República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014017753-1 A2

(22) Data do Depósito: 18/07/2014

(43) Data da Publicação: 07/11/2017

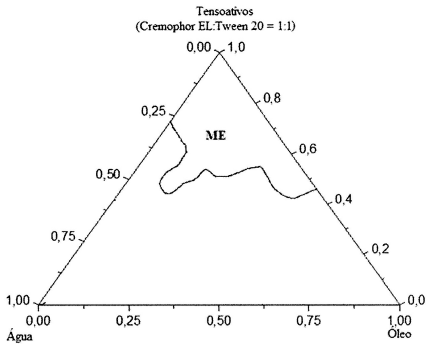
(54) Título: FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int. Cl.: A61K 9/107; A61K 31/122; A61K 8/06; A61P 29/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

(72) Inventor(es): LEILA BASTOS LEAL; DAVI PEREIRA DE SANTANA; MARIA ALICE MACIEL TABOSA; ELAYNE KARINE SOUTO DE MELO; GIOVANA DAMASCENO SOUSA; GUSTAVO AUGUSTO PEREIRA DOS SANTOS; KAROLINE BELÉM SEIXAS

(57) Resumo: FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA A presente invenção descreve uma formulação farmacêutica aprimorada, bem como o uso da mesma na preparação de um medicamento, uma composição cosmética ou uma composição nutracêutica. Mais especificamente, a presente invenção descreve uma formulação farmacêutica composta por pelo menos um insumo farmaceuticamente ativo selecionado do grupo consistindo de lapachol, análogos do lapachol, derivados do lapachol ou combinações dos mesmos, pelo menos um componente hidrofilico, pelo menos um componente lipofilico, e pelo menos um componente anfifilico. A presente invenção se situa nos campos da farmácia e química.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve uma formulação farmacêutica aprimorada contendo lapachol, análogos do lapachol, derivados do lapachol ou combinações dos mesmos, bem como o uso da mesma na preparação de um medicamento, uma composição cosmética ou uma composição nutracêutica. A presente invenção se situa nos campos da farmácia e da química.

Antecedentes da Invenção

[0002] As plantas são importantes fontes de produtos biologicamente ativos e são consideradas via para a descoberta de novos fármacos, devido ao fácil acesso e ao custo relativamente baixo (RIMBACH et al., 2009). Dessa forma, os produtos naturais têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de medicamentos utilizados clinicamente na medicina tradicional (GAUTAM et al., 2011; OSPINA et al., 2011).

[0003] Esse fato ressalta a importância do desenvolvimento de fitoterápicos com eficácia e segurança comprovadas, proporcionando, dessa forma, uma ampliação do acesso a medicamentos e oferecendo novas opções terapêuticas (BALUNAS & KINGHORN, 2005; LIMA et al., 2011).

[0004] A Tabebuia avellanedae, também conhecido como "ipê", é uma das várias espécies de plantas testada enquanto substância química. Nos anos 60 e 70, houve um significativo investimento em estudos de substâncias extraídas a partir desta planta, especialmente o lapachol e a β-lapachona, que passou a ser comercializado para utilização em quimioterapia adjuvante para o tratamento da leucemia (HIGA et al., 2011).

[0005] O lapachol (4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)-naftaleno-1,2-diona) é uma quinona natural que pode ser isolada a partir de muitas espécies de Bignoniaceae encontradas no Brasil (da SILVA JÚNIOR et al., 2011). Uma série de estudos tem examinado seu potencial farmacológico, incluindo a sua

ação anticancerígena, antiviral, antimicrobiana, antimalária, bem como sua significativa atividade anti-inflamatória (EYONG et al., 2008; LIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

[0006] Acredita-se que o lapachol age inibindo tanto a liberação de histamina das células, quanto o crescimento da linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT), o que consequentemente conduz a efeitos anti-inflamatórios (MULLER et al., 1999; HUSSAIN et al., 2007). Porém, sua relatada toxicidade (anorexia, náusea e vômitos) tem limitado seu uso por via oral (SANTANA et al., 1968; MORRISON et al., 1970; OLESON et al.; 1968; ALMEIDA et al.; 1988).

[0007] A terapia anti-inflamatória em curso visa o controle dos sinais cardinais da inflamação, antagonizando ou bloqueando principais mediadores pró-inflamatórios que são libertados no início de uma resposta inflamatória aguda (SERHAN et al., 2007). Os anti-inflamatórios não esteróides (AINE) agem tipicamente no alívio da inflamação através da inibição da enzima cicloxigenase, envolvida na produção de prostaglandinas. Esta enzima existe em duas isoformas (COX-1 e COX-2), codificadas por genes distintos em cromossomas diferentes (LIMA et al., 2011). Os compostos que inibem as enzimas COX poderia, portanto, serem considerados como potenciais fármacos anti-inflamatórios. No entanto, muitos dos agentes anti-inflamatórios utilizados são cada vez menos aceitáveis devido às reações adversas graves, tais como a intolerância gástrica, depressão da medula óssea e de retenção de água e sal, resultante de uma utilização prolongada (LIMA et al., 2011). Neste contexto, é de importância fundamental pesquisar substâncias e/ou vias que podem promover a resolução da inflamação de maneira eficaz e tolerada pelo organismo (XIAO et al., 2005).

[0008] Os fundamentos de uma formulação farmacêutica de sucesso são: permitir a entrega da substância ativa para o órgão-alvo em níveis terapeuticamente relevantes e, com desconforto e efeitos colaterais insignificantes para o paciente. A este respeito, a via de administração é de

grande influência. Em comparação com as rotas tradicionais, a administração tópica oferece diversas atrações; a liberação transdérmica ou dérmica do fármaco para a circulação sistêmica destaca-se pela ausência do efeito de primeira passagem hepática, pelo potencial de liberação controlada de longo prazo, evitando picos plasmáticos, frequentes em regimentos típicos de dosagem, facilidade de administração e possibilidade de interrupção imediata do tratamento (KREILGAARD et al., 2002).

[0009] No entanto, apesar do potencial de liberação transdérmico e dérmico, apenas poucos fármacos estão comercialmente disponíveis como formulações tópicas. A principal limitação reside na função de barreira da pele, que é considerada um dos epitélios mais impermeável do corpo humano para as substâncias exógenas. Por conseguinte, o maior desafio para formulações tópicas é de fornecer um aumento suficiente na permeação cutânea de fármacos, sem induzir alterações irreversíveis na pele (SILVA et al., 2009).

[0010] Segundo Almeida e colaboradores (1990), foi realizado a avaliação da atividade antiedematogênica de suspensões de lapachol (composto por água, 0,1% Tween 80 e 0,5% etanol) em ratos (Wistar). Como resultado, foram encontrados inibições máximas de 76% a 85% para doses de 100 a 500mg/Kg por via oral, após a indução de edema de pata por carragenina 1%. Na dose de 150mg/Kg, houve uma inibição de 57% no peso de abscesso induzido, em relação a 48% de inibição apresentada pela fenilbutazona.

[0011] Em estudo realizado por Lira et al. (2008), foi avaliado formulações gelificadas compostas de lapachol (0,5%), carbopol ultrex (0,5%), metilparabeno (0,15%), Tween 80 (0,025%), etanol (14%), glicerina (6%) e água (78,825%) em ratos Wistar. Foi observado uma significativa redução do edema da pata de ratos induzido por carragenina, apresentando uma atividade antiedematogênica (inibição) máxima de 50,16% em quarto horas após a administração da suspensão de 1% de carragenina.

[0012] Vários estudos tem sugerido que veículos microemulsionados tem o potencial de aumentar a liberação cutânea de fármacos hidrofílicos e lipofílicos

em comparação com os veículos convencionais (BOLTRI et al., 1997; BONINA et al., 1995; DELGADO- CHARRO et al., 1997; DREHER et al., 1997; KREILGAARD, PEDERSEN & JAROSZEWSKI, 2000; KRIWET & MULLER-GOYMANN, 1995; TROTTA et al., 1994; TROTTA, MOREL & GASCO, 1994). Com isso, a investigação e o emprego das microemulsões para liberação de fármacos tem sido crescente (SOLIMAN et al., 2010). Contudo, a correlação entre os componentes, composições e estrutura das microemulsões e o aumento da taxa de liberação do fármaco não está ainda completamente elucidado (KREILGAARD et al., 2002).

[0013] Dessa forma, há na técnica a necessidade de desenvolver formulações otimizadas que permitam o aumento e controle da taxa de liberação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, como por exemplo lapachol, e por diversas vias de administração, como por exemplo administração tópica por via cutânea.

[0014] Mais especificamente, é possível visualizar a necessidade de desenvolver formulações aprimoradas que permitam a administração em indivíduos do fármaco lapachol por vias alternativas mais eficientes sem que hajam os inconvenientes inerentes da administração do lapachol por outras vias já estudadas, como por exemplo por via oral em um indivíduo a qual pode gerar anorexia, náusea e vômitos devido à sua toxicidade.

[0015] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0016] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de formulações tópicas microemulsionadas otimizadas, desenvolvidas com base em diagramas de fase pseudoternários, compostas por pelo menos um componente anfifílico (e.g. tensoativos como Cremophor EL e Tween 20), pelo menos uma fase oleosa (e.g. Ácido Óléico), pelo menos uma fase aquosa (e.g. Água) e pelo menos um

insumo farmaceuticamente ativo (e.g. lapachol, análogos do lapachol, derivados do lapachol).

[0017] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma formulação farmacêutica compreendida por:

I. Pelo menos um insumo farmacêutico ativo selecionado do grupo consistindo de lapachol, análogos do lapachol, derivados do lapachol ou combinações dos mesmos;

II. Pelo menos um componente hidrofílico;

III. Pelo menos um componente lipofílico;

IV. Pelo menos um componente anfifílico.

[0018] Em um segundo objeto, é apresentado um uso da formulação farmacêutica, conforme definida na presente invenção, na preparação de um medicamento para tratar distúrbios e doenças selecionadas do grupo consistindo de: condições inflamatórias, cancerígenas, virais, microbianas, malária ou combinações das mesmas.

[0019] Em um terceiro objeto, é apresentado um uso da formulação farmacêutica, conforme definida na presente invenção, na preparação de composições cosméticas ou nutracêuticas.

[0020] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0021] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, é apresentado as presente figuras:

[0022] A figura 1 mostra um diagrama de fase pseudoternário para o sistema Cremophor EL/Tween 20, ácido oléico e água para proporções T:CO 1:1.

[0023] A figura 2 mostra um diagrama de fase pseudoternário para o sistema Cremophor EL /Tween 20, ácido oléico e água para proporções T:CO 2:1.

[0024] A figura 3 mostra um diagrama de fase pseudoternário para o sistema

Cremophor EL /Tween 20, ácido oléico e água para proporções T:CO 5:1.

[0025] A figura 4 mostra um diagrama de fase pseudoternário para o sistema Cremophor EL /Tween 20, ácido oléico e água para proporções T:CO 7:3.

[0026] A figura 5 mostra um diagrama de fase pseudoternário para o sistema Cremophor EL /Tween 20, ácido oléico e água para proporções T:CO 1:5.

[0027] A figura 6 mostra a curva da Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.

[0028] A figura 7 mostra o gráfico: viscosidade x taxa de cisalhamento das MEs

[0029] A figura 8 mostra gráfico: tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento das MEs.

[0030] A figura 9 mostra a fotomicrografia ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação (A) ME 1, (B) ME 2, (C) ME 3, (D) ME 4 e (E) ME 5.

[0031] A figura 10 mostra o espectro de SAXS das formulações ME 1, ME 2, ME 3, ME 4 e ME 5 na presença (LAP) e ausência do fármaco (placebo).

[0032] A figura 11 mostra o efeito de formulações contendo lapachol sobre a formação do edema de orelha em camundongos

[0033] A figura 12 mostra os cortes transversais de orelhas de camundongos. Biópsias coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x) após a aplicação de óleo de cróton. (A) animal tratado com veículo (acetona), (B) Óleo de Cróton, (C) Óleo de Cróton + ME 1, (D) Óleo de Cróton + ME 2, (E) Óleo de Cróton + ME 3, (F) Óleo de Cróton + ME 4, (g) Óleo de Cróton + ME 5 e (H) Óleo de Cróton + GEL.

[0034] A figura 13 mostra o decurso temporal da resposta antiedematogênica em pata de camundongos, induzida por diferentes formulações contendo lapachol.

Descrição Detalhada da Invenção

[0035] As microemulsões são dispersões isotrópicas, transparentes, termodinamicamente estáveis, usualmente formadas por misturas de quatro componentes, água, óleo, tensoativo e cotensoativo. Apresentam grande

potencial como sistemas de liberação devido à sua capacidade de solubilizar fármacos hidrofílicos, lipofílicos e anfifílicos. Além disso, estes sistemas apresentam capacidade de se formarem espontaneamente e atuam como promotores de permeação de vários fármacos, devido ao reduzido tamanho das gotículas formadas e ao seu alto conteúdo de tensoativo, que desorganiza os lipídeos da pele.

[0036] A caracterização de um sistema microemulsionado pode ser feita por diversos métodos, mas para a elucidação da sua microestrutura e para se obter informações sobre sua dinâmica, devem-se levar em consideração os resultados de mais de um método. Entre as técnicas mais difundidas tem-se a microscopia de luz polarizada para verificar a isotropia do sistema, o espalhamento de luz para medir o diâmetro da gotícula ou fase dispersa e o espalhamento de Raios X a baixo ângulo (SAXS). Métodos mais tradicionais, como densidade, viscosidade (n), índice de refração (IR) e condutividade elétrica (o) são importantes para determinar o tipo de microemulsão e caracterizá-la fisicamente.

[0037] As microemulsões possuem várias vantagens, entre elas: maior capacidade de solubilização de fármacos lipofílicos devido à coexistência de óleo e tensoativos, quando comparados a formas farmacêuticas convencionais; estabilidade termodinâmica (proporciona um prazo de validade prolongado à formulação); melhor biodisponibilidade; facilidade de fabricação pois sua formação é espontânea; maior estabilidade dos IFA pois o encapsulamento do fármaco nas estruturas das microemulsões pode melhorar a estabilidade química, fotoquímica e enzimática dos agentes terapêuticos.

[0038] Ademais, a relatada toxicidade do lapachol, quando administrado oralmente, limita sua utilização para fins terapêuticos. Portanto, o desenvolvimento de formas farmacêuticas tópicas que diminuam os efeitos adversos causados pela administração esse fármaco e que permita, a entrega mais seletiva da substância ativa para o órgão-alvo em níveis terapeuticamente relevantes, torna-se de suma importância.

[0039] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma formulação farmacêutica compreendida por:

I. Pelo menos um insumo farmacêutico ativo selecionado do grupo consistindo de Lapachol, análogos do lapachol, derivados do lapachol ou combinações dos mesmos;

II. Pelo menos um componente hidrofílico;

III. Pelo menos um componente lipofílico;

IV. Pelo menos um componente anfifílico.

[0040] Em uma concretização da presente invenção, o insumo farmacêutico ativo selecionado do grupo consistindo de lapachol, análogos do lapachol, derivados do lapachol ou combinações dos mesmos, está em uma concentração entre 0,1% a 5%.

[0041] Em uma concretização, a formulação é microemulsionada ou nanoemulsionada.

[0042] Em uma concretização, o componente hidrofílico é a água, em que a concentração máxima do componente hidrofílico é de 60% em relação ao peso da composição.

[0043] Em uma concretização, o componente lipofílico é selecionado do grupo consistindo de: miristato de isopropila, ácido oleico, óleo de oliva, óleo de babaçu ou combinações dos mesmos.

[0044] Em uma concretização, o componente anfifílico é composto não iônico.

[0045] Em uma concretização, o componente anfifílico compreende pelo menos um tensoativo selecionado do grupo consistindo de: polioxietilados, oleatos de poligricerol, polissorbatos, polietilenoglicóis, oleatos de sorbitano ou combinações dos mesmos.

[0046] Em uma concretização, o componente anfifílico está presente com concentração mínima de 30% em relação ao peso da composição.

[0047] Em uma concretização, o componente anfifílico é formado pela combinação do tensoativo polioxietilado e o tensoativo polissorbato; em que o tensoativo polioxietilado é selecionado do grupo consistindo de óleo de ricínio

polioxietilado, macrogolglicerol ricinoleato, óleo de castor potioxil 35 ou combinações dos mesmos; em que o tensoativo polissorbato é selecionado do grupo consistindo de Polissorbato 20, Tween 20 ou combinações dos mesmos; e em que a proporção do tensoativo polioxietilado e o tensoativo polissorbato está entre 1:5 à 5:1 (p/p).

[0048] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta o uso da formulação farmacêutica, conforme definida anteriormente, na preparação de um medicamento para tratar distúrbios e doenças selecionadas do grupo consistindo de: condições inflamatórias, cancerígenas, virais, microbianas, malária ou combinações das mesmas.

[0049] Em uma concretização, os distúrbios e doenças são condições inflamatórias.

[0050] Em uma concretização, as condições inflamatórias são selecionadas do grupo consistindo: psoríase, otite, bursite, tendinite, sinusite ou combinações das mesmas.

[0051] Em uma concretização, o medicamento é para administração por via dérmica ou transdérmica.

[0052] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o uso da formulação farmacêutica, conforme definida anteriormente, na preparação de composições cosméticas ou nutracêuticas.

Cotensoativo

[0053] No contexto da presente invenção, o termo 'cotensoativo' pode ser entendido como uma molécula não-iônica que se associa ao tensoativo auxiliando na estabilização das emulsões.

Microemulsionada

[0054] No contexto da presente invenção, o termo 'microemulsionada' pode ser entendido como sistemas emulsionados constituídos de dois ou mais líquidos imiscíveis em escala micrométrica.

Nanoemulsionada

[0055] No contexto da presente invenção, o termo 'nanoemulsionada' pode ser

entendido como sistemas emulsionados constituídos de dois ou mais líquidos imiscíveis em escala nanométrica.

Administração via tópica

[0056] No contexto da presente invenção, o termo 'administração via tópica' deve ser entendida como a administração por um ponto particular da superfície externa do corpo de um indivíduo, como por exemplo administração por via dérmica ou transdérmica.

Administração por via dérmica ou transdérmica

[0057] No contexto da presente invenção, o termo 'administração por via dérmica ou transdérmica' pode ser entendido como o meio de administração e liberação da formulação farmacêutica a um indivíduo através da camada dérmica.

Exemplos

[0058] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo I

[0059] O insumo farmaceuticamente ativo testado foi o lapachol (o qual foi cedido pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco), Miristato de Isopropila - VETEC, lote 1000361; Plurol oleico Gattefosse (poligliceril-6 dioleato) lote 134929; Cremophor EL –SIGMA, lote #BCBH6743V; Tween 20 – VETEC, lot 1108351; Polietilenoglicol 400 – VETEC, lote 1108694; Span 80 PA50101; Ácido Oléico – NUCLEAR, lote 10121568; Óleo de Babaçu – CRODA, lote 338248; Óleo de Oliva – SIGMA, lote #BZBF7133V. Metanol grau HPLC (JT Baker, Philipsburg, PA, EUA), filtros de membrana de 0,25 micrômeros.

[0060] A água foi purificada utilizando um sistema Milli Q da Millipore (Millipore, São Paulo, Brasil). Todos os solventes e reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico e as vidrarias previamente calibradas. Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão

reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações.

Solubilidade do lapachol em tensoativos, cotensoativos e óleos

[0061] A solubilidade do lapachol foi determinada mediante o preparo de dispersões contendo excesso do fármaco (400 mg). Nesse procedimento, excesso de lapachol foi transferido para frascos com tampa. Em cada frasco foram adicionados 5mL de diferentes tensoativos (Cremophor EL, Plurol Oleique, Tween 20, PEG400, Span 80) e óleos (Miristato de Isopropila, Ácido Oléico, Óleo de Babaçu, Óleo de Oliva) .

[0062] Essas dispersões foram homogeneizadas por meio de agitação à temperatura controlada (25 ± 2°C), por um período de 24 horas e, em seguida, centrifugadas (2500 g ~ 3000 rpm) por 30 minutos, retirou-se uma alíquota do sobrenadante e filtrou-se em filtro de membrana (0,45 µm). A concentração do lapachol foi determinada, por meio de espectrofotometria de UV (278 nm), utilizando solvente e curva de calibração adequada para cada óleo e para cada tensoativo.

[0063] O desenvolvimento de formulações microemulsionadas depende, primordialmente, das propriedades físico-químicas do fármaco. Fármacos lipofílicos são, preferencialmente, encapsulados na fase oleosa de sistemas O/A, enquanto que fármacos hidrofílicos na fase aquosa de sistemas A/O.

[0064] Como o lapachol é um fármaco lipofílico, conhecer sua solubilidade em solventes oleosos é de suma importância. Dessa forma, sua solubilidade em diferentes óleos, tensoativos e cotensoativos foi determinada (Tabela 1). A solubilidade encontrada do lapachol foi maior para o ácido oleico (15,33 mg mL^{-1}), quando comparado com os outros óleos. Sabe-se que o ácido oleico, além de considerado pouco irritante para a pele, pois não desnatura as proteínas, é bastante utilizado como promotor de permeação e atua desestabilizando os lipídios da pele através da formação de poros.

Componentes	Solubilidade (mg mL^{-1})
Tensoativos e Cotensoativos	
Cremophor EL®	29,48
Tween 20®	42,21
PEG 400	30,39
Span 80®	11,80
Plurol Oleique®	4,23
Óleos	
Miristato de Isopropila	8,55
Ácido Oléico	15,33
Óleo de Oliva	6,63
Óleo de babaçu	10,50

Tabela 1- Solubilidade do lapachol em diferentes óleos, tensoativos e cotensoativos.

[0065] O problema mais crítico relacionado com o desenvolvimento de sistemas microemulsionados é a toxicidade dos tensoativos. Grande quantidade de tensoativos pode causar irritação na pele quando administrados por via tópica. Portanto, é importante determinar corretamente a concentração dos tensoativos e utilizá-los na sua concentração mínima.

[0066] Nesse estudo, cinco tensoativos não iônicos (Cremophor EL, Plurol Oleique, Tween 20, PEG400, Span 80) foram analisados. O Cremophor EL, o PEG 400 e o Tween 20 (EHL = 14, 11.6 e 16.7, respectivamente) foram os que apresentaram maior solubilidade frente ao lapachol.

[0067] O valor do EHL (Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo) pode indicar a extensão da preferência de migração na interface entre fases oleosas e aquosas. Isso parece ser importante no papel dos tensoativos de formarem microemulsões, pois eles diminuem a tensão interfacial para valores mais baixos (DAMASCENO et al., 2011). O predominante caráter hidrofílico ou lipofílico do tensoativo determina suas características específicas, para que

se tenha ação emulsionante para microemulsões do tipo O/A, devem possuir um EHL na faixa entre 8,0 - 18,0. Levando em consideração a hidrofobicidade do lapachol, a escolha de um tensoativo com valor de EHL alto (caráter hidrofílico), tenderia a formação de sistemas O/A. Dessa forma, os tensoativo escolhidos foram o Cremophor EL (tensoativo) e o Tween 20 (cotensoativo).

Obtenção das microemulsões através de diagrama de fase pseudoternário

[0068] Para obtenção dos diagramas de fase, foi utilizado o método de titulação com água onde, inicialmente, o tensoativo (Cremophor EL) foi misturado com o cotensoativo (Tween 20) nas seguintes proporções (p/p): 1:1, 2:1, 5:1, 7:3 e 1:5. A esta mistura de T/CO, foi adicionado ácido oléico (fase oleosa) nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. As titulações foram feitas com água purificada tipo Milli-Q, utilizando uma pipeta automática ajustada 1000 µL, adicionando gota a gota, a temperatura ambiente. Durante a titulação, a mistura foi homogeneizada por agitador magnético, por 3 minutos, e as mudanças do aspecto visual contra um fundo preto foram observadas. Considerando-se as proporções dos componentes (T/CO, fase oleosa e fase aquosa) após as titulações aquosas plotou-se os pontos em que se deu a transição de sistema opticamente transparente ou translúcido líquido ou gel ou de ME para sistema opaco líquido ou semissólido.

Efeito da proporção de massa do tensoativo e do cotensoativo na formação das microemulsões

[0069] Quando se modifica progressivamente a composição de uma mistura de solventes imiscíveis, as mudanças que produzirão nas dispersões podem ser traduzidas por importantes variações nas propriedades termodinâmicas dos compostos que a compõem. A construção de diagramas de fase pode ser uma ferramenta fundamental para caracterizar em quais condições experimentais as microemulsões são formadas.

[0070] A técnica empregada para a determinação dos diagramas de fase,

destes sistemas, mostrou-se bastante simples e reprodutível. Após as titulações, foi possível definir as regiões opticamente transparentes microemulsionadas, como representada nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5. Observa-se uma larga faixa do lado de cima de cada diagrama, cujos destaques são as regiões de ME, para qualquer proporção de tensoativo/cotensoativo. A partir dessas regiões, foram selecionadas cinco formulações para o estudo de caracterização. Além disso, foi verificado também, que a incorporação do lapachol não interferiu ou alterou as regiões de ME do sistema, ou seja, elas permanecem isotrópicas e opticamente transparentes.

[0071] Após a construção dos diagramas de fase, pode-se perceber que o aumento da relação T/CO acarreta numa maior área de sistemas microemulsionados. Dessa forma, foram selecionadas cinco formulações, cujas composições centesimais estão descrita na Tabela 2, sendo quatro (ME 1, ME 2, ME 3 e ME 5) do diagrama 5:1 (diagrama com maior área de ME) e uma do diagrama 1:5 (ME 3). Todas as formulações selecionadas apresentaram-se como sistemas homogêneos, aspecto límpido e translúcido característico de microemulsões.

[0072] Adicionalmente, podemos constatar que a utilização de tensoativos com valores mais elevados de EHL, proporciona uma maior polaridade ao meio, favorecendo a incorporação de fase aquosa ao sistema. Dessa forma, a diminuição da tensão interfacial será mais intensa, favorecendo a estabilidade termodinâmica do sistema. Isso se deve ao aumento da curvatura do filme interfacial, possibilitando a formação de gotículas menores, como as das microemulsões. Assim, a combinação adequada dos tensoativos, vai permitir que a energia livre do sistema se aproxime de zero, proporcionando a melhor estabilidade do sistema.

Composição (%)	ME 1	ME 2	ME 3	ME 4	ME 5
Cremophor	27.1	41.6	8.4	41.6	28.75
Tween 20	5.4	8.4	41.6	8.4	5.75
Ácido Oléico	31.9	24.5	24.5	12.0	12.0
Lapachol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Água	35.1	25.0	25.0	37.5	53.0

Tabela 2 - Composição centesimal das ME obtidas nos diagramas pseudoternário.

Preparação de formulações microemulsionadas contendo lapachol

[0073] Após a construção dos diagramas de fases, diferentes formulações foram selecionadas, a partir das regiões onde sistemas micoemulsionados foram obtidos. Para a incorporação do lapachol na fase oleosa. 0,5% (p/p) de lapachol foram dissolvidos na fase oleosa (ácido oléico) de todas as formulações selecionadas. Em seguida, a quantidade selecionada da mistura T/CO foi adicionada na solução oleosa do fármaco e agitada por 3 min. A fase aquosa foi adicionada lentamente com agitação contínua, durante 3 minutos, à temperatura ambiente.

[0074] Cinco formulações, como pode ser visto na tabela abaixo, foram selecionadas a partir do diagrama de fases pseudoternário com a proporção 5:1 e 1:5 (Cremophor EL:Tween 20). Para preparação das formulações selecionadas, primeiramente, 0,5% de lapachol foi incorporado na fase oleosa (ácido oleico). Em seguida, os demais componentes das microemulsões foram adicionados.

Composição (%)	ME1		ME2		ME3		ME4		ME5	
	Placebo	ME LAP	Placebo	ME LAP	Placebo	ME LAP	Placebo	ME LAP	Placebo	ME LAP
Cremophor®	27.1	27.1	41.6	41.6	8.4	8.4	41.6	41.6	28.75	28.75
Tween 20®	5.4	5.4	8.4	8.4	41.6	41.6	8.4	8.4	5.75	5.75
Ácido oleico	32.4	31.9	25.0	24.5	25.0	24.5	12.5	12.0	12.5	12.0
Lapachol	-	0.5	-	0.5	-	0.5	-	0.5	-	0.5
Água	35.1	35.1	25.0	25.0	25.0	25.0	37.5	37.5	53.0	53.0

Tabela 3 -Composição centesimal das MEs contendo lapachol obtidas nos diagramas pseudoternário

Validação espectrofotométrica para quantificação do lapachol

[0075] As análises foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV mini 1240, em 278nm. Os ensaios para determinação dos parâmetros de validação foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela RE 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As amostras foram preparadas em metanol. Todas as soluções foram previamente filtradas em filtros de 0,45 µm antes da leitura.

[0076] O estudo da linearidade foi realizado nas concentrações de 2,0; 3,0; 5,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 15,0 µg mL^{-1} pela transferência de alíquotas de solução estoque de lapachol SQR 100 µg mL^{-1} (preparada em metanol). As diluições foram preparadas em três réplicas e empregadas na construção da curva analítica (concentração *vs* área do pico). A equação de reta e o coeficiente de correlação linear (r) foram calculados.

[0077] A partir da curva analítica foram estimados o limite de detecção (LCD) e o limite de quantificação (LQ), através das fórmulas:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

e

$$LD = \frac{DPa \times 3}{C}$$

Onde:

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y, médio das três

curvas e IC é a inclinação da curva de calibração.

[0078] A precisão foi avaliada com base na repetibilidade, isto é, a correlação entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo, utilizando a mesma instrumentação e o mesmo analista. Seis soluções de análise da amostra foram utilizadas na concentração de trabalho (10 μg mL^{-1} = 100% de concentração teórica). A precisão intradias foi avaliada analisando-se soluções padrão (n=3) nas concentrações de 10 μg mL^{-1}. As soluções foram analisadas e a seguir o coeficiente de variação (CV%) foi calculado. A precisão interdias foi avaliada da mesma forma em dois dias consecutivos.

[0079] No estudo da exatidão, foram utilizadas amostras em triplicata, em concentrações equivalentes a 5,0; 10,0 e 15,0 μg mL^{-1}, o que corresponde a 50%, 100% e 150% da concentração teórica do fármaco testado, lapachol.

[0080] A robustez foi avaliada através da variação do fabricante de metanol. Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação e teste t de Student.

[0081] A curva de calibração do lapachol foi linear (y = 0,0649x - 0,0024) com um coeficiente de correlação (r) de 0,9997. Segundo a ANVISA (Brasil, 2003), o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o valor de r^2 obtido na análise do lapachol pelo método espectroscopia UV desenvolvido obedece aos limites estabelecidos (Figura 6).

[0082] Através da análise de variância (ANOVA), podemos testar a linearidade do método e a significância estatística da curva ajustada. Utilizando a razão entre a média quadrática devido à falta de ajuste e a média quadrática devido ao erro puro foi possível verificar se houve falta de ajuste. Esta relação apresentou um F calculado de 0,99 abaixo do valor crítico tabelado 3,55; onde podemos afirmar no nível de 95% de confiança que o modelo linear está bem ajustado na faixa de concentração estudada.

[0083] O método mostrou repetibilidade nas seis amostras padrão, com um coeficiente de variação (CV) de 1,80%, menor que o máximo estabelecido

pela RE 899/2003 (5,0%). O método também demonstrou ser preciso quando testado em diferentes dias por diferentes analistas; não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos por diferentes analistas e em dias diferentes, utilizando o teste *t* de Student com 95% de confiança (Tabela 4).

	t calculado	**t tabelado (p < 0,05)**
1° dia - Analista 1 e 2	0,11	4,3
2° dia - Analista 1 e 2	0,18	
Analista 1 - 1° e 2° dias	0,05	
Analista 2 - 1° e 2° dias	0,55	

Tabela 4 - Tratamento estatístico da precisão intermediária do método.

[0084] Os resultados para exatidão foram próximos a 100%, com coeficientes de variação (CVs) de 0,77%, 0,32% e 0,32% para as concentrações teóricas de 50%, 100% e 150%, respectivamente, de acordo com a tabela 5.

Determinações	**5,0 µg mL^{-1}**	**%**	**10,0 µg mL^{-1}**	**%**	**15,0 µg mL^{-1}**	**%**
1	4,09	99,66	9,86	98,67	15,16	101,11
2	5,06	101,20	9,85	98,52	15,26	101,73
3	5,01	100,27	9,91	99,13	15,24	101,64

Tabela 5 - Resultados da exatidão em 3 concentrações (5,0; 10,0 e 15,0 µg mL^{-1}) em triplicata, correspondendo a 50%, 100% e 150%, de acordo com a RE 899/03.

[0085] No teste de robustez (Tabela 6), quando o fabricante do metanol foi modificado, o valor de *t* calculado foi (0,42) foi menor que o valor do *t* tabelado (4,30). Assim, não há diferença estatisticamente significativa (Teste *t* de Student) com 95% de confiança e, portanto, o método pode ser considerado robusto.

Parâmetros	Concentrações (μg mL^{-1})				
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	DPR (%)
Metanol A	9,92	9,86	9,95	9,91	0,47
Metanol B	9,88	9,89	9,83	9,87	0,32

Tabela 6 - Resultados da robustez para os parâmetros avaliados: fabricante do metanol e proporção da fase móvel.

[0086] A metodologia proposta para a determinação do lapachol demonstrou ser um método simples, rápido e barato, atendendo as exigências quanto à especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Os modelos estatísticos empregados nos dados dos diferentes parâmetros avaliados permitiram uma maior confiabilidade nos resultados. Dessa forma, os resultados foram considerados satisfatórios e o método provou ser adequado para quantificar o lapachol.

Caracterização das Microemulsões - Centrifugação

[0087] As ME foram centrifugadas em centrifuga (Centribio 80 - 2B), durante 30 min a 2500 g ~ 3000 rpm e no final foi observado a ocorrência ou não de separação de fases.

[0088] As ME selecionadas foram caracterizadas 48 horas após a fabricação com avaliação dos seguintes parâmetros: aspecto macroscópico, pH, condutividade elétrica, microscopia de luz polarizada, potencial zeta e SAXS. Na Tabela 7 encontram-se os resultados da caracterização realizada nos cinco sistemas isotrópicos.

	ME 1		ME 2		ME 3		ME 4		ME 5	
	Placebo	ME - LAP*	Placebo	ME - LAP*	Placebo	ME - LAP*	Placebo	ME - LAP*	Placebo	ME - LAP*
Aspecto Macroscópico	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida
Condutividade elétrica (µS cm^{-1})	60,4±0,2	41,9±0,1	65,3±0,1	35,1±0,1	52,6±0,1	21,7±0,1	53,0±0,1	41,2±0,1	70,2±0,1	48,6±0,1
pH	4,1±0,1	4,9±0,1	4,1±0,1	4,6±0,1	4,2±0,1	4,5±0,1	4,3±0,1	4,6±0,1	4,1±0,1	4,5±0,1
Potencial zeta (mV)	34,6±0,4	30,3±0,5	28,8±0,4	28,3±0,7	32,9±0,3	33,4±0,4	30,7±0,5	31,1±0,4	29,7±0,4	29,6±0,7
Microscopia de luz polarizada	NB**	NB**	NB**	NB**	NB**	NB**	NB**	NB**	NB**	NB**
Viscosidade (Pa.s)	6,95	0,91	3,93	2,26	0,71	0,68	3,98	24,6	4,74	27,2

* ME - LAP = Microemulsão contendo 0,5% de lapachol

** NB = Nãobirrefrigente

Tabela 7 - Resultado da caracterização das microemulsões com e sem lapachol.

[0089] A determinação do tamanho de gotículas em sistemas dispersos, como as microemulsões, pode ser realizada pela técnica de espalhamento

de luz dinâmico (DLS - Dinamic Light Scattering). Quando as gotículas presentes no sistema são iluminadas por um feixe de luz, ocorre o espalhamento da luz, sendo que a intensidade da luz espalhada varia numa taxa dependente da velocidade de difusão das gotículas, as quais, por sua vez, são governadas pelo seu tamanho.

[0090] Não foi possível medir o exato intervalo de tamanho de gotículas por esse método, fato este que pode estar relacionado à viscosidade apresentada pelas formulações microemulsionadas estudadas. A literatura relata que quando o sistema é concentrado ou viscoso, a análise torna-se imprecisa em razão das interações existentes entre as gotículas.

[0091] Microemulsões, quando diluídas, podem perder sua estabilidade termodinâmica, uma vez que a concentração dos tensoativos se torna insuficiente para manter a baixa tensão interfacial, podendo ocorrer mudanças drásticas no tamanho das gotículas. Devido à característica intrínseca das microemulsões estudadas, presumimos que a técnica DLS não seria eficiente devido à impossibilidade de realização de leituras confiáveis e reprodutíveis nas amostras sem diluição.

Determinação da condutividade elétrica

[0092] Para a determinação do tipo do sistema (O/A ou A/O), avaliou-se, primeiramente, a condutividade do solvente aquoso e do solvente oleoso. Em seguida, realizou-se a medida de condutividade da amostra. Quando a condutividade da amostra foi próxima da condutividade da fase aquosa, a formulação foi designada O/A, se próxima à do óleo, ela é caracterizada como A/O.

[0093] A condutividade elétrica foi determinada em condutivímetro modelo CG 2200 (GEHAKA) calibrado com uma solução padrão de KCl de 1412 p,S/cm, à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata.

[0094] Foi previamente demonstrado que existe uma forte correlação entre a estrutura de uma microemulsão e o seu comportamento eletrocondutor. O estudo da condutividade elétrica é, portanto, um ferramenta útil que permite

avaliar alguns aspectos das microemulsões.

[0095] No chamado modelo de percolação, a condutividade permanece baixa até certa fração de volume de água (FANUN, 2008). Se uma drástica alteração na condutividade, a determinada fração de volume de água, é registrada, então, sugere-se uma inversão de fase das micelas invertidas (A/O), para micelas normais (O/A). Esta transição é explicada pelo surgimento de estruturas bicontínuas que possuem tensão interfacial ultrabaixa.

[0096] O lapachol apresenta um pKa de 6,15 e quando disperso em um meio cujo pH é mais baixo do que o seu valor de pKa ele tende a permanecer inserido no sistema na forma molecular, a qual vai formar combinações moleculares com a fase aquosa do sistema, causando, desta forma, uma diminuição na condutividade elétrica como pode ser visualizado nos dados da Tabela 7.

Determinação do pH

[0097] O pH das formulações foi determinado através de pHmetro modelo PG 1800 (GEHAKA), previamente calibrado com as soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0, à temperatura ambiente.

[0098] O pH cutâneo é normalmente ácido, oscilando, em valores de pH, entre 4-6. Essa faixa de pH é mantida por um sistema tampão de ácido láctico/lactato, pelos ácidos dicarboxílicos do suor, ácidos graxos das glândulas sebáceas e pelos elementos ácidos da queratina. O pH ideal de uma formulação é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância da pele. No caso das ME desenvolvidas nesta pesquisa, os pHs encontraram-se na faixa de 4,1 a 4,9, evidenciando que este parâmetro não foi afetado significativamente com a incorporação do lapachol nas ME (Tabela 7).

Determinação do potencial zeta

[0099] O potencial Zeta é medido usando uma combinação das técnicas de eletroforese e o efeito Doppler. Essa combinação também é conhecida como

Eletroforese Laser Doppler. Este método mede a velocidade com que as partículas se movem em um líquido quando um campo elétrico é aplicado.

[0100] As medidas do potencial zeta foram determinadas com auxílio do ZetaSizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments). As formulações (0,1 mL) foram dispersas em 10 mL de água destilada num balão volumétrico e misturados cuidadosamente com agitação vigorosa.

[0101] O potencial Zeta das amostras atua como uma importante indicação da estabilidade potencial dos sistemas coloidais estudados. É estabelecido que as linhas de divisão entre estabilidade e instabilidade são tomadas em -30 mV e +30 mV. Valores de potencial Zeta de -30 mV a +30 mV caracterizam a instabilidade de soluções coloidais.

[0102] É possível verificar que os valores de potencial zeta se apresentam na ordem de - 30mV entre os diferentes grupos de microemulsões, sugerindo que todos esses grupos de MEs apresentam-se estáveis e com as mesmas propriedades eletrostáticas entre si. Este valor de potencial zeta negativo resulta do fato destas MEs serem formadas por dois ácidos fracos, o lapachol (pKa 6,15) e o ácido oleico (pKa 7,6), que, apesar de estarem predominantemente na sua forma molecular, em pHs abaixo do seu pKa parte estaria ionizada negativamente.

Comportamento reológico

[0103] O comportamento reológico e valores de viscosidades de todas as formulações microemulsionadas foram visualizados usando reômetro rotacional de cilindros concêntricos tipo Searle, MCR 301 (Anton Paar) e os dados foram plotados através do software Rheoplus (Anton Paar).

[0104] A viscosidade descreve as interações entre as microestruturas das microemulsões. As viscosidades das MEs tenderam a aumentar quando a quantidade de água na formulação aumentou (Figura 7). Espera-se que as cadeias hidrofílicas dos tensoativos não-iônicos estejam fortemente hidratadas e interagindo com as ligações de hidrogênio, permitindo, assim, uma forte interação (PODLOGAR et al., 2004; BOONME et al., 2006). No

caso das formulações ME 2 e ME 3, quando a quantidade de água foi fixada em 25%, a viscosidade da formulação diminuiu à medida que a quantidade do tensoativo mais hidrofílico (Tween 20 - EHL = 16.7) foi aumentada.

[0105] Espera-se que, com uma elevada quantidade de tensoativo hidrofílico e uma limitada quantidade de água, a cadeia hidrofílica do tensoativo não pode ser fortemente hidratada. Entretanto, quando a quantidade de tensoativo é diminuída e a razão água/tensoativos aumentada, a cadeia hidrofílica do tensoativo foi mais hidratada e a viscosidade, então, aumentou.

[0106] As microemulsões contendo lapachol tiveram suas viscosidades diminuídas, quando comparadas aos respectivos placebos. A estrutura química do lapachol possui um largo domínio lipofílico (apolar), este, portanto, poderá agir como um cotensoativo. Possivelmente, o lapachol não irá ser incorporado exclusivamente na fase oleosa (ácido oleico), mas poderá também se encontrar no filme interfacial, impedindo a formação de cadeias fortemente hidratadas e a interação das ligações de hidrogênio dos tensoativos não-iônicos nas formulações com elevada quantidade de água.

[0107] O estudo das propriedades reológicas e da viscosidade podem fornecer informações sobre a microestrutura das microemulsões. Tanto microemulsões o/a quanto a/o apresentam fluxo newtoniano, onde não há nenhuma mudança na tensão de cisalhamento com a variação da taxa de cisalhamento. Formulações bicontínua podem apresentar um comportamento de fluxos não-newtoniano e plasticidade, o que pode ser bastante complexo.

[0108] Na análise do comportamento reológico (Figura 8) pode-se observar que a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional a taxa de cisalhamento, ou seja, a viscosidade relativa é constante e independe da força aplicada á formulação. Com isso, as formulações são consideradas Newtonianas e não apresentam efeito tixotrópico. A tixotropia esta relacionada com a diminuição da viscosidade para uma taxa de

cisalhamento constante, o que não foi observado nos sistemas em estudo.

Microscopia de luz polarizada

[0109] Cada formulação foi avaliada através da Microscopia de Luz Polarizada (DM 750P - Leica) para avaliar a isotropia ou não dos sistemas.

[0110] As microemulsões são isotrópicas e podem ser diferenciadas dos sistemas líquido-cristalinos, que são anisotrópicos e birrefringentes. Os materiais isotrópicos têm propriedades ópticas, independente da direção da luz incidente, enquanto que as propriedades ópticas dos materiais anisotrópicos variam com a direção da luz incidente. Para observar os efeitos da birrefringência e isotropia, é necessária uma luz polarizada linear.

[0111] As MEs estudadas (Figura 9) não apresentaram nenhum desvio ou vibração da luz polarizada, as quais se apresentaram com as mesmas propriedades ópticas em todas as direções. Nota-se que a incorporação do lapachol nesses sistemas não altera o comportamento isotrópico, ou seja, sob o plano de luz polarizado não desvia luz, confirmando a manutenção do sistema microemulsionado.

Espalhamento de Raio-X de Baixo Ângulo (SAXS)

[0112] As medidas foram realizadas na estação de medidas D11- SAXS 1 do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS) em Campinas, que é equipado com um monocromador (X= 1,608Á), uma câmara de ionização, um detector de raios-X vertical e um analisador multicanal que foram utilizados para registrar a intensidade do espalhamento, *I(Q,)* como uma função do módulo do espalhamento do vetor *q*. O espalhamento das partículas existentes no sistema foi subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades de todas as amostras foram medidas em unidades relativas, mas para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

[0113] A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) é muito sensível do ponto de vista estrutural local, permitindo obter informações da ordem de nanômetros, impossível de serem obtidas por

reologia. Assim, para uma análise mais criteriosa dos sistemas selecionados foi realizado um estudo de SAXS.

[0114] A Figura 10 mostra as curvas das intensidades de espalhamento I(q) em função do vetor de espalhamento (q) das formulações ME 1, ME 2, ME 3, ME 4 e ME 5 apresentadas, anteriormente, na Tabela 1. Para todas as amostras, na presença e ausência do lapachol, as curvas são características de sistemas microemulsionados. Houve um leve deslocamento das bandas para menores valores de q, o que indica um leve aumento no tamanho das gotículas com a incorporação do fármaco. Não foram evidenciados outros picos, no intervalo de 0,1 a 1,5 nm^{-1}, no perfil de SAXS que poderiam ser característicos como mesofases (estrutura de cristal líquido liotrópico, por exemplo).

Avaliação da atividade antiedematogênica

[0115] Uma série de estudos tem examinado o potencial farmacológicodo Lapachol, incluindo a sua ação anticancerígena, antiviral, antimicrobiana, antimalária, bem como sua significativa atividade anti-inflamatória.

[0116] Com relação à atividade anti-inflamatória, foram realizados ensaios que comprovaram que os sistemas desenvolvidos possuem efetiva atividade anti-edematogênica, podendo ser utilizados em tratamentos de distúrbios ou doenças inflamatórias, sejam tópicas ou sistêmicas. Portanto esses sistemas poderão vir a ser utilizados no tratamentos de doenças como a psoríase, a otite, a bursite, a tendinite, a sinusite, dentre outras.

Animais e manutenção

[0117] Foram utilizados camundongos machos Swiss *(Mus musculus),* com massa corpórea entre 25-35 g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Regional do Cariri e foram mantidos no Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal até a realização dos experimentos, em conformidade com as normas e procedimentos de biossegurança para biotérios e bioéticas. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada de 23±2°C e ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração (Labina, Purina) à vontade.

O protocolo para estes experimentos foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da URCA.

Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton

[0118] O edema foi induzido através da aplicação de 20 pL de óleo de cróton (200 pg) diluído em solução de acetona/água (7:3) na face interna da orelha direita (D) dos camundongos de cada grupo (n=6). Na orelha esquerda (E) foi aplicado (20 pL) somente o veículo utilizado para dissolução das formulações (acetona). Após 15 minutos da injeção do agente flogístico, nos grupos de animais tratados, foi aplicado 20 pL de cada formulação na orelha direita. Como controle negativo foi utilizado foi utilizado apenas o óleo de cróton (20 pL/orelha). Após 6 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e as orelhas foram seccionadas em discos circulares de 6,0 mm de diâmetro e pesadas (mg) em balança analítica (Metler Toledo AB204).

[0119] A extensão do edema (peso do edema) foi expressa como a diferença entre o peso (em mg) da secção removida da orelha direita (a qual recebeu o agente irritante) e o peso (em mg) da secção removida da esquerda orelha (que recebeu veículo utilizado para diluir o agente irritante). A porcentagem de inibição do edema foi determinada pela fórmula:

$$Percentagem\ de\ inibição\ (\%) = 100 - (\frac{A \times 100}{B})$$

[0120] Na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica, o uso do óleo de cróton como agente flogístico induziu processo inflamatório local caracterizado pela formação de edema tecidual. Este modelo permite identificar compostos que possam ser potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias que acometem a pele, pois promovem condições que se assemelham com alguns tipos de dermatites observadas em humanos. A aplicação única de óleo de cróton fornece dados quanto à atividade antiedematogênica de uma substância num processo inflamatório agudo.

[0121] A inflamação aguda induzida pela administração tópica do óleo de cróton aumenta a permeabilidade vascular e a vasodilatação, estimulando a migração de leucócitos polimorfonucleares (principalmente os neutrófilos), a

liberação de histamina e serotonina, e a síntese moderada de eicosanóides.

[0122] O óleo de cróton também pode induzir a inflamação a partir da ativação da proteína quina C (PKC), desencadeando, consequentemente, a produção de eicosanóides inflamatórios por meio das enzimas ciclooxigenase (COX) ou lipoxigenase (LIX).

[0123] Os resultados mostram que todas as formulações contendo lapachol, quando comparadas com o controle negativo, reduziram significativamente o edema, indicando uma possível atividade anti-inflamatória tópica (figura 11 e tabela 8).

[0124] Dentre as formulações testadas, a que apresentou uma maior redução do edema foi a ME 4 (inibição de 93,85%). Entretanto, após tratamento estatístico dos dados (ANOVA, 1 fator, seguindo pelo teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls,* utilizando $P < 0,05$ como nível de significância), observa-se que todas a formulações microemulsionadas comportaram-se estatisticamente semelhantes ($P > 0,05$) (tabela 9).

[0125] Através de testes *in vivo,* é possível observar a reação do metabolismo cutâneo e da presença da circulação sanguínea durante o transporte de fármacos até a derme. Esses parâmetros não podem ser observados nos testes de permeação cutânea *ex vivo.*

Grupos	Edema (AP mg)	Inibição (%)
CN	1,11 ± 0,41	-
ME 1	0,31 ± 0,16	72,28
ME 2	0,08 ± 0,06	92,06
ME 3	0,49 ± 0,22	54,95
ME 4	0,06 ± 0,01	93,85
ME 5	0,27 ± 0,17	74,80
GEL	0,66 ± 0,29	40,03

Tabela 8 - Atividade anti-inflamatória de formulações contendo lapachol pela técnica de edema de orelha induzida por óleo de cróton

Formulações	Significância (P < 0,05)
ME 1 vs ME 2	ns
ME 1 vs ME 3	ns
ME 1 vs ME 4	ns
ME 1 vs ME 5	ns
ME 1 vs GEL	ns
ME 1 vs CN	***
ME 2 vs ME 3	ns
ME 2 vs ME 4	ns
ME 2 vs ME 5	ns
ME 2 vs GEL	*
ME 2 vs CN	***
ME 3 vs ME 4	ns
ME 3 vs ME 5	ns
ME 3 vs GEL	ns
ME 3 vs CN	**
ME 4 vs ME 5	ns
ME 4 vs GEL	*
ME 4 vs CN	***
ME 5 vs GEL	***
ME 5 vs CN	***
GEL vs CN	*

CN: Controle Negativo (óleo de cróton)

ns: não há diferença estatisticamente semelhante (P>0.05);

*: diferença significativa (P<0.01)

**: existe diferença significativa (P<0.001)

***: existe diferença significativa (P<0.0001)

Tabela 9 - Tratamento estatístico (ANOVA, 1 fator, comparações múltiplas de Newman-Keuls) dos resultados da redução do edema de orelha de camundongos.

[0126] Ademais, os inibidores de COX e os corticoides são altamente eficazes contra a inflamação induzida pelo óleo de cróton, embora os seus mecanismos de ação sejam diferentes. Todas as formulações contendo lapachol mostraram possuir um forte efeito inibidor. Isto pode indicar que o mecanismo de ação anti-inflamatória do lapachol aja tanto através da inibição da fosfolipase A_2 (PLA_2) e impedindo a produção de fatores vasoativos e quimiotáxicos (efeito antiedematogênico de anti-inflamatórios esteróidais), quanto impedindo a síntese de intermediários de prostaglandinas via inibição das enzimas COX-1 e COX-2 (efeito antiedematogênico de anti-inflamatórios não- esteróidais).

Análise histológica

[0127] Foram realizados estudos histológicos a fim de avaliar a modificação estrutural e também celular da pele causada pelas formulações contendo lapachol. As amostras de orelhas, coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, foram fixadas em solução de Alfac (85% álcool 80° GL, 10% formaldeído 40% e 5% ácido acético) por 16 h. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina. Para avaliação da espessura da epiderme foi utilizada lente ocular graduada. A infiltração celular (leucócitos) foi avaliada em áreas representativas utilizando aumento de 200 e/ou 400 x, sendo fotografadas para avaliação histopatológica.

[0128] A análise por microscópica óptica das orelhas, após a aplicação do óleo de cróton, revelou o aparecimento de infiltração de células inflamatórias, associadas com os vasos sanguíneos dilatados. Todos os eventos foram reduzidos após a aplicação tópica das formulações contendo lapachol. Os resultados apresentados na figura 12 mostram que a aplicação de óleo de cróton causa aumento na espessura total da orelha (B) e é possível notar o aumento na concentração de neutrófilos (pontos mais escuros). O tratamento com o veículo não causou alteração significativa no

tecido (A).

[0129] Ainda na figura 12, as imagens C, D, E, F, G e H comprovam que a aplicação de formulações contendo lapachol foi capaz de reduzir expressivamente o edema e a quantidade de células no tecido das orelhas causado pelo óleo de cróton. Mais uma vez, ressalta-se a significativa atividade das microemulsões ME 2 e ME 4, onde, após tratamento, as orelhas (imagens D e F, respectivamente) apresentaram apenas discreto edema e infiltrado neutrolinfocitário.

Edema de pata induzido pela aplicação tópica de carragenina

[0130] A atividade antiedematogênico foi avaliada pelo teste do edema da pata de camundongo de acordo com um método descrito por Winter et al., 1962, no qual se utilizou, para a indução do edema, injeção de carragenina na pata dos camundongos. Foram analisados dois grupos - controle (negativo) e tratado.

[0131] Os camundongos (n = 6) foram randomizados e atribuídos aos grupos experimentais. As formulações contendo lapachol (15 mg/kg) foram aplicadas a pele dorsal raspada de camundongos e o local de aplicação gentilmente massageado, de modo a permitir uma boa distribuição e penetração do fármaco na pele. Após o tratamento, os animais foram alojados individualmente e, 30 minutos mais tarde, 100 de uma suspensão de carragenina em solução salina (1% p/v) foi injetada na superfície plantar da pata direita. As patas esquerdas receberam 100 µL de solução salina e serviram como controle negativo. O volume das patas foi medido em sextuplicata, nos tempos 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção do agente flogístico, utilizando do hidroplestismógrafo. O aumento percentual das patas foi calculado através da expressão:

$$E(\%) = \frac{(Vf - Vi)}{Vi} x\ 100$$

Onde:

E(%) = aumento percentual do volume da prata

V_i = Volume inicial

V_f = volume final

[0132] O edema médio da pata no grupo de camundongos tratados com

formulações contendo lapachol foi comparado com o dos camundongos tratados com salina (controle negativo) e a percentagem de inibição na formação do edema foi determinada utilizando a seguinte equação:

[0133] O teste de edema de pata carragenina-induzido é uma técnica largamente utilizada nos estudos de fármacos anti-inflamatórios, tanto esteróidais, como não- esteróidais. Este tipo de teste induz uma reação anti-inflamatória em duas diferentes fases. A fase inicial, que ocorre entre 0 e 2,5 horas depois da injeção do agente flogístico, tem sido relacionada à liberação de histamina e serotinina. O volume do edema atinge o seu máximo cerca de 3 horas pós-tratamento e, em seguida, começa a declinar. A fase final tem sido atribuída à inflitração de neutrófilos e à produção de radicais livres. O edema produzido entre essas duas fases provavelmente é devido à liberação de bradicinina, que mais tarde irá induzir a biossíntese de prostagladinas, que são responsáveis pela formação do exudato inflamatório. Sabe-se, também, que a expressão da COX-1 e COX-2 é máxima na fase inicial e na fase final, respectivamente, do edema de pata induzido por carragenina.

[0134] A tabela 10 e a figura 13 mostram o efeito da administração 15 mg/Kg de lapachol por peso do animal, a partir de diferentes formulações, além de solução salina como controle negativo. Nelas, pode-se observar que no grupo controle (salina) o edema na pata causado pela administração de carragenina aumentou durante as 5 horas de observação. Além disso, pode-se verificar que nas formulações ME 1, ME 2, Gel e Emulgel, o lapachol exerceu uma significativa redução do edema a partir da segunda hora de experimento e esta ação foi mantida ao longo do tempo. As demais formulações apresentaram este mesmo comportamento a partir de decorridas 3 horas de experimento.

[0135] As formulações ME 1 e ME 2 apresentaram uma inibição máxima do edema na terceira hora de experimento (63.27 e 74.52%, respectivamente). Entretanto, ambas as formulações já apresentaram atividade significativa

após duas horas de ensaio (inibições de 61.53% e 65.68%, respectivamente).

[0136] A formulação gelificada, quando comparada com as demais formulações em estudo, foi a que exibiu uma maior inibição do edema (77,73%), entretanto esse pico só foi alcançado após 4 horas de ensaio. As demais formulações (ME 3, ME 4, ME 5 e emulgel) atingiram pico máximo de inibição ao final do experimento, ou seja, após 5 horas de início do experimento (58.86, 51.24, 75.59 e 62.4%, respectivamente).

Grupos	Aumento do volume da pata (AV mL)				
	1h	2h	3h	4h	5h
CN	0,27 ± 0,14	0,46±0,12	0,58 ± 0,24	0,62 ± 0,22	0,53 ± 0,21
ME 1	0,12 ± 0,09	0,17±0,11** (61,53%)	0,21 ± 0,09*** (63,27%)	0,33 ± 0,14** (46,92%)	0,21 ± 0,12** (60,62%)
ME 2	0,11 ± 0,07	0,15 ± 0,07** (65,68%)	0,14 ± 0,07*** (74,52%)	0,23 ± 0,12*** (63,01%)	0,20 ± 0,08*** (61,99%)
ME 3	0,25 ± 0,13	0,32 ± 0,21	0,32 ± 0,13* (44,11%)	0,32 ± 0,17** (48,23%)	0,22 ± 0,05** (58,86%)
ME 4	0,12 ± 0,08	0,28 ± 0,12	0,31 ± 0,13* (46,06%)	0,33 ± 0,21** (47,15%)	0,26 ± 0,12** (51,24%)
ME 5	0,21 ± 0,09	0,33 ± 0,16	0,35 ± 0,13* (39,25%)	0,26 ± 0,17*** (57,65%)	0,13 ± 0,08*** (75,59%)
GEL	0,15 ± 0,05	0,14 ± 0,06** (62,69%)	0,23 ± 0,08*** (60,50%)	0,13 ± 0,09*** (77,73%)	0,16 ± 0,08*** (69,45%)
EMULGEL	0,19 ± 0,06	0,19 ± 0,07** (60,09%)	0,31 ± 0,12** (48,16%)	0,25 ± 0,13*** (58,93%)	0,20 ± 0,08*** (62,40%)

Valor entre parênteses significa a percentagem de inibição.

Valores são expressos como média ± Desvio Padrão.

CN: Controle Negativo (salina).

*: diferença significativa (P<0.05), quando comparado com o respectivo controle.

**: existe diferença significativa (P<0.01), quando comparado com o respectivo controle.

***: existe diferença significativa (P<0.001), quando comparado com o respectivo controle.

Tabela 10 - Atividade anti-inflamatória de formulações contendo lapachol pela técnica de edema de pata induzida por carragenina 1%.

[0137] Estudos anteriores, demonstraram a ação antiedematogênica do lapachol com inibições máximas de 76% e 85% para as doses de 100 e 500 mg/kg administrada por via oral em ratos Wistar, respectivamente, 4 h após a injeção de carragenina 1%. Lira e colaboradores (2008) avaliaram a atividade anti- inflamatória da mesma formulação gelificada presente neste estudo (lapachol 15 mg/kg), a inibição máxima encontrada foi 50,16% em 4 horas, após a administração da carragenina.

[0138] Além disso, é importante observar que as formulações ME 1, ME 2, gel e emulgel contendo lapachol inibiram o edema a partir da segunda hora, agindo, assim, nas duas diferentes fases do processo inflamatório. Isto indica que estas formulações podem inibir diferentes mediadores químicos da inflamação (histamina, serotonina, bradicinina, prostagladinas), além disso, pode-se sugerir que o lapachol tenha efeitos inibitórios tanto da COX-1, quanto da COX-2. A maioria dos efeitos adversos associado à terapia com AINES, como lesões gástricas, dispepsia, náusea e vômitos, acredita-se ser devido à inibição da COX-1. Assim, considera-se que os principais benefícios da terapia com AINES são, principalmente, relacionados à inibição da enzima COX-2 no local da inflamação.

Análise estatística

[0139] Todos os dados foram tratados estatisticamente por ANOVA (GraphPad Prism versão 5.0 Software). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ e o nível de confiança utilizado foi de 95%.

[0140] Os dados apresentados são expressos em média ± erro-padrão da média (E.P.M.). Para o ensaio de edema de orelha, as diferenças obtidas entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA) de uma

via, seguindo-se do teste de Student-Newman-Keuls. Para o ensaio de edema de pata, as diferenças entre os grupos foram submetidas à ANOVA de duas vias, com medidas repetidas, seguindo-se do teste de Bonferroni.

[0141] Conforme mencionado acima, os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

1. Formulação farmacêutica **caracterizada** por compreender:

   I. Pelo menos um insumo farmacêutico ativo selecionado do grupo consistindo de lapachol, análogos do lapachol, derivados do lapachol ou combinações dos mesmos;

   II. Pelo menos um componente hidrofílico;

   III. Pelo menos um componente lipofílico;

   IV. Pelo menos um componente anfifílico.

2. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo insumo farmacêutico ativo estar em uma concentração entre 0,1% a 5%.

3. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por ser microemulsionada ou nanoemulsionada para administração por via tópica.

4. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo componente hidrofílico ser a água, em que a concentração máxima do componente hidrofílico é de 60% em relação ao peso da formulação.

5. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo componente lipofílico ser selecionado do grupo consistindo de miristato de isopropila, ácido oleico, óleo de oliva, óleo de babaçu ou combinações dos mesmos.

6. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelos componentes anfifílicos serem compostos não iônicos.

7. Formulação, de acordo com a reivindicação 1 ou 6, **caracterizada** pelo componente anfifílico compreender pelo menos um tensoativo selecionado do grupo consistindo de: polioxietilados, oleatos de poliglicerol, polissorbatos, polietilenoglicóis, oleatos de sorbitano ou combinações dos mesmos.

8. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo componente anfifílico estar presente com concentração mínima de 30% em relação ao peso da formulação.

9. Formulação, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo componente anfifílico ser formado pela combinação de um tensoativo polioxietilado e um tensoativo polissorbato; em que o tensoativo polioxietilado é selecionado do grupo consistindo de óleo de ricínio polioxietilado, macrogolglicerol ricinoleato, óleo de castor potioxil 35 ou combinações dos mesmos; em que o tensoativo polissorbato é selecionado do grupo consistindo de Polissorbato 20, Tween 20 ou combinações dos mesmos; e em que a proporção de tensoativo polioxietilado e tensoativo polissorbato está entre 1:5 à 5:1 (p/p).

10. Uso da formulação farmacêutica conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** por ser na preparação de um medicamento para tratar distúrbios e doenças selecionadas do grupo consistindo de: condições inflamatórias, cancerígenas, virais, microbianas, malária ou combinações das mesmas.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelos distúrbios e doenças serem condições inflamatórias.

12. Uso da formulação, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelas condições inflamatórias serem selecionados do grupo consistindo de: psoríase, otite, bursite, tendinite, sinusite ou combinações das mesmas.

13. Uso da formulação, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo medicamento ser para administração via dérmica ou transdérmica.

14. Uso da formulação farmacêutica conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** por ser na preparação de uma composição cosmética ou nutracêutica.

FIGURAS

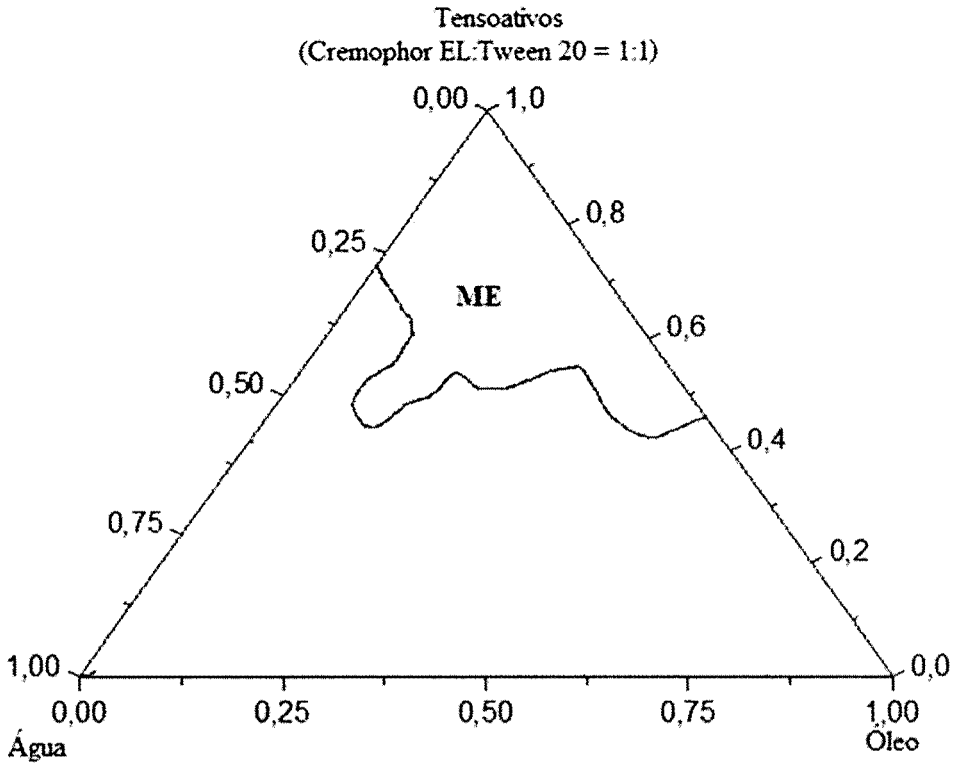


Figura 1

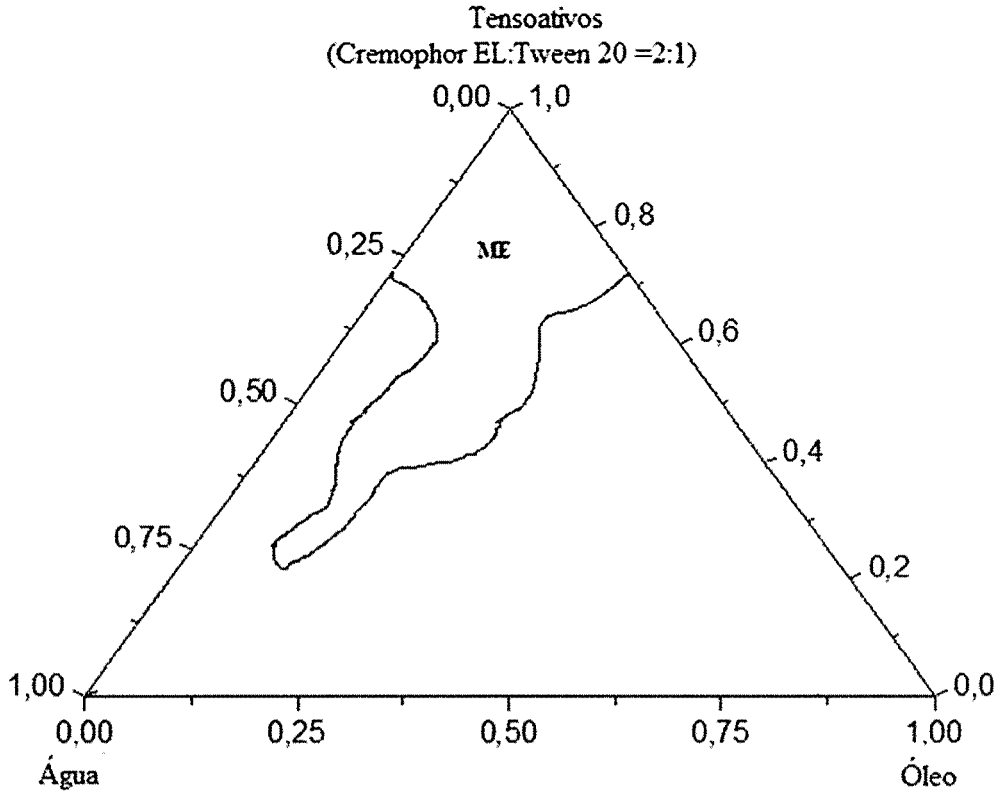

Tensoativos
(Cremophor EL:Tween 20 =2:1)
0,00
1,0
0,8
0,25
ME
0,6
0,50
0,4
0,75
0,2
1,00
0,0
0,00
0,25
0,50
0,75
1,00
Água
Óleo

Figura 2

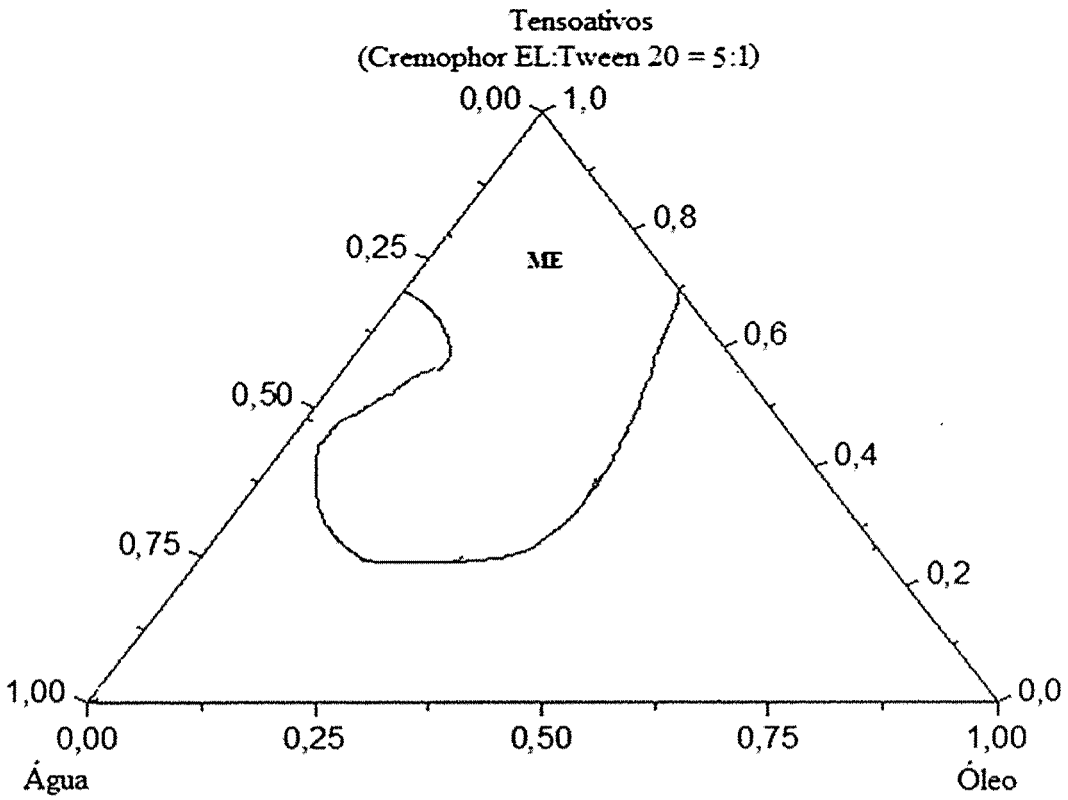

Tensoativos
(Cremophor EL:Tween 20 = 5:1)
0,00
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,25
0,50
0,75
1,00
ME
1,00
0,00
0,25
0,50
0,75
1,00
Água
Óleo

Figura 3

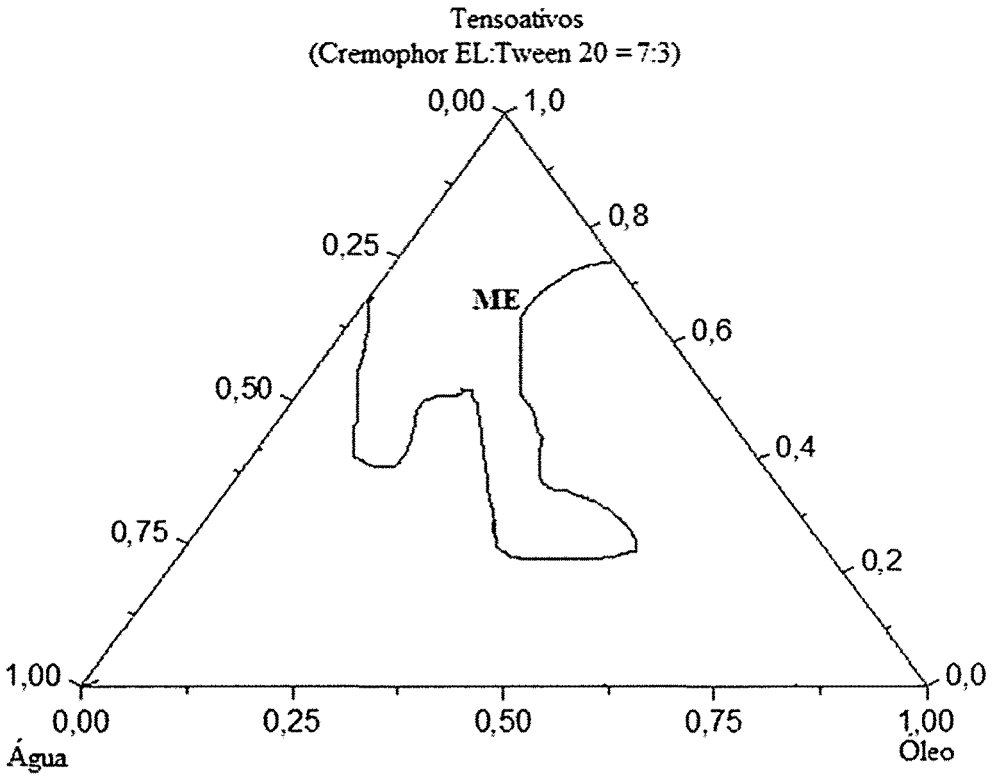

Tensoativos
(Cremophor EL:Tween 20 = 7:3)
0,00
1,0
0,8
0,25
ME
0,6
0,50
0,4
0,75
0,2
1,00
0,0
0,00
0,25
0,50
0,75
1,00
Água
Óleo

Figura 4

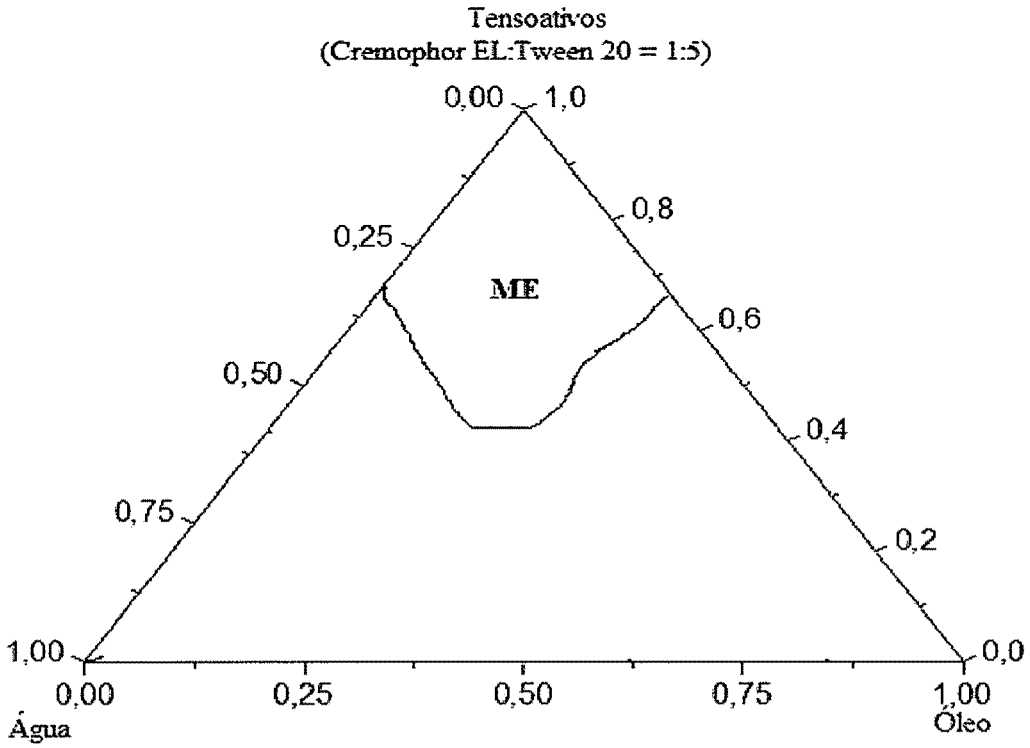


Figura 5

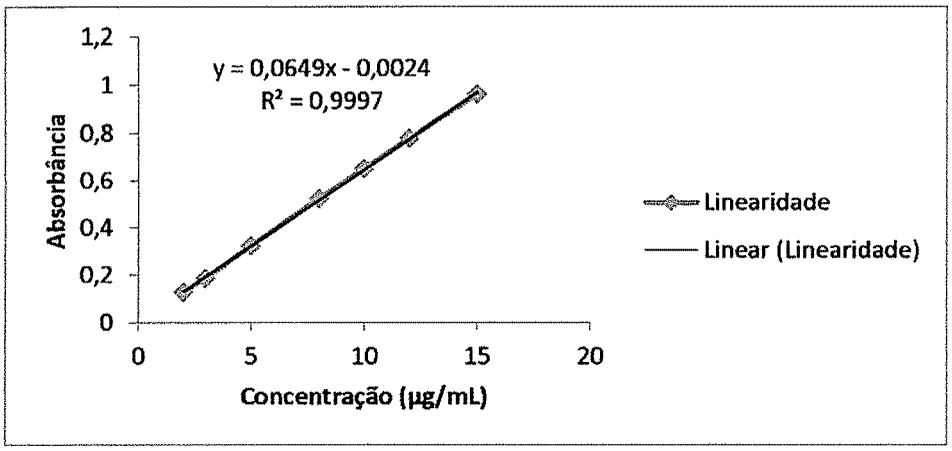


Figura 6

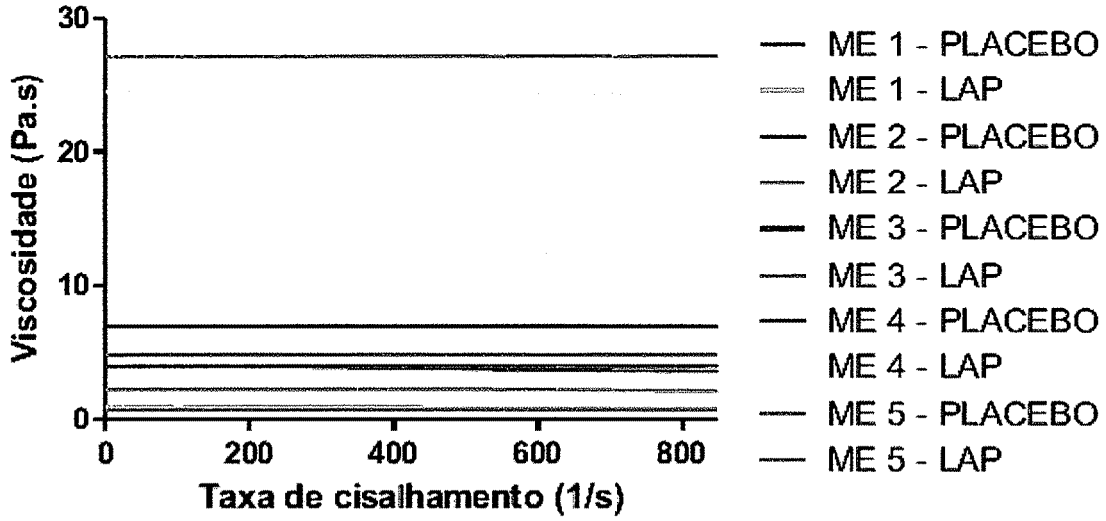


Figura 7

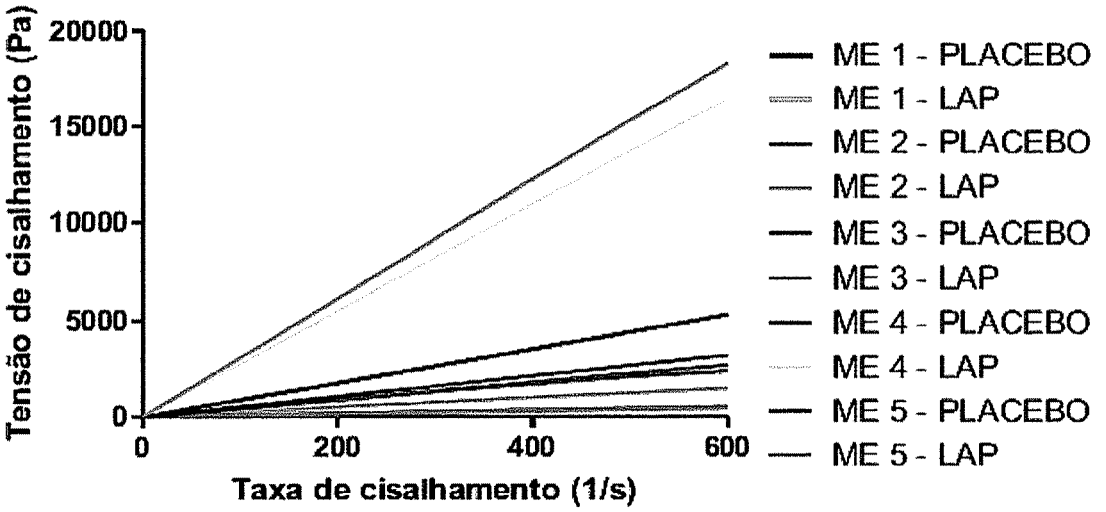


Figura 8

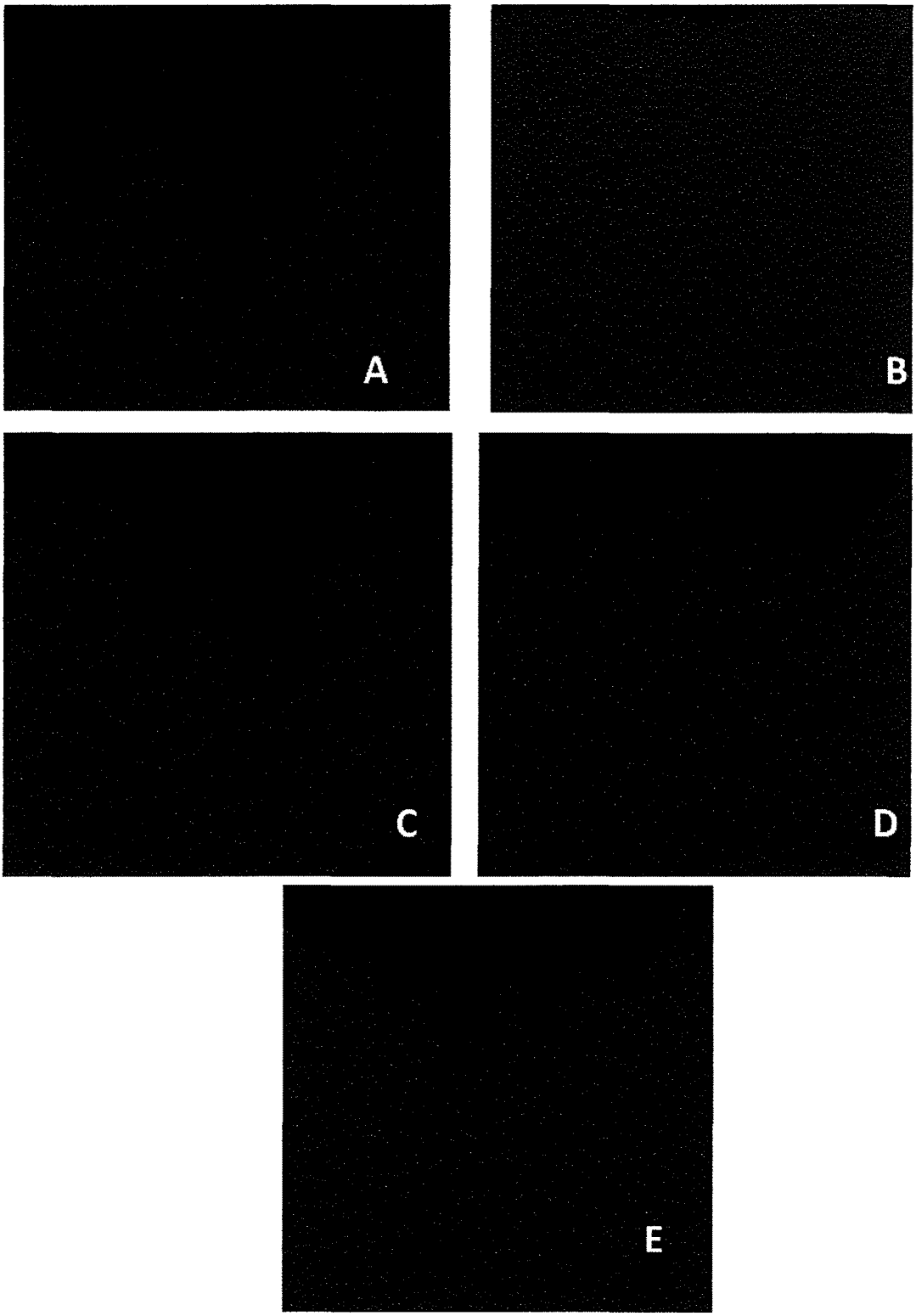


Figura 9

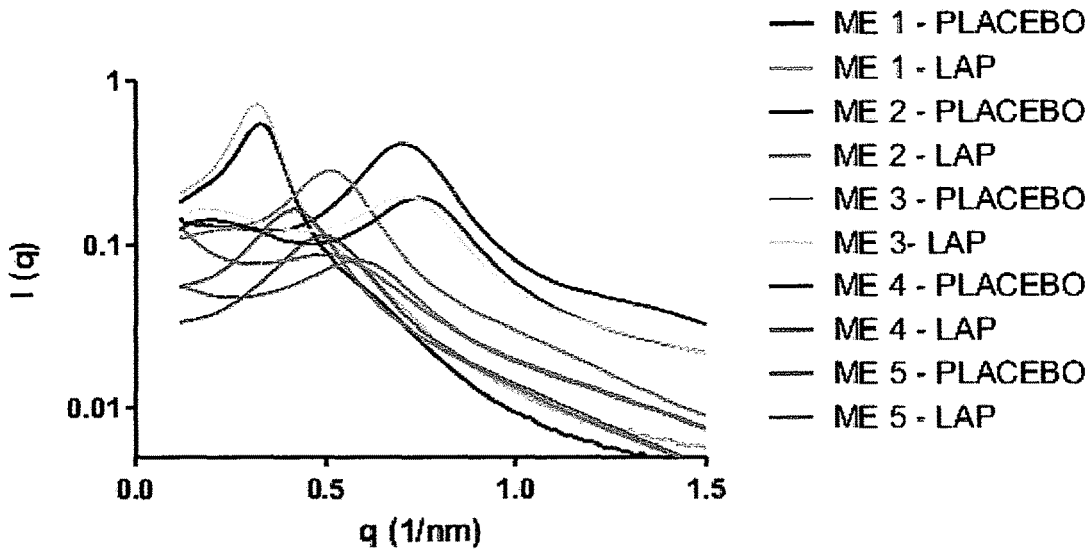


Figura 10

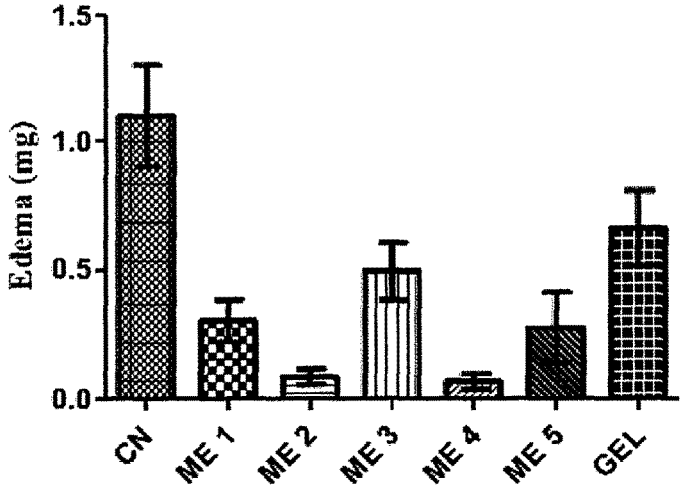


Figura 11

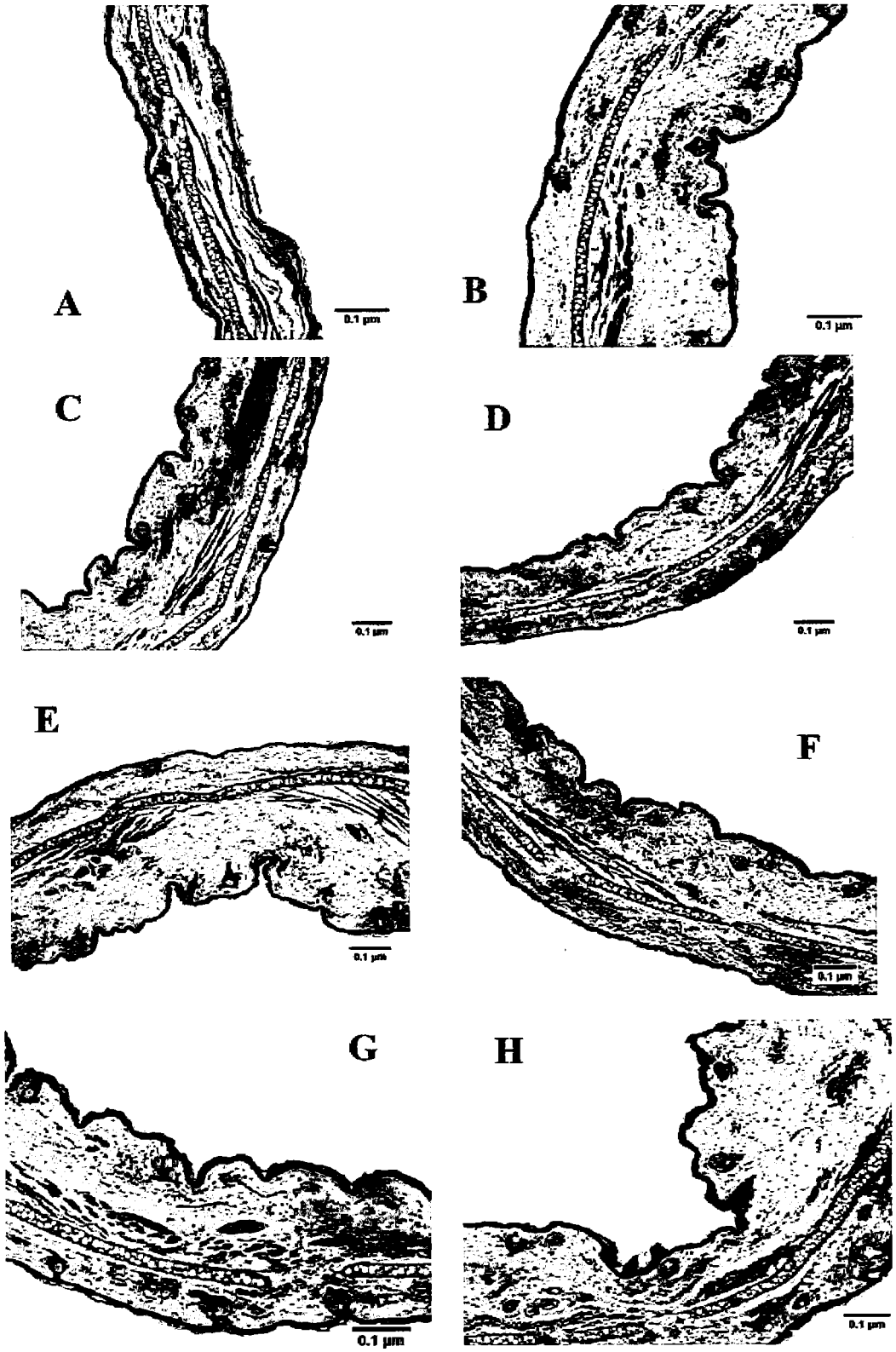


Figura 12

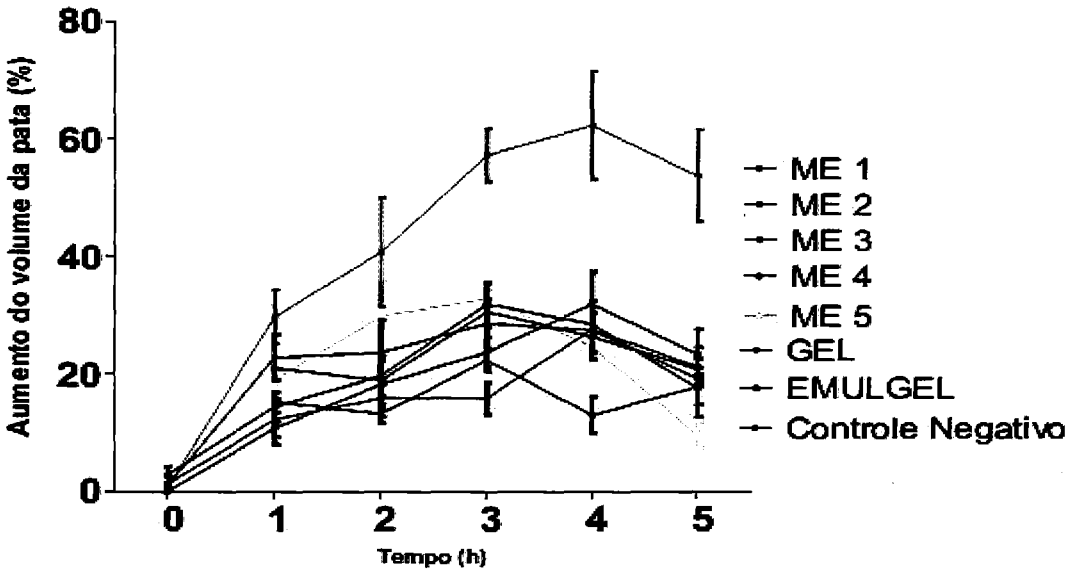

80
60
40
20
0
Aumento do volume da pata (%)
0
1
2
3
4
5
Tempo (h)
ME 1
ME 2
ME 3
ME 4
ME 5
GEL
EMULGEL
Controle Negativo

Figura 13

Resumo

FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

A presente invenção descreve uma formulação farmacêutica aprimorada, bem como o uso da mesma na preparação de um medicamento, uma composição cosmética ou uma composição nutracêutica. Mais especificamente, a presente invenção descreve uma formulação farmacêutica composta por pelo menos um insumo farmaceuticamente ativo selecionado do grupo consistindo de lapachol, análogos do lapachol, derivados do lapachol ou combinações dos mesmos, pelo menos um componente hidrofílico, pelo menos um componente lipofílico, e pelo menos um componente anfifílico. A presente invenção se situa nos campos da farmácia e química.