores eventualidades.

O implante do cateter visou a coleta sanguínea para a posterior quantificação do MTZ no plasma após a administração tópica. Todavia, para os 33 ratos avaliados, foram obtidas amostras nos 4 pontos de coleta estabelecidos para apenas 8 animais de grupos diferentes. Em 4 animais se obteve coletas com 3 pontos em diferentes tempos. Dessa forma, não foi possível a obtenção de dados de concentração plasmática do MTZ após administração de cada formulação. A maior dificuldade encontrada nas coletas foi a obstrução do fluxo do cateter mesmo após adição de solução de heparina 50 UI / mL.

5.3.2.2 Implantação da sonda de microdiálise e anel de depósito

Durante o desenvolvimento do protocolo do estudo foram testadas as sondas linear e concêntrica, ambas frequentemente utilizadas em estudo de DMD (HERKENNE et al., 2008). A sonda concêntrica foi escolhida devido a melhor fixação na pele e maior resistência a movimentação do animal, pois a flexibilidade da sonda linear a tornava mais propícia a quebra. Além disso, foi considerado o custo para a aquisição e a experiência da equipe do laboratório com o uso da sonda concêntrica.

Após a inserção da sonda na pele, a região apresentou eritema devido ao aumento do fluxo sanguíneo local (Figura 27). Todavia, a hiperemia é reversível em poucas horas e o trauma causado pela implantação da sonda é considerado mínimo e negligenciável (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010; SCHNETZ; FARTASCH, 2000). Grothe colaboradores (1998) verificaram através de ultrasonografia que a hiperemia e a elevação dos níveis de histamina foram normalizados 30 minutos após a inserção da sonda linear com cânula-guia (GROTH; JØRGENSEN; SERUP, 1998).

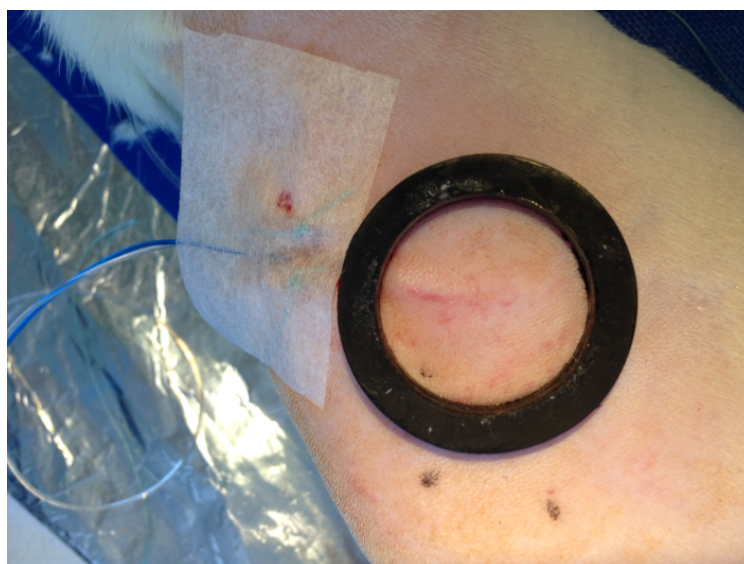
Figura 35 - Sonda implantada na pele.



Fonte: arquivo pessoal

O anel-depósito das formulações foi colocado na região dorsal da pele do rato devido a maior área superficial e a melhor fixação diante da movimentação do animal. A fixação feita com cola veterinária foi eficaz e em nenhum momento após o depósito foi verificado escoamento das preparações para além área delimitada pelo anel (Figura 36).

Figura 35 - Anel-depósito fixada sobre a pele do animal.



Fonte: acervo pessoal

5.3.2.3 Microdiálise cutânea

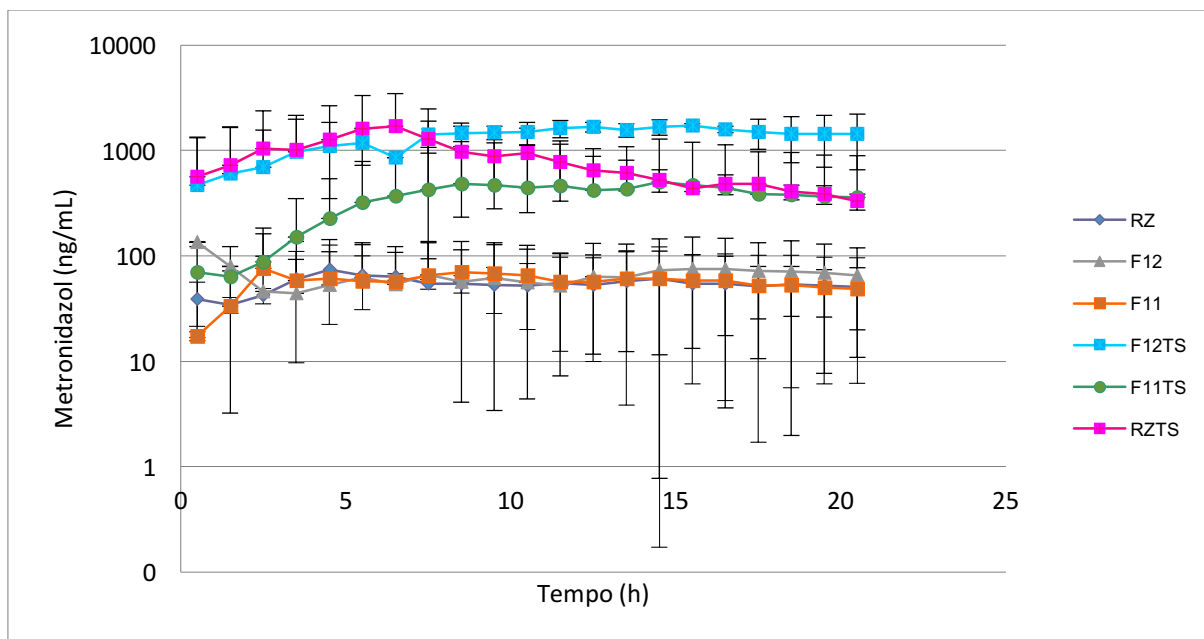
Na etapa inicial do estudo foram realizados ensaios para determinação do fluxo do líquido de perfusão na sonda. Foram avaliados fluxos entre 0,5 e 2,5 $\mu\text{L} / \text{min}$ e definido a velocidade de perfusão em 0,7 $\mu\text{L} / \text{min}$ com base na menor variação após testes em triplicata por gravimetria. A gravimétrica é sugerida como ensaio controle dos fluxos da DMD (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010).

Geralmente, nos ensaios de microdiálise são utilizados fluxos entre 1 e 5 $\mu\text{L} / \text{min}$, todavia para DMD tem sido mais frequente uma taxa entre 0,9 e 1,5 $\mu\text{L} / \text{min}$ (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010; SHUKLA et al., 2014). Variações na taxa de fluxo podem afetar a recuperação relativa da sonda. Pressupõe-se que taxas mais lentas levam ao aumento do intervalo de tempo da coleta e conduz uma maior recuperação. Todavia, há um prolongamento do tempo necessário ao equilíbrio da sonda com o ECF e um déficit temporal na execução do experimento, além de levar a um menor volume de coleta da amostra. Por outro lado, altas taxas de fluxo ocasionam uma elevação da pressão do líquido de perfusão no interior da sonda e a uma possível diluição do dialisato levando a uma diminuição da recuperação (HOLMGAARD; NIELSEN; BENFELDT, 2010; SHUKLA et al., 2014).

Na recuperação por retrodiálise o menor valor médio observado foi $18,82 \pm 3,54\%$ para as sondas usadas na microdiálise do grupo F12 e $62,37 \pm 4,10\%$ para o grupo F11, ambas inseridas na pele íntegra. Esses valores seguem o recomendável pela literatura que sugere que a $RR \geq 20\%$ para melhor confiabilidade nos resultados da concentração do fármaco no dialisato (SHINKAI et al., 2011).

Após os ensaios de recuperação e a lavagem da sonda, foi feita a administração de 500 mg do gel teste equivalente a 3,75 mg de MTZ. A quantidade de formulação aplicada foi definida de modo que cobrisse toda a área da pele delimitada resultando em uma dose igual a 94,34 mg / cm^2 . Essa quantidade aplicada foi considerada uma dose infinita, refletindo-se através do platô visualizado no gráfico da concentração do MTZ in vivo na pele íntegra x tempo, iniciado logo nos primeiros tempos das análises realizadas (SELZER et al., 2013) (Figura 37).

Figura 36 - Concentração x tempo do MTZ in vivo durante 21 h – Pele íntegra e pele lesionada.



Através da análise do gráfico também foi possível perceber que o EC foi um fator limitante para o transporte do MTZ quando comparadas as peles íntegra e lesionada, corroborando com os achados no procedimento realizado in vitro. Essa limitação se deve principalmente a matriz lipídica do EC que lhe confere alta lipofilia dificultando a difusão de fármacos hidrofílicos como o MTZ (GODIN; TOUITOU, 2007).

O gráfico ainda mostra uma alta variabilidade entre os resultados limitando as análises sobre a biodisponibilidade in vivo do MTZ através da MD, contido nos termogéis desenvolvidos e no medicamento de referência. No entanto, a variabilidade dos resultados se deve principalmente ao pequeno número de animais utilizados no estudo, bem como aos problemas relacionados ao desenvolvimento da técnica de DMD (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de animais por DMD.

Grupo	Número de animais inicial	Número de animais com DMD concluídas
F11	8	3
F11TS	5	3
F12	7	2
F12TS	4	4
RZ	6	3
RZTS	3	2

Fonte: dados da pesquisa.

As principais perdas nos experimentos de DMD foram relacionadas a: quebra da sonda pelo animal, entupimento da sonda, saída da sonda da pele, medidas de concentração abaixo do limite inferior de quantificação, depósito accidental da cola na pele na área de depósito e problemas relacionados ao fluxo nas tubulações do sistema de microdiálise, demonstrando a necessidade de habilidade técnica para execução do procedimento, bem como a escolha do aparato mais adaptável ao modelo do que se pretende avaliar.

No mais, vale salientar que, neste estudo, a indisponibilidade de mecanismos de avaliação da integridade da pele após remoção do EC bem como a impossibilidade da análise da profundidade da sonda, mostrou o quão frágil pode ser a referida técnica, levando a dados altamente variáveis (SHUKLA et al., 2014).

De um modo geral, diante dos resultados obtidos nos estudos in vitro e in vivo, pode-se afirmar que a camada córnea foi determinante para a difusão do MTZ através da pele. Deve-se ter em mente que, em feridas crônicas o estrato córneo é inexistente e é bem verdade que o ambiente em nada se assemelha apenas a exposição da epiderme/derme. Porém, a avaliação da passagem de fármacos através da pele lesionada, permite a observação da performance das preparações diante de interferentes biológicos e, no modelo de feridas ou para infecções cutâneas este estudo é o que mais se aproxima da realidade (HEILMANN et al., 2013; STAHL et al., 2010).

Conclusão

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- Foi possível caracterizar, identificar e obter dados de cristalinidade e perfil térmico referentes ao metronidazol que irão influenciar na formulação, nos ensaios de controle de qualidade e na biodisponibilidade tópica do produto final.
- Os termogéis de MTZ 0,75% obtidos possuem temperatura de transição sol-gel próxima a corporal com o intuito de facilitar a administração e evitar o escoamento in situ além de apresentar pH adequado para administração tópica e em feridas cutâneas;
- O PG não modificou a solubilidade do MTZ na solução de poloxamer, porém promoveu aumento da viscosidade e penetração cutânea in vitro do MTZ através da pele de rato;
- O MTZ apresentou maior retenção na derme/ epiderme a partir das formulações de termogel quando comparadas com gel referencia, independente da presença do EC que demonstrou, por sua vez, ser um fator limitante para a passagem cutânea do MTZ in vitro e in vivo;
- Não foi possível realizar uma correlação entre os ensaios in vitro e in vivo. Porém, foi possível evidenciar que a formulações de termogel apresentam habilidade para aumentar a retenção do MTZ na pele, diminuindo assim a absorção sistêmica do fármaco bem como seus efeitos colaterais, podendo vir a ser uma alternativa segura e eficaz na diminuição do odor de feridas oncológicas.

PERSPECTIVAS

- Realizar estudo de estabilidade acelerado dos termogéis (em andamento);
- Realizar estudo das características reológicas das formulações após esterilidade (em andamento);
- Avaliar a correlação in vitro/ in vivo da formulação F12 mediante um novo delineamento do ensaio de microdiálise cutânea do termogel F12 (em andamento: dissertação de mestrado);
- Avaliar a eficácia in vitro dos termogéis frente a bactérias aeróbias e anaeróbias resistentes (em andamento: parceria com a Profa. Dra. Eulália Ximenes (Departamento de Antibióticos da UFPE);
- Estudo piloto da eficácia clínica de termogel e determinação in vivo da segurança através da determinação plasmática dos níveis eventuais de MTZ absorvido em pacientes portadores de feridas oncológicas do Centro de Cuidados Paliativos do IMIP Prof. Fernando Figueira – Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Instituição (aguardando execução).

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Tradução de Tatiana Ferreira Robaina et al 7. Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011. 545 p.
- AGUIAR, R. M.; SILVA, G. R. C. *Os Cuidados de Enfermagem em Feridas Neoplásicas na Assistência Paliativa*. 2012.
- AGUIAR, F.A. Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil in vitro de dissolução e no efeito farmacológico. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas do centro de ciências da saúde da USP- Ribeirão Preto, 2009.
- ALMEIDA, H. et al. Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques*, v. 15, n. 4, p. 592–605, 2012.
- ARAUJO, T. P. Bioequivalência tópica de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK). Recife: UFPE. 99 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- ASHFOR, R.; et al. Double-blind trial of metronidazole in malodorous ulcerating tumours. *The Lancet*, v. 2, p. 1232-1233, 1984.
- AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BALE, S.; TEBBLE, N.; PRICE, P. A topical metronidazole gel used to treat malodorous wounds. *British Journal of Nursing*, v. 13, n. 11, 4-11, 2004.
- BENTLEY, M. V. L. B. et al. Influence of lecithin on some physical chemical properties of poloxamer gels: Rheological, microscopic and in vitro permeation studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 193, n. 1, p. 49–55, 1999.
- BERSANI, C. et al. PEG-metronidazole conjugates: Synthesis, in vitro and in vivo properties. *Farmaco*, v. 60, n. 9, p. 783–788, 2005.
- BEYNON, T. et al. Lutrol gel: A potential role in wounds? *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 26, n. 2, p. 776–780, 2003.
- BRITTAIN, H.G; BOGDANOWICH, S.J.; BUGAY, D.E.; DE VICENTIS, J.; LEWEN, G.; NEWMAN, A.W. Physical Characterization of pharmaceutical solids. *Pharmaceutical Research*, v.8, n.8, p.963-973, 1991.
- BONACUCINA, G. et al. Thermosensitive self-assembling block copolymers as drug delivery systems. *Polymers*, v. 3, n. 2, p. 779–811, 2011.
- BURNS, D. A. & CIURCZAK, E. W. *Handbook of near-infrared analysis*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 2001.

CABANA, A.; AIT-KADI, A.; JUHASZ, J. Study of the gelation process of polyethylene oxide(a) polypropylene oxide(b) polyethylene oxide(a) copolymer (Poloxamer 407) aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 190, n. 190, p. 307–312, 1997.

CARINI, J.P.; et al. Investigação Preliminar Avaliando a Influência dos Processos de Compactação e Trituração em Relação às Propriedades Cristalinas e Polimórficas da Talidomida. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.28, n.2, p. 226-233, 2009.

CAFAGGI, S. et al. Poloxamer 407 as a solubilising agent for tolfenamic acid and as a base for a gel formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 35, n. 1–2, p. 19–29, 2008.

CHRISMAN, C. A. Care of chronic wounds in palliative care and end-of-life patients. *International Wound Journal*, v. 7, n. 4, p. 214–235, 2010.

CLARK, S. A. Managing , and Living with Malignant Wounds. [s.l: s.n.].

DA COSTA SANTOS, C. M.; DE MATTOS PIMENTA, C. A.; NOBRE, M. R. C. A Systematic Review of Topical Treatments to Control the Odor of Malignant Fungating Wounds. *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 39, n. 6, p. 1065–1076, 2010.

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical Research*, v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J. et al. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 9, n. 3, p. 339–358, 2006.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J. et al. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 11, n. 1, p. 104–130, 2008.

Farmacopeia Brasileira. Parte I. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

FINLAY, I. G. et al. The effect of topical 0.75% metronidazole gel on malodorous cutaneous ulcers. *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 11, n. 3, p. 158–162, 1996.

FIRMINO, F. Pacientes Portadores de Feridas Neoplásicas em Serviços de Cuidados Paliativos: contribuições para a elaboração de protocolos de enfermagem de intervenções de enfermagem. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 51, n. 4, p. 347–359, 2005.

FLUHR, J. W.; FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: Validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Experimental Dermatology*, v. 15, n. 7, p. 483–492, 2006.

FREITAS-NETO, J.L.; PRESMICH, G.M.A.; ROLIM, L.A.; ALVES, L.D.S.; ALBUQUERQUE, M.M.; ROLIM-NETO, P.J. Caracterização físico-química do

potencial agente antineoplásico β -lapachona. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.33, n.4, p. 545-553, 2012.

FUCHS, F.D.; WANNAMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. *Farmacologia Clínica – Fundamentos da Terapêutica Racional*. 3ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2004, 401.

GAO, Y. et al. Acute skin barrier disruption with repeated tape stripping: An in vivo model for damage skin barrier. *Skin Research and Technology*, v. 19, n. 2, p. 162–168, 2013.

GETHIN, G. The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds UK*, v. 3, n. 3, p. 52–56, 2007.

GETHIN, G. et al. Current practice in the management of wound odour: An international survey. *International Journal of Nursing Studies*, v. 51, n. 6, p. 865–874, 2014.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. *Journal of Thermal Analysis Calorimetry*, v. 68, p. 335-357, 2002.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 11, p. 1152–1161, 2007.

GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10. ed. Rio Janeiro, Guanabara Koogan, 2003.

GROCOTT, P. A review of advances in fungating wound management since EWMA 1991. *European Wound Management Association Journal*, v. 2, n. 1, p. 21-24, 2002.

GROTH, L.; JØRGENSEN, A.; SERUP, J. Cutaneous microdialysis in the rat: Insertion trauma studied by ultrasound imaging. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 78, n. 1, p. 10–14, 1998.

HEILMANN, S. et al. A thermosensitive morphine-containing hydrogel for the treatment of large-scale skin wounds. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 444, n. 1–2, p. 96–102, 2013.

HERKENNE, C. et al. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 25, n. 1, p. 87–103, 2008a.

HERKENNE, C. et al. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 25, n. 1, p. 87–103, 2008b.

HOLMGAARD, R.; NIELSEN, J. B.; BENFELDT, E. Microdialysis sampling for investigations of bioavailability and bioequivalence of topically administered drugs: Current state and future perspectives. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 23, n. 5, p. 225–243, 2010.

HOFER, J.D.; OLSEN, B.A.; RICKARD, E.C. Is HPLC assay for drug substance a useful quality control attribute? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.44, p.906–913, 2007.

KATDARE, A.; CHAUBAL, M. V. *Excipient Development for Pharmaceutical, Biotechnology, and Drug Delivery Systems*. 1 Ed. CRC Press, 2006, 452 p.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic?? block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 82, n. 2–3, p. 189–212, 2002.

KANFER, I. Strategies for the Bioequivalence Assessment of Topical Dermatological Dosage Forms. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, v. 2, n. 5, p. 102–110, 2010.

KARJALAINEN, M.; AIRAKSINEN, S.; RATANEN, J.; AATONEN, J.; YLIRRUSI, J. Characterization of polymorphic solid-state changes using variable temperature X-ray Power diffraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, p. 29-32, 2005.

KATDARE, A.; CHAUBAL, M. V. *Excipient Development for Pharmaceutical, Biotechnology, and Drug Delivery Systems*. 1 Ed. CRC Press, 2006, 452 p.

KLANG, V. et al. In vitro vs. in vivo tape stripping: Validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 80, n. 3, p. 604–614, 2012.

KLANG, V. et al. Skin integrity testing and monitoring of in vitro tape stripping by capacitance-based sensor imaging. *Skin Research and Technology*, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2013.

LEAL, L. B. Pós-doutorado no Exterior. Novos métodos para avaliação da segurança e eficácia de fármacos e ingredientes cosméticos em sistemas micro e nanoemulsionados, Relatório de pesquisa CNPq, 2014.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 77, n. 5, p. 563–569, 2002.

LEITE, A. C. Feridas tumorais: cuidados de enfermagem. *Revista Científica do HCE*, v. 2, p. 36-40, 2007.

LEITE, A. C. L.; SANTOS, L.M.F.; MOREIRA, D.R.M.; BRONDANI, D.J. Synthesis and characterization of new amino acyl-4-thiazolidones. *Química nova*, v. 30, n. 2, 2007.

LIHONG, W. et al. Thermoresponsive ophthalmic poloxamer/tween/carbopol in situ gels of a poorly water-soluble drug fluconazole: preparation and in vitro-in vivo evaluation. *Drug development and industrial pharmacy*, v. 40, n. 35 C, p. 1402–10, 2014.

LIPSKY, B. A.; HOEY, C. Topical Antimicrobial Therapy for Treating Chronic Wounds. v. 49, p. 1541–1549, 2009.

LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; NORD, C. E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clinical Infectious Diseases*, v. 50, n. Suppl 1, p. 16–23, 2010.

LU, C. et al. Novel thermosensitive in situ gel based on poloxamer for uterus delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 77, p. 24–28, 2015.

LUND-NIELSEN, B. A randomized controlled intervention study – quantitative and qualitative findings. 2011. Tese de Doutorado, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tratamento E Controle De Feridas tumorais e úlceras por pressão no câncer avançado. p. 1–46, 2009.

MIRON, D. S. et al. In vitro and in vivo evaluation of three metronidazole topical products. *Pharmaceutical development and technology*, v. 19, n. 2, p. 194–9, 2014.

ONO, S. et al. Increased wound pH as an indicator of local wound infection in second degree burns. *Burns*, v. 41, n. 4, p. 820–824, 2015.

O'BRIEN, C. Malignant Wounds. *Canadian Family Physician*, v. 58, p. 273-274, 2012.

OLIVEIRA, M.C.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise Térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. *Química Nova*, v. 34, n. 7, p.1224-1230, 2011.

OSTROWSKI, A. et al. Skin barrier disruptions in tape stripped and allergic dermatitis models have no effect on dermal penetration and systemic distribution of AHAPS-functionalized silica nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 10, n. 7, p. 1571–1581, 2014.

PAUL, J. C.; PIEPER, B. A. Topical metronidazole for the treatment of wound odor: a review of the literature. *Ostomy/wound management*, v. 54, n. 3, p. 18-27-29, 2008.

PEREIRA, G. G. et al. Formulation and characterization of poloxamer 407®: Thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. *Química Nova*, v. 36, n. 8, p. 1121–1125, 2013.

PERCIVAL, S.; CUTTING, K. *Microbiology of wounds*. 1 Ed. Boca Raton: CRC Press, 2010, 404 p.

PLOCK, N.; KLOFT, C. Microdialysis - Theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 25, n. 1, p. 1–24, 2005.

POLETTI, N. A. A. P.; CALIRI, M. H. L.; SIMÃO, C. D. S. R.; JULIANI, K. B.; TÁCITO, V.E. Feridas malignas: uma revisão de literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, n. 3, p. 411-417, 2002.

PONTE, D.; FERREIRA, K.; COSTA, N. Controle do odor na ferida maligna. *Journal*

of tissue regeneration & Healing, p. 38 – 43, 2012.

PROBST, S.; ARBER, A.; FAITHFULL, S. Malignant fungating wounds: A survey of nurses' clinical practice in Switzerland. *European Journal of Oncology Nursing*, v. 13, n. 4, p. 295–298, 2009.

PROBST, S.; ARBER, A.; FAITHFULL, S. Malignant fungating wounds - The meaning of living in an unbounded body. *European Journal of Oncology Nursing*, v. 17, n. 1, p. 38–45, 2013.

RAMAKUTTY, S; RAMACHANDRA, E. Crystal growth by solvent evaporation and characterization of metronidazole. *Journal of Crystal Growth*, v. 351, p. 47-50, 2012.

RICCI, E. J. et al. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 17, n. 3, p. 161–167, 2002.

SAEHENG, S. et al. Correlation Study for the Dermatopharmacokinetics of Terbinafine Hydrochloride Topical Cream. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 39, n. April 2012, p. 1–6, 2012.

SCHMOLKA, I. R. Artificial Skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatments of burns. v. 6, p. 571–582, 1972.

SCHNETZ, E.; FARTASCH, M. Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier - A promising tool for future research? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 12, n. 3, p. 165–174, 2000.

SCHREML, S. et al. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 24, n. 4, p. 373–378, 2010.

SELZER, D. et al. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, n. 2, p. 278–294, 2013.

SHIN, S. C.; CHO, C. W. Physicochemical characterizations of piroxicam-poloxamer solid dispersion. *Pharmaceutical development and technology*, v. 2, n. 4, p. 403–407, 1997.

SHINKAI, N. et al. Microdialysis assessment of percutaneous penetration of ketoprofen after transdermal administration to hairless rats and domestic pigs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 78, n. 3, p. 415–421, 2011.

SHUKLA, C. et al. Applications of dermal microdialysis: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 24, n. 3, p. 259–269, 2014.

SINKO, P. J.; SINGH, Y. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer. 2011.

STORPIRTIS S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C. *Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009

STAHL, J. et al. The effect of a combination of 0.1% octenidine dihydrochloride and 2% 2-phenoxyethanol (octenisept??) on wound healing in pigs in vivo and its in vitro percutaneous permeation through intact and barrier disrupted porcine skin. *International Wound Journal*, v. 7, n. 1, p. 62–69, 2010.

TAKEUCHI, Y. et al. Effects of oleic acid/propylene glycol on rat abdominal stratum corneum: lipid extraction and appearance of propylene glycol in the dermis measured by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance (FT-IR/ATR) spectroscopy. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, v. 41, n. 8, p. 1434–1437, 1993.

TETTEY-AMLALO, R. N. O. et al. Application of dermal microdialysis for the evaluation of bioequivalence of a ketoprofen topical gel. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 36, n. 2–3, p. 219–225, 2009.

TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 19, n. 2, p. 106–121, 2006.

UR-REHMAN, T.; TAVELIN, S.; GR??BNER, G. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 409, n. 1–2, p. 19–29, 2011.

ZIP, C.M. Innovative use of topical metronidazole. *Dermatologic Clinics*, v. 28, n. 3, p. 525–534, 2010.

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD, C. S.; GUY, R. H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, n. 3, p. 453–466, 2008.

WOO, K. Y.; SIBBALD, R. G. Local wound care for malignant and palliative wounds. *Advances in skin & wound care*, v. 23, n. September, p. 417–428, 2010.

YAPAR, E. A.; INAL, Ö. Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-based copolymers for transdermal drug delivery: An overview. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 11, n. 5, p. 855–866, 2012.

United States Pharmacopoeia. 30th. ed.; Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2007.

Apêndice

APÊNDICES

APÊNDICE – A: DESENVOLVIMENTO DA FORMA FARMACÊUTICA PÓ CONTENDO METRONIDAZOL VEICULADO EM SACHÊS 500mg/g

A formulação sólida foi escolhida com base nas necessidades do Centro de Cuidados Paliativos de Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), onde através da prática clínica diária relata uma resposta consideravelmente maior do uso de comprimidos macerados sobre as lesões frente à formulação semi-sólida. Visto que além do controle do odor, a forma farmacêutica em pó contribui para a absorção do exsudato e o efeito tampão local, pois além de promover o controle microbiano in situ, esta forma em pó contribui na absorção dos gases exalados como metabólitos bacterianos.

METODOLOGIA

Obtenção das Formulações

O metronidazol sachê foi preparado, através da homogeneização do(s) IFA(s) e excipientes por trituração em gral e pistilo. Posteriormente, o pó foi submetido a tamisação em tamis malha 300 µm, acondicionado em sachês metálicos e estes selados. As formulações preparadas estão descritas na tabela abaixo (TABELA 1):

Tabela 1 - Composição e percentuais das formulações

Composição	F1	F 2	F 3	F 4	F5
Metronidazol	50%	50%	50%	50%	50%
Sulfadiazina de Prata	-	1%	-	1%	-
Óxido de Zinco	20%	20%	20%	20%	-
Estearato de Magnésio	2%	2%	2%	2%	2%
Povidona	-	-	-	-	3%
Amido de milho	-	-	-	-	13%
Hipromelose	-	-	-	-	4%
PEG 26.000	-	-	-	-	5%
Fosfato de Cálcio dibásicodihidratadoqs	-	-	-	-	3g
p					
Talco qsp	3 g	3 g	-	-	-
Celulose	-	-	3 g	3 g	-
Microcristalina qsp					

IFA: Insumo Farmacêutico ativo, F: Formulação, qsp: quantidade suficiente para.
 Fonte: Dados da pesquisa.

Avaliação das características organolépticas

A observação das características de formas farmacêuticas constitui uma primeira e simples análise para avaliar a qualidade de uma formulação. Alterações na forma, cor, odor podem muitas vezes ser indicativos de problemas de estabilidade físico-química ou microbiológica. Após a preparação das misturas de pós, as características organolépticas, quanto a aspecto e cor, foram avaliadas através da observação visual.

Teor

O ensaio de doseamento foi realizado segundo preconiza a F. BRAS (2010) para forma farmacêutica comprimidos de metronidazol. Segundo a monografia, deve-se pesar e pulverizar 20 comprimidos e em seguida, transferir para balão volumétrico 100 mL quantidade de pó equivalente a 0,2 de metronidazol. Como se trata de uma preparação já pulverizada, apenas essa última etapa foi efetuada e foi preparada uma solução contendo HCL 1% como solvente. A solução foi filtrada e obtidas diluições até a concentração de 0,002%. A solução padrão foi feita nas mesmas condições. Em seguida, as soluções foram submetidas à espectrofotometria no ultravioleta em espectrofotômetro Shimadzu Mini-UV utilizando como branco solução de HCL 1%.

Densidade aparente

A densidade aparente das formulações foi avaliada, segundo método descrito na USP, 2007. Em uma pipeta graduada de 25 mL, foram adicionadas 10 g de cada formulação e aferido o volume ocupado. O cálculo da densidade foi efetuado através da seguinte equação:

$$d = \frac{m}{v} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: d = densidade (g mL⁻¹), m = massa (g) e v = volume (mL).

Ângulo de repouso e Velocidade de escoamento

As análises do ângulo de repouso e velocidade de escoamento foram realizadas para o IFA MTZ e as formulações e efetuadas segundo preconiza a USP, 2007.

Para determinação do ângulo de repouso, deixou-se cair 10g dos pós através de um funil com 11,5 cm de diâmetro superior; 0,9 cm de diâmetro inferior e 7 cm a altura da haste, até a formação de um cone. Em seguida, a altura (h) e o diâmetro (2r) do cone foram aferidos com paquímetro e o ângulo de repouso calculado conforme a equação 2:

$$\text{tg}\alpha = \frac{h}{r} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde tg α = tangente de α, α = ângulo de repouso, h = altura do cone e r o raio do cone.

As características do fluxo de pós podem ser classificadas de acordo com a tabela abaixo (TABELA2):

Tabela 2– Característica do fluxo

Propriedade do fluxo	Ângulo de repouso (graus)
Fluxo excelente	≤ 30
Bom	Entre 31 e 40
Fluxo difícil	> 40

Fonte: USP, 2007

O tempo de escoamento foi aferido em segundos, considerando tempo infinito quando superior a 10 segundos.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Obtenção das Formulações

De acordo com a F. BRAS (2010), pós consistem em uma forma farmacêutica sólida que pode conter um ou mais insumos ativos secos, adicionados ou não de excipientes e com tamanho de partícula reduzido. Os pós são comumente empregados na administração oral ou tópica, com obrigatoriedade de esterilização das preparações destinadas aos cuidados de feridas ou pele lesionada. Segundo Lachman, Lieberman e Kaning, 2001, as principais variáveis para a obtenção de uma mistura homogênea de pós estão diretamente relacionadas com o grau de mistura, velocidade de escoamento, ângulo de repouso e velocidade de segregação.

As formulações F1, F2, F3, F4 e F5 (30g) foram preparadas através da mistura do (s) IFA(s) e excipientes em gral e pistilo. Posteriormente, as preparações foram tamisadas em malha 300 µm. Esta malha foi escolhida de acordo com as características de tamanho de partícula para administração tópica. Conforme a USP (2007), o tamanho recomendado deve ser no mínimo 150 µm, para assegurar a fluidez do pó. Além disso, pós muito finos podem causar irritação das vias áreas superiores devendo-se, portanto, levar em conta o estado debilitado do paciente.

Neste projeto, para o delineamento inicial das formulações alguns conceitos foram levados em consideração:

- Escolha de dosagem: A escolha da dosagem 50%, ou 500 mg/g, foi admitida com base na indicação do INCA e nos dados de “número de comprimidos utilizados x área da ferida” disponibilizados pelo setor de Cuidados Paliativos do IMIP. É comum a utilização clínica de comprimidos de Flagyl 250 mg/g, cujo cada comprimido pesa 0,5g.
- Associação a Sulfadizina de prata: Na literatura, os estudos off-label citados anteriormente, relatam a eficácia do metronidazol no controle de odor das feridas oncológicas. É sabido que há o predomínio de bactérias anaeróbias, alvo do MTZ, no sítio dessas feridas, principalmente nas mais profundas (PERCIVAL, CUTTING,

2010). Todavia, deve-se considerar que a microbiota da pele e das feridas de um modo geral, compreendem também bactérias aeróbias e leveduras (PERCIVAL, CUTTING, 2010). Dessa forma, optou-se pela associação da sulfadiazina de prata devido ao amplo espectro apresentado e a constatação do uso desse fármaco no tratamento de lesões cutâneas profundas, como as feridas oncológicas e queimaduras extensas (ATIYEH et al, 2007; LIPSKY, HOEY, 2009; PROBST, ARBER, FAITHFULL, 2009; SEZER, CEVHER, 2011).

- Escolha dos excipientes: A escolha dos excipientes foi feita com base nas características de fluxo, tamanho de partícula, capacidade de absorção de umidade, possibilidade de esterilização, segurança e toxicidade.

- Escolha da quantidade dispensada por sachês e embalagem: A proposta da dispensação de 3 g de pó por sachê está fundamentada na relação número de comprimidos utilizados x área da ferida citada anteriormente. A embalagem sachê foi preferida para que se possam dispensar doses unitárias do pó.

Avaliação das características organolépticas

Todas as formulações obtidas apresentaram-se visualmente, a olho nu, como um pó fino, branco e inodoro.

Teor

Todas as formulações desenvolvidas foram consideradas aprovadas quanto a avaliação de teor por e uniformidade de conteúdo.

Densidade aparente

Os valores de densidade das formulações estão contidos na tabela abaixo (TABELA 3):

Tabela 3– Densidade aparente das formulações

Lote	Densidade (g mL⁻¹)
F1	0,625
F2	0,625
F3	0,741
F4	0,800
F5	0,783

Fonte: dados da pesquisa.

De acordo com Aulton (2005) a densidade aparente dos pós é variável e depende da forma de empacotamento e da porosidade do pó contido em um volume do pó. A densidade aparente do pó é sempre inferior à densidade real, pois o pó pode apresentar espaços vazios ou poros entre as partículas. Além disso, a previsão da densidade aparente de pós é importante na predição do volume ocupado a fins de empacotamento (DASH, SINGH, TOLMAN, 2014).

Ângulo de repouso e velocidade de escoamento

O ângulo de repouso é método que define as propriedades de fluxo dos pós, e está intimamente relacionado com a fricção entre as partículas ou a resistência ao movimento dessas (USP, 2007).

É requerido que os pós tenham fluxo livre em função da uniformidade de peso das doses unitárias, garantia de mistura homogênea, alimentação de maquinário envolvido no processo de mistura e empacotamento (AULTON, 2005). Dessa forma, a avaliação das características de fluxo é imprescindível no estudo de formulação de pós e controle de qualidade (AIACHE, BEYSSAC, 2007)

As formulações F1 e F2 apresentaram tempo infinito de escoamento. Todavia, as preparações F3, F4 e F5 apresentaram o mesmo ângulo de repouso, 24 °, ou seja, excelente fluxo. A principal diferença entre essas formulações é o diluente utilizado, talco para F1 e F2 e celulose microcristalina 102, para F3 e F4. Inicialmente o talco foi considerado na pré-formulação por se tratar de um pó mineral, amplamente utilizado em preparações em pó para uso tópico, passível de esterilização e devido a sua boa fluidez ($\alpha = 35^\circ$) (ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009; FURMAN, SILVEIRA, DIAS, 2012). Todavia, a celulose microcristalina, mesmo constituída por glicose e, portanto, possível substrato para as bactérias, apresenta excelentes propriedades de fluxo e biocompatibilidade com o organismo humano (ROWE, SHESKEY, QUINN,

2009). A celulose também possui capacidade de absorção de umidade, o que auxiliaria na retenção do exsudato da ferida conforme é observado em géis de derivados de celulose disponíveis (SANNINO, DEMITRI, MADAHIELE, 2009).

A formulação F5 foi preparada em observância aos os constituintes presentes no Flagyl®comprimidos a partir da pesquisa e planejamento da proporção de cada excipiente. Essa formulação foi proposta visando a veiculação da mesma em sachês e para atender aos critérios de esterilidade para uso sobre as feridas oncológicas face aos comprimidos macerados utilizados de forma off-label, as que possuem eficácia clínica comprovada.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, o delineamento da forma farmacêutica sachê foi importante, quanto a avaliação das características físicas e a fluidez do pó, para o direcionamento de um produto final que atenda aos critérios de controle de qualidade e, impreterivelmente, seja seguro e eficaz no controle de odor das feridas oncológicas.No que concerne a este estudo piloto, considerando o uso off-label do Flagyl®, foi selecionada a formulação F5 contendo como excipientes o amido de milho, estearato de magnésio, povidona K30, hipromelose, PEG 26.000, fosfato de cálcio dibásicodihidratado.

REFERÊNCIAS

- AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- ATIEH, B. S.; COSTAGLIOLA, M.; HAYEK, S. N.; DIBO, S. A. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. Burns, v. 33, p. 139-148, 2007.
- DASH, A. K.; SINGH, S.; TOLMAN, J. Pharmaceutics Basic Principles and Application to Pharmacy Practice.1 ed. San Diego: Elsevier, 2014.
- FURMAN, A. C.; SILVEIRA, M. F.; DIAS, I. L. T. Desenvolvimento e avaliação física de talco para os pés com óleo de melaleuca (MelaleucaalternifoliaCheel). BioFarRevista de Biologia e Farmácia, v. 7, n. 1, p. 62-71, 2012.
- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. Teoria e PráticanalIndústriaFarmacêutica. V. 1. Lisboa: FundaçãoCalousteGulbenkian, 2001.

LIPSKY, B. A.; HOEY, C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clinical Practice*, v. 49, p. 1541-1549, 2009.

PERCIVAL, S.; CUTTING, K. *Microbiology of wounds*. 1 Ed. Boca Raton: CRC Press, 2010, 404 p.

Pharmacopeia Brasileira. Parte I. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

PROBST, S.; ARBER, A.; FAITHFULL, S. Malignant fungating wounds: a survey of nurses' clinical practice in Switzerland. *European Journal of Oncology Nursing*, v. 13, p. 295-298, 2009.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6 ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2009.

SANNINO, A.; CHRISTIAN, D.; MADAGHIELE, M. Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications. *Materials*, v. 2, p. 353-373, 2009.

SEZER, A. D.; CEVHER, E. Biopolymers as wounds healing materials: challenges and new strategies. In: PIGNATELLO, R. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. Rijeka: In Tech, 2011.

United States Pharmacopoeia. 30th. ed.; Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2007.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aceitação do artigo “Metronidazole thermogel improves retention and decreases permeation through the skin” publicado na revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences



DECLARATION

We declare the manuscript: “**Metronidazole thermogel improves retention and decreases permeation through the skin**”, authors Elayne Karine Souto de Melo, Thalita Pedon de Araujo, José Wellithom Viturino da Silva, Stephanye Carolyne Christino Chagas, Danilo César Galindo Bedor, Davi Pereira de Santana and Leila Bastos Leal, has been accepted for publication in *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. It will be published in one of the next edited issues.

November 28th, 2016

Daniela Pires
Editorial Board

ANEXO B – Artigo “Metronidazole thermogel improves retention and decreases permeation through the skin” aceito na revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

Metronidazole thermogel improves retention and decreases permeation through the skin

Elayne Karine Souto de Melo, Thalita Pedon de Araujo, José Wellithom Viturino da Silva, Stephanye Carlyne Christino Chagas, Danilo César Galindo Bedor, Davi Pereira de Santana, Leila Bastos Leal*

Center of Cosmetic and Pharmaceutical Development, NUDFAC, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brazil

*Correspondence:

Leila Bastos Leal

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético - NUDFAC

Avenida Professor Arthur de Sá, s/n - Cidade Universitária

50740-520 - Recife - PE, Brasil

Fone: + 55 (81) 3302.6594 Fone/Fax: + 55 (81) 3302.6590

E-mail: leila.leal@nudfac.com.br

Metronidazole (MTZ) is widely used as the standard antibiotic for the treatment of rosacea and, more recently, is being used off label in Brazilian hospitals for the treatment of wounds. Following oral administration, minimal amounts of active agent reaches the skin and side effects are strongly induced. Consequently, MTZ is currently being applied topically in order to improve the therapeutic efficacy with reduced side effects, with Rozex[®] (RZ) (an MTZ gelled formulation) being the only marketed product. This study examined whether the use of MTZ 0.75 % from thermogel formulations could improve drug retention and reduce dermal exposure compared to that by Rozex[®]. Following a 21 h permeation study, the highest total amount of MTZ permeated through the rat healthy and disturbed skin was seen with Rozex[®], but similar to all formulations regardless of the skin condition. On the other hand, the amount retained in the epidermis/dermis was larger for thermogel formulations; at least 4 fold that of Rozex[®], when the stratum corneum was present as a barrier. In conclusion, thermogel formulations can

be favorable alternatives to Rozex[®] for the topical application of MTZ with improved efficacy and reduced side effects.

Uniterms: Metronidazole, Poloxamer 407, Rosacea, Dermatopharmacokinetic.

O metronidazol (MTZ) é o antibiótico de escolha no tratamento da rosácea e, mais recentemente, tem sido utilizado nos centros de cuidados paliativos do Brasil de forma off-label no tratamento de feridas crônicas. Após administração oral, uma quantidade mínima de fármaco alcança a pele e provoca efeitos colaterais consideráveis. Consequentemente, o MTZ tem sido administrado topicamente com a finalidade de melhorar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos adversos através do uso da especialidade farmacêutica Rozex[®] (RZ) (formulação gelificada contendo MTZ). Este estudo teve por objetivo avaliar se o MTZ 0.75% incorporado em formulações termoreversíveis poderia aumentar a retenção cutânea e diminuir a exposição dérmica comparada ao Rozex[®]. Na avaliação da permeação cutânea, após 21 h, a quantidade de MTZ permeada através da pele de rato foi maior a partir do Rozex[®] na pele íntegra e na pele lesionada, porém similar a partir de todas as formulações quando comparados os modelos de pele. De modo contrário, a quantidade de MTZ retida na epiderme/derme foi 4 vezes superior para os termogéis em comparação ao Rozex[®], quando o estrato córneo apresentava-se como barreira. Diante disso, as formulações termoreversíveis podem ser consideradas uma alternativa ao Rozex[®], para a aplicação tópica do MTZ com melhora da eficácia e redução dos efeitos adversos.

Unitermos: Metronidazol, Poloxamer 407, Rosacea, Dermatofarmacocinética.

INTRODUCTION

Metronidazole (MTZ, 1-(β -hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole), a synthetic nitroimidazole derivative, is a known antiprotozoal and antibacterial agent. Despite 50 years of clinical use, MTZ is still considered the standard antibiotic for the treatment of anaerobic infections (Freeman; Klutman; Lamp, 1997; Löfmark; Edlund; Nord, 2010). This drug is also widely used for the treatment of rosacea, a chronic skin condition that can occur at any age but is most commonly diagnosed in women between 30 and 50 years of age (Fuller; Martin, 2012; Jelvehgari; Montazam, 2011). Meanwhile, MTZ is being used off label in Brazilian hospitals for the treatment of wounds. Following oral administration of MTZ, minimal amounts of active agent reaches the skin and side effects are strongly induced (Yu et al., 2014). Consequently,

MTZ is currently being applied topically in order to improve the therapeutic efficacy with reduced side effects of the drug, with Rosex[®] (RZ) (an MTZ gelled formulation) being the only marketed product (Altinyazar et al., 2005).

The skin penetration of drugs is a complex process usually limited by the stratum corneum(SC) (Herkenne et al., 2008; Menon, Cleary, Lane, 2012). According to Braddy et al., (2015) "often, even when a topical dermatological drug product is systemically absorbed, there is no established link between the concentration of the drug in the systemic circulation and the therapeutic effect". Thus, for the evaluation of topical drug products, in addition to the *in vitro* release test and *in vitro* permeation study, widely used methodologies include the *in vivo* dermal microdialysis (DMD) and dermatopharmacokinetic (DPK) approaches. The DPK procedure (*in vivo* or *in vitro*), involves measuring drug levels in the layers of SC as a function of time post-application and post-removal of the product by a tape stripping procedure (Herkenne et al., 2006; N'Dri-Stempfer et al., 2008).

Taking this into consideration, the aim of this work was to develop MTZ topical thermogel products intended to decrease penetration and increase MTZ retention in disturbed or healthy skin.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Metronidazole 0.75% gel (Rozex[®]) was obtained from Galderma (Alby-sur-Chéran, France). For the tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis, metronidazole D4 was used as an internal standard (generously provided byUMR-S1070 INSERM, Poitiers, France). All chemicals used were of analytical grade and solvents were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade.

Solubility study

For pre-formulation study, the solubility of MTZ was determined in different solvents and systems: water, propylene glycol (PG), poloxamer 407 (P407) gel, PG/water (1:10, v/v), and PG/P407 gel (1:10, v/v). An excess amount of metronidazole was added to 5mL of each medium and the suspensions were incubated in a shaker at 25 °C for 72 h. After this period, the

supernatant solutions were centrifuged at $605 \times g$ for 30 min. Subsequently, the solutions were filtered and the concentration determined by HPLC-UV.

Topical formulations development

MTZ 0.75% thermogels with and without PG 10%, F11 and F12 respectively, were prepared by poloxamer dispersion (15%) using an adjustment of the cold method (Schmolka, 1972). First, MTZ, methylparaben (0.1%), propylparaben (0.05%), and disodium EDTA (0.1%) were dissolved in water at 75 °C under magnetic stirring, with the exception of F11 (MTZ dissolved in PG). Next, the magnetic stirring was stopped and the P407 was added at 25 °C. The formulations were kept at 4 °C until clean solutions were obtained.

Rheological analysis

For the rheological behavior evaluation, a RI:2:M-H Rheology International viscometer (Rheology International Shannon, Shannon, Ireland) was used. Measurements of dynamic viscosity (η) were carried out at 37 °C (normal body temperature) for each formulation (15g per sample), at shear rates (γ) between 2 and 200 s^{-1} (Ricci et al., 2002, Ricci et al., 2005).

Sol-gel transition temperature

The sol-gel transition temperature was measured by a concentric cylinder rotational rheometer (Anton Paar MCR 500, Graz, Austria), using Rheoplus[®] software (v. 3.40, Anton Paar, Graz, Austria) to collect and analyze data.

The temperature of the thermogels was increased from 20 °C to 45 °C at a heating rate of 1.0°C/min; the storage modulus (G') and the loss modulus (G'') were obtained. A graph of G' and G'' versus temperature was plotted and the temperature transition was defined as where the points of G' and G'' overlapped on the curve (Jiang et al., 2016).

Another technique used to determine the sol-gel transition temperature was the visual method. One gram of each formulation was placed in a respective glass tube and they were immersed in a water bath simultaneously with a separate glass tube containing 1.0mL of water. A thermometer was placed in the tube with water. Slowly, the temperature of the water bath was increased and at each degree of variation the glass tube was tipped to an angle of 90°. The gelation temperature (t_l) was noted when the solution in the former stopped flowing at 90°.

Next, the temperature of the water bath was decreased and the temperature (t_2) at which the gel flowed again was determined. The sol-gel transition temperature was calculated by the mean $\pm$ S.D. of t_1 and t_2 (Ur-Rehman, Tavelin, Gröbner, 2011).

***In vitro* permeation study and Dermatopharmacokinetic evaluation**

The *in vitro* amount of MTZ permeated through rat skin, healthy or disturbed by tape stripping, was evaluated using Franz-type diffusion cells (Vision[®] Microette automated diffusion test system, Chatsworth, USA). The rat skin was obtained by excision after euthanasia with a lethal dose of isoflurane and posteriorly frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. This phase of the work was carried out in accordance with Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Pernambuco under agreement n. 23076.050654/2015-91. For the disturbed skin, stratum corneum was removed following excision using 30 adhesive tapes (Scotch Book Tape 845, 3M, St. Paul, MN). For the experiments, the skin was thawed at room temperature and placed on a donor chamber (diffusion area of 1.77 cm^2). Approximately 166 mg of each formulation (corresponding to 0.70 mg/cm^2 of MTZ) was applied to the skin. The receiver chamber (volume of 6 mL) was filled with a phosphate buffer solution (pH 7.4), placed in a circulation water bath ($36\text{ }^{\circ}\text{C}$), and agitated in a magnetic stirrer (300 rpm). Aliquots (1.0 mL) were withdrawn at appropriate time intervals (between 1.0 h and 21 h). They were immediately replaced with the same volume of fresh receptor. The collected samples were analyzed at the end of the experiment (21 h) by LC-MS/MS. MTZ concentration in the SC was determined by sequential removal of the outer skin layer by tape stripping using 30 strips one-by-one (Scotch Book Tape, 3M, St. Paul, MN) followed by transepidermal water loss (TEWL) evaluation. Subsequently, the MTZ was extracted. To evaluate the MTZ amount retained in the rest of the epidermis and dermis (retention samples), the remaining skin was divided into small fractions and MTZ was extracted. Acetonitrile (1.0 mL) was added to each tube containing skin pieces or tapes. Next, the tubes were shaken for 6 h for MTZ extraction and analyzed by HPLC-UV.

Sample analysis (DPK and retention samples)

Determination of MTZ was performed by HPLC-UV. The LC system employed was a Shimadzu High Performance Liquid Chromatography (Shimadzu, Kyoto, Japan) with the UV detector set at 320 nm. Reversed-phase chromatography was performed on a C18 column ($5\text{ }\mu\text{m}$, $150 \times 4.60\text{ mm ID}$; Shimadzu, Kyoto, Japan), and a Gemini[®] C18 pre-column ($5\text{ }\mu\text{m}$, 4×3

mm ID; Phenomenex, Torrance, USA) at 35 °C. The mobile phase was a binary mixture of acetonitrile/monobasic sodium phosphate buffer 20 mM and pH 3.0 (12:88) at a flow rate of 1.0 mL/min and injection volume of 20 µL. This procedure was validated previously (Araújo, 2016).

Sample analysis (Permeation samples)

Determination of MTZ in permeation samples was performed by liquid chromatography coupled with the tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method adapted from Dubreuil (2005) by UMR-S1070 INSERM (Poitiers, France). Reversed-phase chromatography was performed on a C18 XbridgeTMBEH300 column (5 µm, 150 x 2.1 mm ID; Waters, St-Quentin en Yvelines, France). The isocratic mobile phase used was a mixture of acetonitrile/water/formic acid (25:75:0.1, v/v/v) at a flow rate of 0.16 mL/min. The Shimadzu LC System was connected to a SCIEX API 3000 MS/MS System operating in the turbo ion spray positive mode. The ions monitored in the multiple reaction monitoring mode (MRM) were m/z 172.1 (precursor ion: $[M+H]^+$) to m/z 128 (or 82) production for MTZ and m/z 176.1 (precursor ion: $[M+H]^+$) to m/z 128 (or 82) production for MTZ D4 (internal standard). Five microliters of permeation samples, standards, or controls were diluted with 45 µL of internal standard (0.05 ng/µL in ammonium formate 10 mM); 20 µL of this mixture was injected.

RESULTS AND DISCUSSION

Obtainment of F11 and F12 gels

MTZ thermogels (F11 and F12) were developed to facilitate drug administration on the skin and in wounds because they are in liquid form at room temperature. Following the incorporation of MTZ into the vehicle and dissolution of P407 by the cold method, odorless and colorless solutions (F11 and F12 formulations) were obtained at cool and room temperatures. Thermogels are free flowing liquid systems at room temperature, become gel at the phase transition temperature, and act to sustain drug release at physiological temperature (Chen et al., 2013; Dumortier et al., 2006).

P407 is an amphiphilic copolymer system consisting of ethylene oxide (PEO, hydrophilic) and propylene oxide (PPO, hydrophobic) organized in a triblock structure that promotes the obtainment of systems with thermo-reversible properties (Dumortier et al., 2006). Systems

comprised of poloxamer polymers offer advantages such as sustained drug delivery, local and site-specific action, and comfort to patients (Lu et al., 2015). Poloxamer formulations have been used for topical, intranasal, ocular, and vaginal formulations, as well as for wound application (He et al., 2011; Heilmann et al., 2013; Jansen et al., 2013; Li et al., 2014; Rossi et al., 2013). This polymer presents biological compatibility, non-toxicity, good tolerability, and biodegradable properties (Lu et al., 2015).

Solubility study

Both formulations were developed with P407 15%. Propylene glycol was added to the F11 gel in order to increase the solubility of MTZ in the system. Among the polyvalent alcohols, PG is the most frequently used co-solvent in products for topical application (Trommer, Neubert, 2006; Patel, Welsh, Baker, 1985). Table II shows the solubility values of MTZ at 36 °C in different media. The results show high MTZ solubility in the PG compared to the other media.

TABLE II - Solubility of metronidazole at 36 °C

Solvents	mg/mL $\pm$ S.D.
Water	9.89 $\pm$ 0.64
PG	38.90 $\pm$ 11.47
P407 gel	11.75 $\pm$ 1.13
PG/water (1:10, v/v)	17.04 $\pm$ 2.25
PG/P407 (1:10, v/v)	14.97 $\pm$ 2.35

Sol-gel transition temperature

The measure of sol-gel transition temperature is one of the main parameters to be evaluated in thermoreversible systems. The gelation of the poloxamer system occurs due to the geometric organization (packing) of the micelles formed by the dehydration of the PPO blocks, which is dependent on the temperature and critical micelle concentration (Cabana, Ait-Kadi, Juhasz, 1997; Kabanov, Batrakova, Alakhov, 2002).

Figure 1 and figure 2 show the variation of the rheological parameters, G' and G'' , of formulations F11 and F12 as a function of temperature. The temperature at which the transition

from sol to gel phase occurs was verified to be 40.9 °C for F11 and 40.6 °C for F12. This shows that the PG alters discreetly the sol-gel transition temperature between F11 and F12.

Using the visual method, the values obtained were $36.5\text{ °C} \pm 1.8$ for F11 and $34.5\text{ °C} \pm 1.0$ for F12. The visual method also verifies that the presence of PG in the F11 formulation increased the sol-gel transition temperature compared to that of F12 ($P \leq 0.05$). Employing rheological techniques are sensible for this analysis; however, the visual method is rapid, simple, and less costly for routine laboratory measurements.

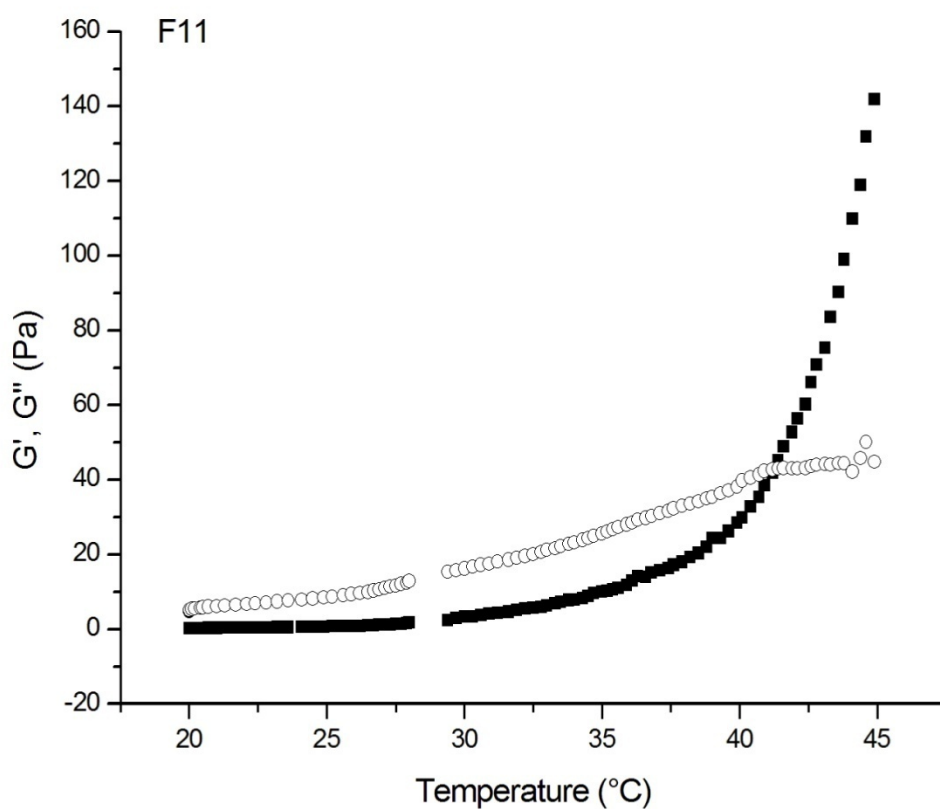


FIGURE 1 -Sol-gel transition temperature measurements for F11 gel.

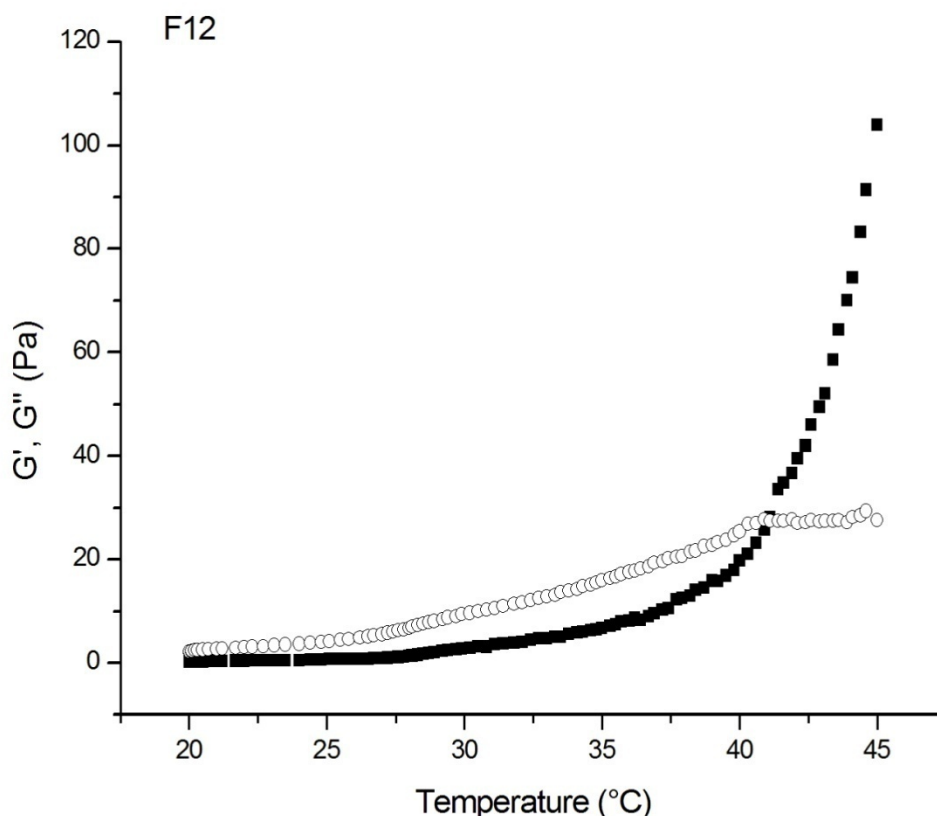


FIGURE 2 - Sol-gel transition temperature measurements for F12 gel.

Figure 3 shows a lower viscosity for F12 than for F11 and Rozex[®] at body temperature (~37 °C). The viscosities of F11 and Rozex[®] were similar. Through this data, we also determined the pseudoplastic behavior of the formulations observed; the viscosity decreases as the shear rate increases (Pereira et al., 2013; Ricci et al., 2002). It is worth adding that, in general, formulations containing P407 gels offer the advantage of thixotropic behavior. This is a desirable characteristic when the intention is to facilitate the administration and spreadability in open wounds in order to avoid friction of the gel, thus reducing the suffering of the patient (Ricci, 2002; Pereira et al, 2013). The viscosity values apparent at 20 s⁻¹ for the thermosensitive gels were 4.4 Pa ± 1.2 for the F12 gel, 6.5 Pa ± 1.0 for the F11 gel and 7.2 Pa ± 0.6 for Rozex[®]. Some products, when added to Poloxamer gels, have the capacity to modify their viscosity (Dumortier, 2006). The PG, included in F11 formulation, helps the dehydration of PPO blocks, making the formation of micelles easier. This stage precedes the gel formation of the system. Besides this, regarding Ivanova, 2002, the presence of the PG decreases the lattice spacing, leading to the formation of more compact systems, culminating in the increase of the apparent

viscosity of the F11 system in relation to F12 (Ivanova,Lindman, Alexandridis, 2002; Miller,Drabik, 1984;Pereira et al, 2013).

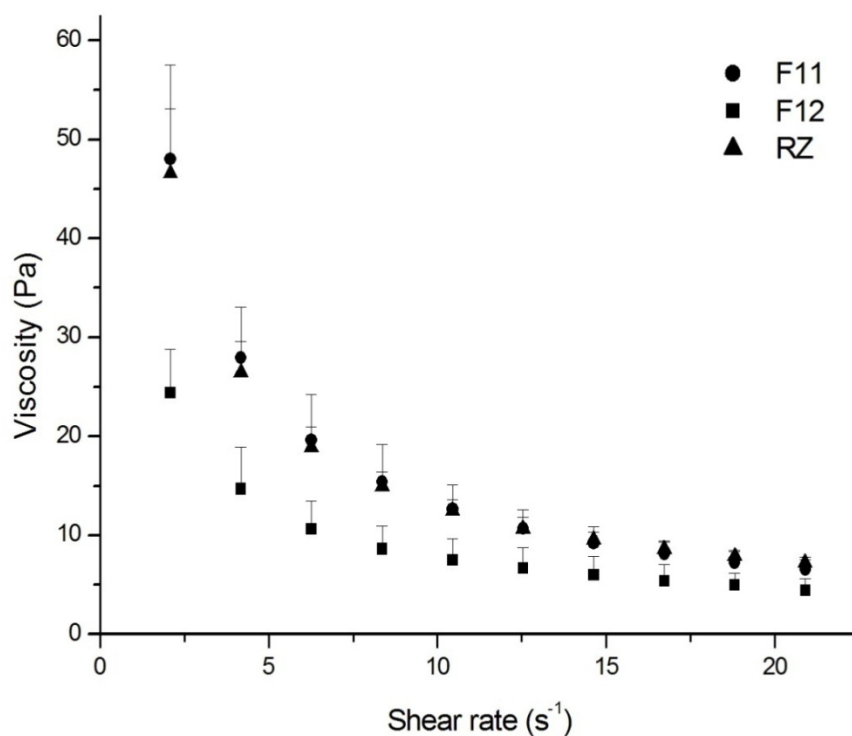


FIGURE 3 - Viscosity *versus* shear rate at 37 °C of F11 gel, F12 gel, and RZ.

***In vitro* permeation study and DPK evaluation**

Figure 4 shows the total amount ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of MTZ in SC from each formulation after 21 h. The average amount of MTZ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retained by the epidermis/dermis from healthy and disturbed skin is shown in Figure 5 and 6.

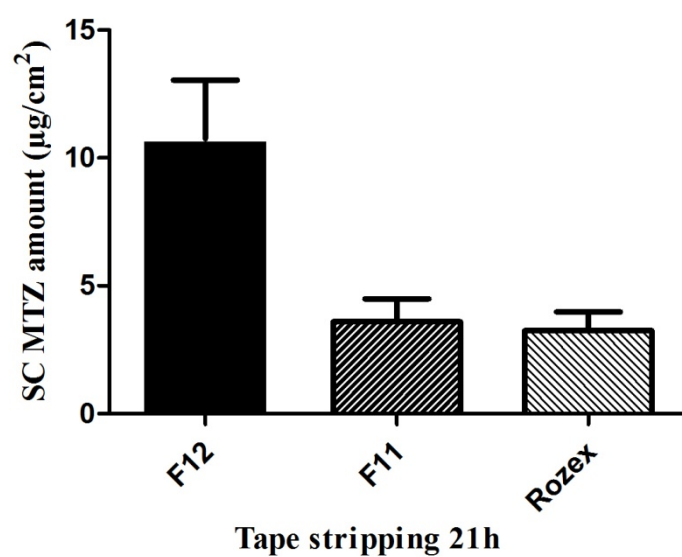


FIGURE 4 -Metronidazole amount in the stratum corneum after 21 h

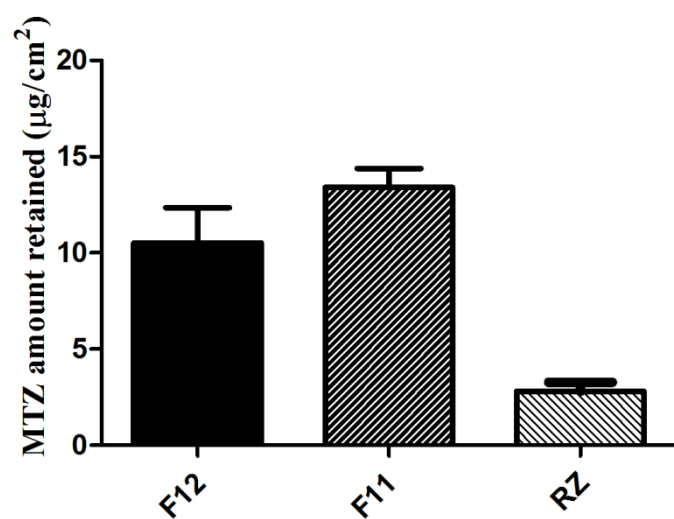


FIGURE 5 - Metronidazole amount retained in epidermis/dermis after 21 h - Healthy skin.

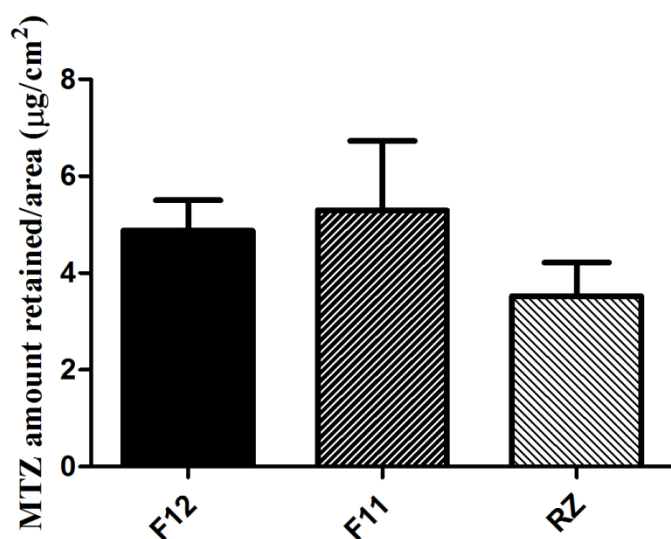


FIGURE 6 - Metronidazole amount retained in epidermis/dermis after 21 h - Disturbed skin.

In this study (Figure 4), the statistical evaluation (test F) of the amount of MTZ in SC showed that the F11 compared to RZ, presented statistically similar results ($P \geq 0.05$). On the other hand, in the comparison between F12 and F11 and F12 and RZ statistically significant differences were verified ($P \leq 0.05$). In other words, a larger quantity of MTZ remained in the SC after the application of F12. The F11 and RZ formulations contain PG. According to the literature, the PG may modify the barrier properties in the SC, promoting the passage of the active drug into the skin (Patel, Welsh, Baker, 1985; Trommer, Neubert, 2006). At the same time, as a humectant, PG increases stratum corneum hydration, resulting in an increase in the drug penetration rate across the skin (Patel, Welsh, Baker, 1985).

The retention of MTZ in the epidermis/dermis in healthy skin was statistically similar for F11 vs F12 ($P \geq 0.05$) but different for RZ ($P \leq 0.05$) (Figure 5). However, the evaluation in disturbed skin (Figure 6) showed that, comparing all formulations, the retention of MTZ was similar ($P \geq 0.05$). This data demonstrates the SC barrier capacity in relation to the permeation of drugs (Bolzinger et al, 2012).

A graph of the accumulated amount of MTZ permeated through skin *versus* time for healthy skin (Figure 7) and disturbed skin was plotted (Figure 8), and the permeation parameters were calculated (Table III). Figure 7 shows similar permeation of MTZ through healthy rat skin for F11 and F12 formulations ($P \leq 0.05$) and higher permeation for Rozex[®]. The average amount of MTZ permeated (Q_{21h}) and the flux (J) after 21 h for Rozex[®] in healthy skin was approximately 2 and 4-fold higher than for F11 and F12 thermogels, respectively (Table III).

As cited earlier, "poloxamer solutions have clearly indicated a micellar mode of association" (Yapar, Inal, 2012). "An important property of these aggregates is their ability to incorporate

hydrophobic substances that are usually insoluble or poorly soluble (as MTZ) in aqueous or hydrophilic environment, enhancing their solubility" (Bonacusina et al, 2008). A study carried out by Freitas et al, 2006 demonstrated that nimesulid salt, being more hydrophilic, is supposedly located on the outside of the P407 micelles. The MTZ, due to its physicochemical characteristics, is probably inserted into the micelles, leading to a smaller release of the same in poloxamer gels compared with carbopol[®] gel.

When comparing statistically the MTZ permeation after 21h between healthy and damaged skin, no statistically significant difference was verified between the amount permeated, the flux and the Kp for the three formulations ($P \geq 0.05$). That is, neither the presence of PG nor the use of different polymers (P-407 e carbopol[®]) in the concentration used were capable of influencing the permeation of the drug.

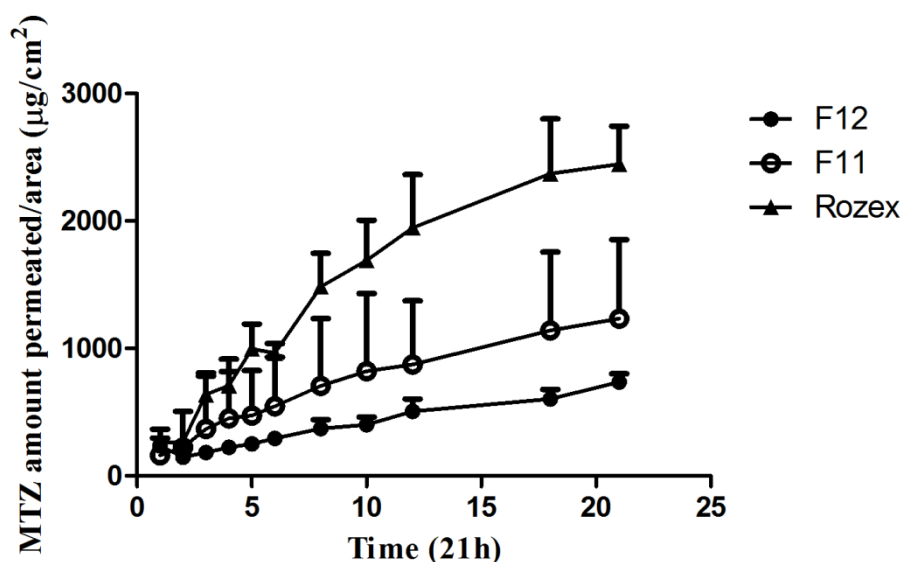


FIGURE 7 - Metronidazole amount permeated after 21 h - Healthy skin

TABLE III - Permeation parameters of metronidazole in formulations

Formulations	Healthy skin			Disturbed skin		
	F11	F12	RZ	F11	F12	RZ
$Q_{21h}^a \times 10^2$ (µg) ±	2.19 ±	1.30 ±	4.33 ±	4.64 ±	5.57 ±	9.02 ±
S.D.	1.09	0.27	1.28	1.03	1.44	1.27
J^b (µg/cm ² /h) ±	5.31 ±	2.81 ±	14.10 ±	10.20 ±	13.50 ±	16.80 ±
S.D.	2.43	0.60	4.83	2.34	3.26	2.57

$Kp^c \times 10^{-6} \pm \text{S.D.}$	0.70	± 0.37	± 1.88	± 1.36	± 1.80	± 2.24	$\pm$
	0.32	0.07	0.64	0.31	0.43	0.34	

Results are expressed as mean $\pm$ S.D. ^a Q_{21h} : MTZ total in medium receptor after 21 h. ^b J : MTZ flux after 21 h. ^c Kp : permeability coefficient.

An *in vitro* permeation study of MTZ through rat skin was carried out in two models: healthy skin (Figure 7) and disturbed skin (Figure 8). For the disturbed skin, stratum corneum was removed by the tape stripping method to mimic a wound. To ensure that the entire SC was removed, the TEWL was measured (Araújo, 2016). The rat skin integrity was evaluated prior to beginning the experiments. The receptor solution was analyzed at different times up to 21h and replaced with fresh solution. Next, the SC was analyzed using the DPK approach (N'Dri-Stempfer, 2008; Araújo, 2016) and the retention of MTZ in the epidermis and dermis was evaluated.

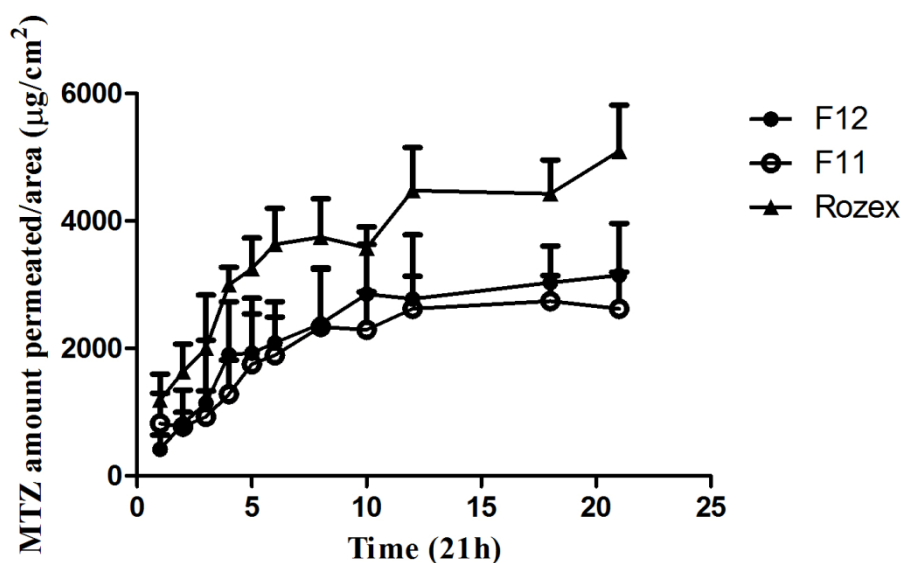


FIGURE 8 - Metronidazole amount permeated after 21 h - Disturbed skin

It is notable that the presence of PG was an important factor for improving the MTZ transport through the SC. However, this excipient was not efficient enough to increase the permeation through the whole epidermis and dermis. At the same time, the MTZ amount retained in the epidermis/dermis was larger for F11 and F12, at least 4-fold that of Rozex[®], when the SC was present as a barrier. Clearly, the presence of the P407 was fundamental in increasing the retention of MTZ between epidermis and dermis, thus reducing the quantity of MTZ permeated.

CONCLUSION

Considering these results, we conclude that the MTZ thermogel topical formulation can be a good alternative to improve the application and the efficacy, and to reduce the side effects due to the final characteristics of the product, to the greater retention and to the lower level of MTZ penetration through the skin. However, in order to prove this hypothesis, a clinical trial is in progress at the Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Recife/PE (Brazil), and a microdialysis study in rats is being conducted for *in vitro/in vivo* correlation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), and NUDFAC/ FECDA/ UFPE (Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético/ Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade, Brazil) for funding this research.

REFERENCES

- ALTINYAZAR, H. C. et al. Adapalene vs. metronidazole gel for the treatment of rosacea. **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 3, p. 252–255, 2005.
- ARAUJO, T. P. **Bioequivalência tópica de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK)**. Recife: UFPE. 99 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- BOLZINGER, M. A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 156-165, 2012.
- BONACUCINA, G. et al. Characterization of micellar systems by the use of acoustic spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 6, p. 2217-2227, 2008.

BRADDY, A.C. et al. Survey of international regulatory bioequivalence recommendations for approval of generic topical dermatological drug products. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 17, n. 1, p. 121–133, 2015.

CABANA, A.; AIT-KADI, A.; JUHASZ, J. Study of the gelation process of polyethylene oxide(a) polypropylene oxide(b) polyethylene oxide(a) copolymer (Poloxamer 407) aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 190, n. 190, p. 307–312, 1997.

CHEN, J. et al. Mechanical, rheological and release behaviors of a poloxamer 407/poloxamer 188/carbopol 940 thermosensitive composite hydrogel. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12415–12425, 2013.

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.

FREEMAN, C. D.; KLUTMAN, N. E.; LAMP, K. C. Metronidazole. A therapeutic review and update. **Drugs**, v. 54, n. 5, p. 679–708, 1997.

FREITAS, M. N. et. al. Rheological characterization of Poloxamer 407 nimesulide gels. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 113–118, 2006.

FULLER, D.; MARTIN, S. Rosacea. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 57, n. 4, p. 403–409, 2012.

HE, Z. et al. Doxycycline and hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex in poloxamer thermal sensitive hydrogel for ophthalmic delivery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 1, n. 4, p. 254–260, 2011.

HEILMANN, S. et al. A thermosensitive morphine-containing hydrogel for the treatment of large-scale skin wounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 444, n. 1–2, p. 96–102, 2013.

HERKENNE, C. et al. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 8, p. 1850–1856, 2006.

HERKENNE, C. et al. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 1, p. 87–103, 2008.

IVANOVA, R.; LINDMAN, B.; ALEXANDRIDIS, P. Effect of pharmaceutically acceptable glycols on the stability of the liquid crystalline gels formed by Poloxamer 407 in water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 252, p. 226–235, 2002.

JANSEN, M. M. P. M. et al. Controlled release of morphine from a poloxamer 407 gel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 452, n. 1-2, p. 266–269, 2013.

JELVEHGARI, M.; MONTAZAM, H. Evaluation of mechanical and rheological properties of metronidazole gel as local delivery system. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 6, p. 931–940, 2011.

JIANG, Y. et al. Modified chitosan thermosensitive hydrogel enables sustained and efficient anti-tumor therapy via intratumoral injection. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 245–253, 2016.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 2-3, p. 189–212, 2002.

LI, C. et al. Enhancement in bioavailability of ketorolac tromethamine via intranasal in situ hydrogel based on poloxamer 407 and carrageenan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 474, n. 1-2, p. 123–133, 2014.

LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; NORD, C. E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. Suppl 1, p. S16–S23, 2010.

LU, C. et al. Novel thermosensitive in situ gel based on poloxamer for uterus delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 24–28, 2015.

MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, n. 1, p. 3–9, 2012.

MILLER, S. C.; DRABIK, B. R. Rheological properties of Poloxamer vehicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 18, p. 269-276, 1984.

N'DRI-STEMPFER, B. et al. Optimizing metrics for the assessment of bioequivalence between topical drug products. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 7, p. 1621–1630, 2008.

PATEL, D.; WELSH, D.; BAKER, M. Comparative study of propylene glycol and caprylic/triglyceride vehicles for topical application. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 36, p. 303-311, 1985.

PEREIRA, G. G. et al. Formulation and characterization of poloxamer 407[®]: Thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Quimica Nova**, v. 36, n. 8, p. 1121–1125, 2013.

RICCI, E. J. et al. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 161–167, 2002.

RICCI, E. J. et al. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 235-244, 2005.

ROSSI, S. et al. Comparison of poloxamer- and chitosan-based thermally sensitive gels for the treatment of vaginal mucositis. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9045, n. November 2015, p. 1–9, 2013.

SCHMOLKA, I. R. Artificial Skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatments of burns. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 6, p. 571–582, 1972.

TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review, v. 19, p. 106-121, 2006;

UR-REHMAN, T.; TAVELIN, S.; GRÖBNER, G. Chitosan in situ gelation for improved drug

loading and retention in poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 409, n. 1-2, p. 19–29, 2011.

YAPAR, E.; INAL, Ö. Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-based copolymers for transdermal drugs delivery: an overview. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 5, p. 855-866, 2012.

YU, M. et al. In vitro/in vivo characterization of nanoemulsion formulation of metronidazole with improved skin targeting and anti-rosacea properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 92–103, 2014.