MARIA HELENA DOS ANJOS RODRIGUES AMARAL

ESTUDO DO NAPROXENO EM FORMAS DE APLICAÇÃO CUTÂNEA

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO

1997

MARIA HELENA DOS ANJOS RODRIGUES AMARAL

ESTUDO DO NAPROXENO EM FORMAS DE APLICAÇÃO CUTÂNEA

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO

1997

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, para obtenção do Grau de Mestre em Controlo de Qualidade.

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Fernanda Guedes Bahia agradeço o bom acolhimento, a valiosa orientação científica e a disponibilidade para resolver os problemas e as dúvidas que foram surgindo no decurso da realização da presente dissertação.

Ao Professor Doutor José Manuel de Sousa Lobo agradeço a simpatia, a valiosa orientação científica e os úteis esclarecimentos prestados durante a realização da presente dissertação.

Aos Professores Doutores Luís Vasco Nogueira Prista e Rui Manuel Ramos Morgado agradeço as palavras acolhedoras e o interesse sempre demonstrado.

Ao Dr. Paulo Costa agradeço a ajuda, a amizade e as úteis sugestões que contribuíram para a concretização deste trabalho.

Ao Dr. Edmundo Caldas Vilar agradeço o carinho e as palavras amigas.

Aos Professores Doutores Domingos Ferreira, Delfim Santos e Carlos Maurício Barbosa agradeço a ajuda e a amizade dispensadas.

À Dra. Rosa Pena Ferreira e ao Dr. Paulo Lobão agradeço a simpatia e a amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica D. Adelina Resende, Sr. Basílio Costa e Sr. Joaquim Ribeiro agradeço a simpatia e a ajuda prestada.

A todos os meus familiares, colegas de Mestrado e amigos agradeço todo o apoio e a amizade dispensados.

Cumpre-me ainda agradecer:

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, Programa Praxis XXI, o apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia do Porto.

À Dra. Ema Brojo do Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia do Porto.

Aos Drs. Carlos Queirós e Francisco Silva do Laboratório de Química-Orgânica da Faculdade de Farmácia do Porto.

À BIAL pela avaliação do teor de água.

Ao Prof. Doutor José António Silva pelos ensaios de viscoelasticidade.

À BASF pela cedência da 2-pirrolidona.

RESUMO

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINE) são utilizados numa grande variedade de processos inflamatórios. O naproxeno, ácido S-2-(6--metoxi-2-naftil) propiónico, é um potente anti-inflamatório não esteróide com propriedades analgésicas e antipiréticas. No entanto, a administração oral deste tipo de compostos está geralmente associada a efeitos indesejáveis principalmente a nível gastro-intestinal. Por este motivo, têm sido investigadas vias alternativas para a administração deste tipo de fármacos.

A aplicação cutânea de AINE apresenta vantagens em relação a outras vias de administração. No entanto, as propriedades de barreira da pele limitam a penetração de muitos compostos com propriedades farmacêuticas como naproxeno. Um processo de minimizar este obstáculo consiste na incorporação de vários promotores de absorção no veículo.

Neste trabalho foram preparadas cinco formulações em creme contendo 10% (m/m) de naproxeno e diferentes promotores de absorção (ácido oleico, propilenoglicol, *Tween 80*, laurilsulfato de sódio e 2--pirrolidona). Com a finalidade de se escolher a formulação com maior poder de promoção da penetração do naproxeno, foram realizados ensaios de difusão "in vitro" através de pele excisada de rato. Posteriormente, a formulação que apresentou melhores características organolépticas e boa penetração "in vitro" foi submetida a ensaios de controlo e verificação da estabilidade.

Foram também realizados ensaios de absorção "in vivo" em ratos da espécie Wistar-Lewis e foi estabelecida uma comparação entre o creme com melhor poder de penetração e um gele comercializado em Portugal, contendo 10% (m/m) de naproxeno.

ABSTRACT

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are useful in a wide variety of inflammatory diseases. Naproxen, S-2-(6-methoxy-2-naphtyl) propionic acid, is a potent nonsteroidal anti-inflammatory drug with analgesic and antipyretic properties. Like other NSAIDs, the most common side effect of naproxen in oral dosage forms is gastrointestinal irritation. Thus, alternative routes of administration for these drugs are being currently investigated.

Topical administration of NSAID drugs offers several advantages over conventional routes of drug administration. However, the barrier properties of intact skin limit the permeation of many pharmaceutical substances such as naproxen. One strategy to minimize this disadvantage is the incorporation of various skin permeation enhancers into the vehicle.

In the present study, five different formulations of naproxen (10%, w/w) with penetration enhancers (oleic acid, propylenoglicol, *Tween 80*, sodium lauryl sulphate and 2-pyrrolidone) were prepared. In order to find the formulation wich provide a higher degree of naproxen penetration, "in vitro" diffusion assays into hairless rat skin were performed.

The formulation showing the best "in vitro" penetration and good organoleptic properties was submitted to a series of quality control and stability assays.

"In vivo" absorption assays employing Wistar-Lewis rats were also performed with the best formulation and a comparison was establish between this one and a commercial gel containing naproxen (10%, w/w).

ÍNDICE

CAPÍTULO I
CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. APLICAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS 2
1.1.1. A pele 2
1.1.2. Vias de penetração cutânea 4
1.1.3. Absorção percutânea 5
1.2. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES 7
1.2.1. Derivados do ácido propiónico 8
1.2.2. Naproxeno 10
1.2.2.1. Generalidades 10
1.2.2.2. Características físico-químicas 10
1.2.2.3. Farmacocinética 11
1.2.2.4. Actividade terapêutica 12
1.2.2.5. Mecanismo de acção 13
1.2.2.6. Contra-indicações 14
1.2.2.7. Efeitos indesejáveis 14
1.2.2.8. Interacções medicamentosas 15

CAPÍTULO II
VERIFICAÇÃO DO NAPROXENO (MATÉRIA-PRIMA)

2.1. INTRODUÇÃO 18
2.2. IDENTIFICAÇÃO 19
2.2.1. Poder rotatório específico (V.6.6. da F.P.V - Ensaio A) 19
2.2.2. Determinação do ponto de fusão (V.6.11.1 F.P.V-Ensaio B) 20
2.2.3. Espectro de Infravermelho (V.6.18 da F.P.V - Ensaio D) 21
2.2.4. Espectro de Ultravioleta (V.6.19 da F.P.V - Ensaio C) 22
2.2.5. Ensaio E da monografia do naproxeno da F.P. V 24
2.2.6. Discussão dos resultados 24
2.3. SUBSTÂNCIAS APARENTADAS 24
2.3.1. Cromatografia em camada fina (F.P.V) 24
2.3.2. Perda por secagem (F.P. V) 27
2.4. DOSEAMENTO 27
2.5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 28

CAPÍTULO III

ESTUDO DE FORMULAÇÃO

3.1. ESTUDO DE UM MÉTODO DE DOSEAMENTO DO NAPROXENO POR HPLC 31

3.2. PRÉ-FORMULAÇÃO 36

3.2.1. Introdução 36

3.2.2. Solubilidade 37

3.2.3. Índice de lipofilia 41

3.3. FORMULAÇÃO 46

3.3.1. Introdução 46

3.3.2. Preparação de um creme contendo naproxeno 48

3.3.3. Ensaios de libertação "in vitro" do naproxeno 50

3.3.4. Ensaio de difusão "in vitro" do naproxeno 56

3.3.4.1. Preparação das membranas biológicas 58

3.3.4.2. Montagem e funcionamento do sistema de difusão 59

3.4. FORMULAÇÃO DE CREMES CONTENDO PROMOTORES DE ABSORÇÃO 63

3.4.1. Introdução 63

3.4.2. Preparação dos cremes contendo promotores de absorção 71

3.4.3. Ensaio de difusão "in vitro" do naproxeno 72

3.4.4. Comparação dos cremes com um gele comercializado em Portugal 78

3.5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 81

CAPÍTULO IV
CONTROLO DE QUALIDADE DO PRODUTO ACABADO

4.1. INTRODUÇÃO 85
4.2. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS 88
4.3. DETERMINAÇÃO DO pH 90
4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA 92
4.5. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS 93
4.5.1. Determinação dos germes aeróbios viáveis totais em placas de gelose 95
4.5.2. Pesquisa de microrganismos específicos 96
4.6. PENETROMETRIA 97
4.7. COMPORTAMENTO REOLÓGICO 100
4.7.1. Viscosidade 102
4.7.2. Propriedades dinâmicas 108
4.8. IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO DO NAPROXENO NO PRODUTO ACABADO 111
4.9. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 114

CAPÍTULO V
AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO "IN VIVO" DO NAPROXENO

5.1. INTRODUÇÃO 117
5.2. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE DOSEAMENTO DO NAPROXENO NO SORO 119
5.2.1. Recolha de sangue e separação do soro 119
5.2.2. Extracção e doseamento do naproxeno no soro 120
5.3. ABSORÇÃO "IN VIVO" DO NAPROXENO VEICULADO NO CREME F_3 E NO GELE COMERCIAL 124
5.4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 128

CAPÍTULO VI

CONSIDERAÇÕES FINAIS 131

ANEXO 1 135
ANEXO 2 139

BIBLIOGRAFIA 143

ABREVIATURAS

ABS - Absorvência

AINE - Anti-inflamatório não esteróide

AU - Absorption Units

CMC - Concentração micelar crítica

EHL - Equilíbrio hidrófilo-lipófilo

F.P.V - Farmacopeia Portuguesa V

HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão

I.L. - Índice de lipofilia

I.V. - Infravermelho

LsS - Laurilsulfato de sódio

O/A - Óleo/água

ODS - Octadecilssilano

p.a - pró-análise

P.F. - Ponto de fusão

PG - Prostaglandinas

rpm - rotações por minuto

T80 - *Tween 80*

U.V. - Ultravioleta

SNC - Sistema nervoso central

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. APLICAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS

1.1.1. A pele

Desde a antiguidade que os povos utilizam uma grande variedade de substâncias medicinais com a finalidade de tratar ou prevenir as doenças. Os antigos egípcios, os gregos e outras civilizações deixaram registos com a descrição de muitas preparações medicinais que eram administradas numa grande variedade de formas e formulações, utilizando diferentes vias de administração.

A via de administração cutânea constitui uma boa alternativa para a administração de fármacos de diversas categorias. Para se poder compreender o processo de penetração cutânea dos fármacos é necessário conhecer as características estruturais da pele.

A pele dos mamíferos é um orgão dinâmico, com diversas funções biológicas. A característica funcional mais óbvia apresentada pela pele corresponde às suas propriedades de barreira. As outras funções da pele incluem a termorregulação, o suporte mecânico, a percepção neurossensorial, a secreção glandular e a actividade metabólica (1,2).

Pela variedade de funções apresentadas pode concluir-se que a pele é um orgão complexo composto por diversas estruturas e tipos de células, como pode ser observado na Figura 1.

Na pele podem considerar-se duas camadas principais: a epiderme e a derme. A epiderme dispõe-se mais externamente e apresenta-se dividida em várias camadas. A camada mais externa é o estrato córneo, o qual é revestido pelo *sebum* que é um fluido lipófilo complexo segregado pelas glândulas sebáceas. O estrato córneo é constituído por células queratinosas

desidratadas ou corneócitos rodeados por lípidos dispostos ordenadamente em camadas. Os corneócitos são células bastante resistentes ao ataque químico e enzimático.

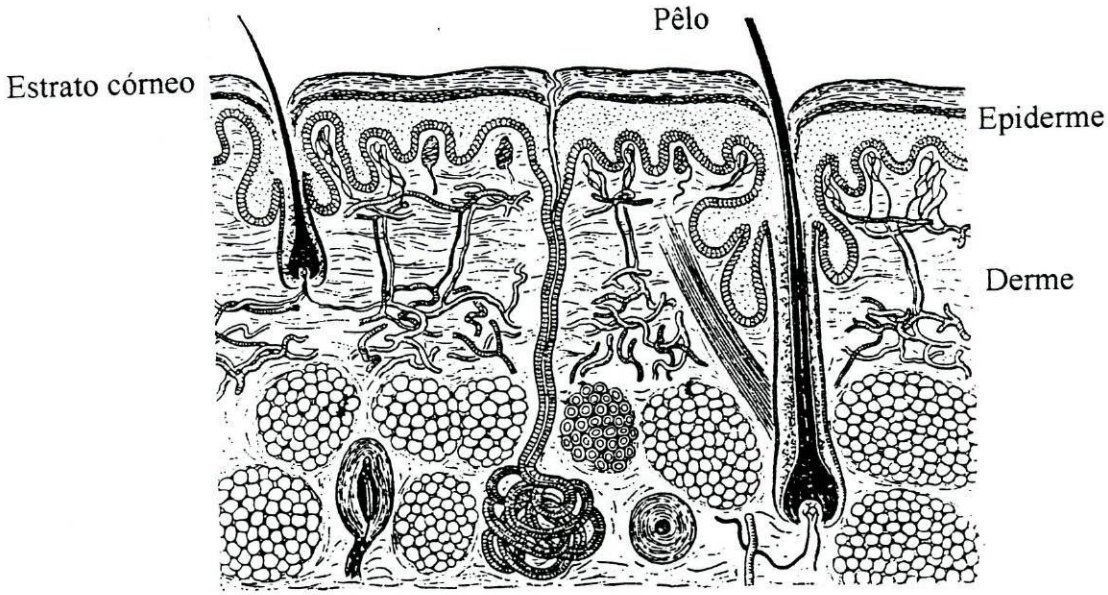


Fig. 1 - Estrutura da pele (3).

Pode considerar-se a barreira cutânea comparável a um muro cujos tijolos são os corneócitos ricos em queratina e em que o cimento é constituído pelos lípidos dispostos em bicamadas. A função de barreira do estrato córneo deve-se principalmente à organização estrutural e à natureza química dos lípidos (4).

Abaixo do estrato córneo situa-se a epiderme viável constituída por células vivas. Esta camada é menos densa e mais hidratada que o estrato córneo. Sob a camada epidérmica situa-se a derme onde se podem encontrar vasos sanguíneos, nervos, fibras e as bases dos folículos pilosos, integrados no tegumento conjuntivo suportado por adipócitos.

1.1.2. Vias de penetração cutânea

O estrato córneo constitui a principal barreira cutânea, embora devam também ser tidas em consideração as propriedades de barreira apresentadas pelas camadas mais internas da pele.

A Figura 2 apresenta um diagrama esquemático das principais vias de permeação cutânea.

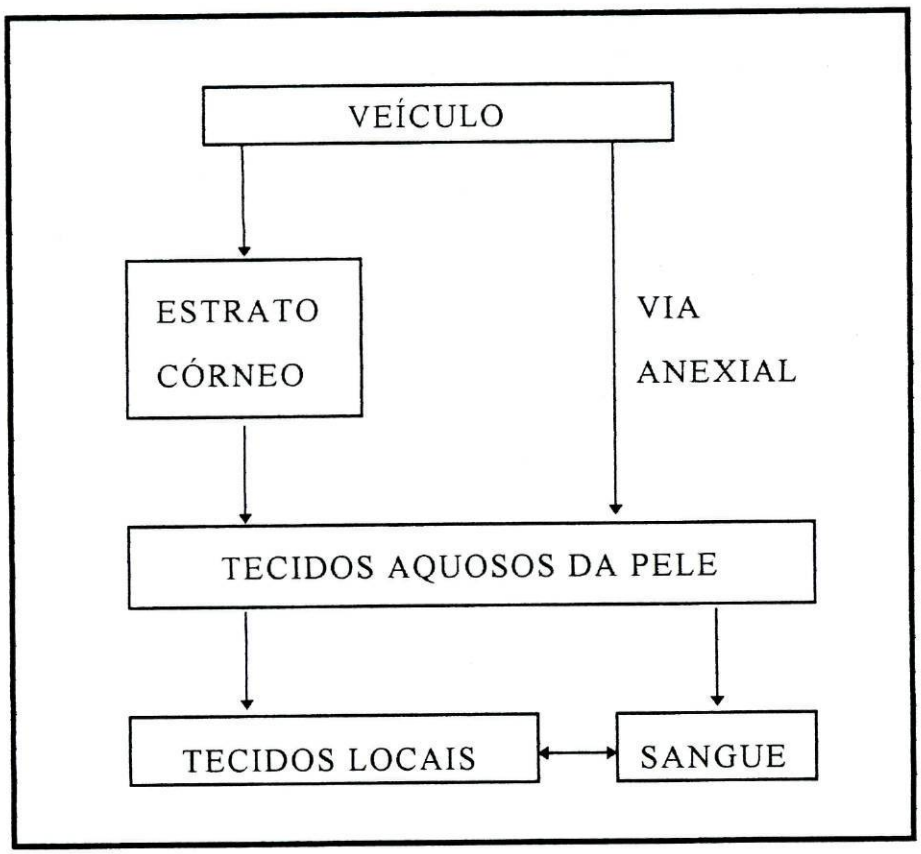


Fig. 2 - Principais vias de permeação cutânea (2).

A penetração através dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas e sudoríparas (via anexial) é uma via alternativa à passagem transepidérmica (intra ou intercelular) dos compostos ionizados, de peso molecular mais elevado ou com um coeficiente de partilha O/A mais baixo.

1.1.3. Absorção percutânea

A permeabilidade da pele pode ser influenciada por diversos factores, tais como: a hidratação, a temperatura e a idade da pele, o veículo e o coeficiente de partilha O/A do fármaco. Substâncias com coeficientes de partilha superiores a uma unidade têm, em regra, boas condições de penetração, as quais melhoram se o peso molecular do fármaco e o seu ponto de fusão forem pouco elevados. Os veículos pouco viscosos geralmente favorecem a penetração.

Através da equação de Einstein-Stokes:

$$K = RT / 6 \pi r \eta N \quad \text{(Eq. 1)}$$

(em que K é o coeficiente de difusão, R é a constante dos gases perfeitos, T é a temperatura absoluta, r é o raio das partículas que difundem, η é a viscosidade do meio e N é o número de Avogadro), pode concluir-se que a difusão é mais fácil para produtos muito divididos (pequeno raio) num meio pouco viscoso.

Outros factores que podem ter influência na absorção cutânea dos fármacos incluem o tipo de formulação, a duração e o local de aplicação e também o grau de hidratação cutânea (5).

As características de libertação variam de acordo com as interacções fármaco-veículo, veículo-pele e fármaco-pele. Assim, a utilização de uma determinada formulação pode favorecer a penetração de um determinado composto relativamente a outros com a mesma acção terapêutica.

A penetração através do estrato córneo ocorre segundo um processo de difusão passiva e pode ser representada matematicamente pela lei de Fick a seguir indicada:

$$J = DKC/h \quad \text{(Eq. 2)}$$

onde J (fluxo) é a quantidade de fármaco que atravessa a membrana por unidade de área e por unidade de tempo, h é a espessura da membrana, D é o coeficiente de difusão do fármaco na membrana, K é o coeficiente de partilha membrana/veículo e C é a concentração do fármaco. Considerando-se o sistema no estado de equilíbrio e sendo C constante, a equação anterior pode ser simplificada:

$$J = Kp\ C \quad \text{(Eq. 3)}$$

sendo Kp a constante de permeabilidade.

A actividade termodinâmica máxima de um soluto num determinado solvente ocorre no seu ponto de saturação. Uma diminuição da actividade termodinâmica de um composto no veículo aumenta a sua afinidade para o veículo e assim reduz a sua distribuição através da pele (6).

A penetração de qualquer fármaco através da pele envolve a difusão através do estrato córneo, distribuição na epiderme viável e subsequente passagem para a microcirculação da derme ou penetração nos tecidos mais profundos.

Resumindo tudo quanto foi referido acerca da absorção percutânea dos fármacos podem salientar-se como mais importantes as seguintes considerações:

- A absorção percutânea parece reger-se, principalmente, pelo princípio da difusão passiva.

- Embora se possa considerar a existência de mais do que uma barreira cutânea, o estrato córneo parece, no entanto, desempenhar um papel primordial na resistência contra a penetração cutânea, desempenhando também, em alguns casos, a função de reservatório.

- A concentração da substância que penetra, o local de aplicação e o estado de hidratação cutânea têm também um papel decisivo no processo de absorção percutânea.

Os fármacos podem ser aplicados topicamente com a finalidade de exercerem uma acção local ou sistémica. No primeiro caso, o alvo terapêutico pode ser a própria pele ou várias estruturas subjacentes como os músculos e as cavidades sinoviais (7).

1.2. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES

A medicação anti-inflamatória é constituída por fármacos ou fórmulas medicamentosas com a capacidade de eliminar, ou pelo menos atenuar, o estado inflamatório.

A inflamação é um conjunto de reacções que ocorrem numa sequência ordenada: dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos às proteínas, migração dos leucócitos dos capilares e subsequente desenvolvimento do exsudado celular (8).

Independentemente da causa, a acção anti-inflamatória consiste no desaparecimento do eritema, devido a vasoconstrição, e na desidratação dos tecidos com edema (9). Para instituir, de modo conveniente, a medicação anti-inflamatória para aplicação cutânea, é necessário, em primeiro lugar, considerar o estado ou grau de inflamação.

Devido às suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas os anti--inflamatórios não esteróides (AINE) são muito utilizados na terapêutica antirreumatismal. Os compostos pertencentes a este grupo farmacológico actuam fundamentalmente por inibição da síntese das prostaglandinas PGD2, PGE2 e PGG2 (10).

Os ensaios clínicos dos fármacos AINE baseiam-se na quantificação das modificações observadas nas situações de inflamação (dor, tumefacção, calor, rubor e rigidez).

Os fármacos AINE subdividem-se em vários grupos os quais se encontram representados no Quadro I.

Quadro I - Classes de AINE e exemplos de fármacos.

Derivados salicilados	Ácido acetilsalicílico Ácido salicílico Salicilato de metilo
Derivados do ácido acético	Fentiazac Diclofenac
Derivados do ácido propiónico	Ibuprofeno Naproxeno Cetoprofeno
Derivados do ác. antranílico	Ácido niflúmico
Derivados do indol	Indometacina
Oxicams	Piroxicam

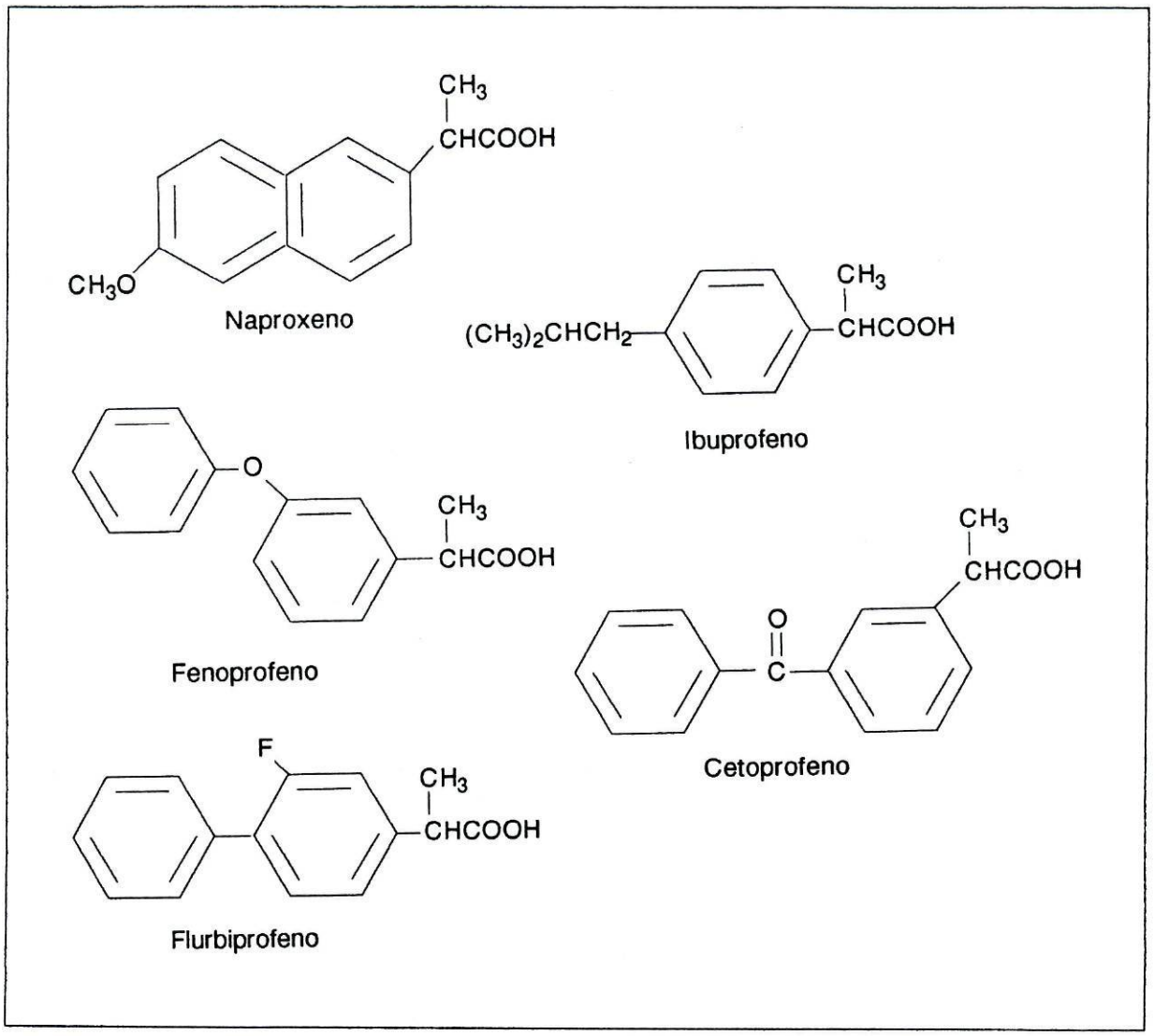
Os AINE aplicados na pele conseguem penetrar até uma profundidade de 3-4mm e a maior parte do fármaco que penetra é distribuída nos tecidos através da circulação sanguínea (11).

1.2.1. Derivados do ácido propiónico

Os AINE derivados do ácido propiónico representam um grupo de fármacos que apresentam vantagens em relação à aspirina, à indometacina e aos derivados pirazólicos, pois são, de um modo geral, mais bem tolerados.

As semelhanças entre os fármacos desta classe são muito mais relevantes do que as diferenças. As suas formas estruturais encontram-se representadas no Quadro II.

Quadro II - Estrutura molecular de alguns derivados do ácido propiónico.



O ibuprofeno foi o primeiro a ser utilizado na terapêutica, pelo que, a experiência com este fármaco é bastante superior. No entanto, o naproxeno sobressai relativamente aos outros AINE do mesmo grupo, pois o seu prolongado tempo de semi-vida permite uma administração eficaz de apenas duas vezes por dia.

1.2.2. Naproxeno

1.2.2.1. Generalidades

As propriedades farmacológicas e a utilização terapêutica do naproxeno foram revistos por Segre e por Allison e colaboradores (12). Na Farmacopeia Portuguesa V vem descrita a monografia deste composto (13).

O naproxeno é um pó cristalino branco ou quase branco, com sabor amargo e cheiro pouco activo. Quimicamente denomina-se ácido (S)-2-(6--metoxi-2-naftil)propiónico (Fig. 3), sendo obtido por acetilação do 6--metoxinaftaleno na posição 2 e conversão do grupo acetilo em CH(CH3)COOH por uma sequência de reacções - Willgerodt-Kindler, esterificação, alquilação e hidrólise - que conduzem ao DL-Naproxeno (14).

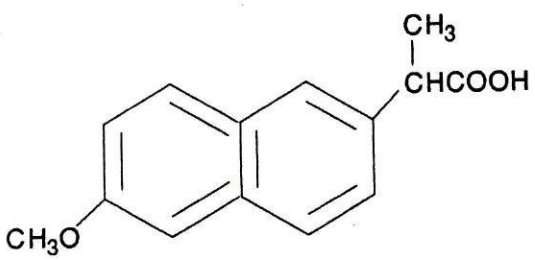


Fig. 3 - Estrutura química do naproxeno

1.2.2.2. Características físico-químicas

A fórmula molecular do naproxeno é $C_{14}H_{14}O_3$ a que corresponde uma massa molecular de 230,3.

O naproxeno é solúvel no álcool, no clorofórmio e no metanol, é pouco solúvel no éter e praticamente insolúvel na água, apresentando um pK_a de 4,2 a 25°C. Este composto funde entre os 154 e os 158°C (15,16).

1.2.2.3. Farmacocinética

O naproxeno é rapidamente absorvido quando administrado por via oral. A velocidade de absorção é influenciada pela presença de alimentos no estômago. Os picos de concentração plasmática ocorrem passadas duas a três horas após a administração oral e podem ser atingidos mais rapidamente no caso do naproxeno sódico, por isso, este é mais utilizado como analgésico. Uma dose de 500mg de naproxeno equivale a 550mg de naproxeno sódico (17).

O naproxeno também é bem absorvido por via rectal, mas os picos das concentrações plasmáticas são alcançados mais lentamente. A semi-vida plasmática do naproxeno é de cerca de 13 horas no homem (17).

Após doses terapêuticas usuais, o naproxeno fica quase totalmente ligado às proteínas plasmáticas. Esta propriedade influencia, sem dúvida, a capacidade do plasma de sequestrar o naproxeno e limita a sua distribuição nos tecidos.

A distribuição dos ácidos fracos como o naproxeno é afectada pela sua capacidade de permear as membranas celulares e outros tecidos lipídicos. A capacidade de partilha é, por sua vez, afectada por um certo número de factores, incluindo o pH da fase aquosa e o pK_a. O naproxeno tem um pk_a próximo de 4, pelo que, em meio plasmático, cujo pH é de 7,4, praticamente todo o fármaco se encontra na forma aniónica. As espécies aniónicas são pouco solúveis nos lípidos e consequentemente não apresentam propriedades de partilha favoráveis aos lípidos (18).

Além da via de administração oral e rectal, o naproxeno tem também sido bastante utilizado em formas de aplicação cutânea, apresentando-se, de um modo geral, bem tolerado pela pele humana. No entanto, apesar da sua elevada lipofilia, o naproxeno apresenta uma baixa biodisponibilidade após aplicação tópica (19).

No homem, aproximadamente 95% da dose absorvida é excretada pela urina sob a forma de naproxeno inalterado ou sob a forma de 6-orto--desmetilnaproxeno e seus derivados conjugados com sulfato ou com ácido glucurónico (12,20,21).

1.2.2.4. Actividade terapêutica

Em ensaios clínicos realizados em pacientes com artrite reumatóide, osteoartrite e artrite juvenil, o naproxeno demonstrou efeitos comparáveis à aspirina e à indometacina, mas apresentou uma menor incidência de efeitos indesejáveis a nível gastro-intestinal e a nível do sistema nervoso.

Estudos recentes têm demonstrado níveis significativos deste fármaco em tecidos profundos como o músculo e o líquido sinovial, após aplicação tópica. Esta característica representa uma vantagem quando se pretende o alívio de sintomas locais com doses baixas de fármaco, sendo reduzidas as possibilidades de ocorrência de efeitos sistémicos indesejáveis (22).

Além das propriedades anti-inflamatórias, o naproxeno apresenta também acção analgésica e antipirética (23). Em ensaios clínicos com dupla ocultação, este fármaco apresentou propriedades analgésicas em casos de dor pós-operatória, pós-parto e ortopédica. Em pacientes com dismenorreia, o naproxeno diminui a frequência e a intensidade das contracções uterinas por redução do nível das prostaglandinas no útero.

A LD50 oral do naproxeno é de 543mg/kg em ratos, 4110mg/kg em hamsters e superior a 1000mg/kg em cães (23).

No Quadro III estão representadas as principais indicações do naproxeno, as doses e as frequências de administração.

Quadro III - Doses de naproxeno recomendadas e frequência de administração em função do tipo de patologia (24).

Situação clínica	Dose	Frequência
Artrite reumatóide Osteoartrite Espondilite anquilosante	250,375 ou 500 mg	2 vezes/dia
Artrite juvenil	10 mg/kg	2 vezes/dia
Gota aguda	750-250 mg	3 vezes/dia
Dismenorreia	500-250 mg	3 a 4 vezes/dia
Tendinite, bursite	500-250 mg	3 a 4 vezes/dia
Artralgias, mialgias, contusões	-	Aplicar 2 vezes/dia

1.2.2.5. Mecanismo de acção

O mecanismo de acção do naproxeno ainda não foi bem esclarecido, mas parece estar relacionado com a inibição da síntese das prostaglandinas. O naproxeno tem capacidade de inibir a cicloxigenase (prostaglandina sintetase), uma enzima que cataliza a formação dos percursores das prostaglandinas (endoperóxidos) a partir do ácido araquidónico (17,25).

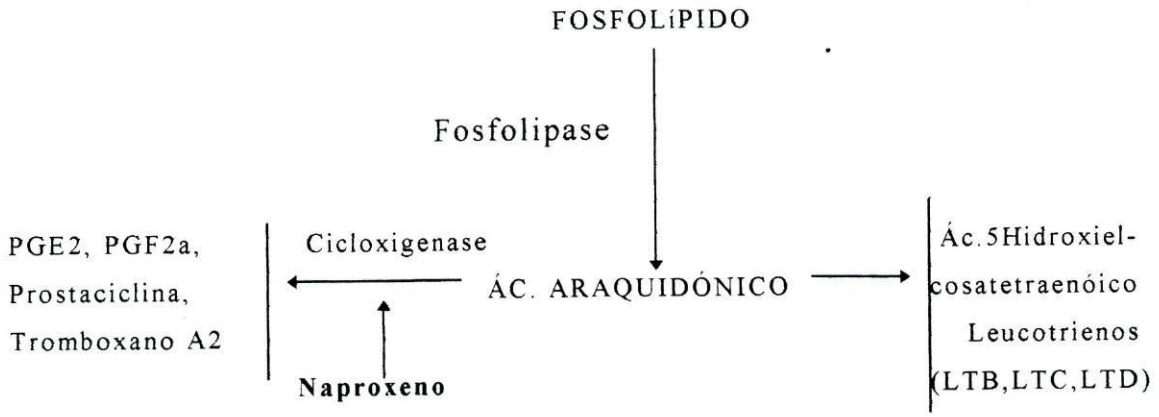


Fig.4-Metabolismo do ácido araquidónico e nível de actuação do naproxeno.

1.2.2.6. Contra-indicações

O naproxeno ou o seu sal sódico estão contra-indicados em pacientes com problemas gastro-intestinais e com alergia a estes compostos. Este fármaco não deve ser administrado a doentes em que a aspirina ou outros AINE induzam asma, rinite ou urticária.

Tem sido detectado naproxeno aniónico no leite de mulheres que amamentam, pelo que, a sua utilização nestes casos deve ser evitada. Apesar de não estar descrita a ocorrência de efeitos teratogénicos provocados pelo naproxeno, também não é aconselhável a sua utilização durante a gravidez.

1.2.2.7. Efeitos indesejáveis

As perturbações gastro-intestinais provocadas pelo naproxeno administrado oralmente variam desde dispepsias relativamente leves e azia, até náuseas, vómitos e hemorragia gástrica. No entanto, tem sido demonstrado que o naproxeno produz menos efeitos gastro-intestinais indesejáveis que os outros fármacos antirreumatismais (26).

Os efeitos indesejáveis ligados ao SNC variam de sonolência, tontura e sudorese, até fadiga, depressão e ototoxicidade. Reacções menos comuns incluem prurido e diversos outros problemas dermatológicos.

Como o naproxeno e os seus metabolitos são eliminados em grande escala (95%) por excreção urinária, deve ser utilizado com grande precaução por doentes com insuficiência renal. Tal como acontece com outros fármacos AINE, a administração prolongada de naproxeno pode provocar nefrite intersticial aguda com hematúria, proteinúria e, ocasionalmente, sindroma nefrótico.

1.2.2.8. Interacções medicamentosas

O naproxeno, tal como os outros AINE, pode reduzir o efeito hipotensor do propanolol e de outros β-bloqueadores.

O probenecide aumenta os níveis de naproxeno no plasma e prolonga significativamente a sua semi-vida plasmática.

A administração simultânea de metotrexato e naproxeno deve ser feita com precaução, pois este pode reduzir a secreção tubular do metotrexato aumentando a sua toxicidade.

Tem também sido demonstrada a possível ocorrência de interacções do naproxeno com as hidantoínas, com os anticoagulantes cumarínicos e com as sulfonamidas.

Este composto pode ser utilizado com segurança em combinação com os sais de ouro e/ou com os corticosteróides. No entanto, não é recomendada a sua utilização em associação com os salicilatos, pois há indícios de que a aspirina aumenta a velocidade de excreção do naproxeno (17).

Quadro IV - Especialidades farmacêuticas contendo naproxeno comercializadas em Portugal (24).

Naprosyn comprimidos (Janssen-Cilag)	250 mg e 500 mg
Naprosyn supositórios (Janssen-Cilag)	250 mg e 500 mg
Naprosyn gel (Janssen-Cilag)	10%
Naprosyn granulado (Janssen-Cilag)	500 mg
Reuxen comprimidos (Tecnifar)	250 mg e 500 mg
Reuxen supositórios (Tecnifar)	250 mg e 500 mg
Naproxeno comprimidos (Farmatrading)	250 mg e 500 mg

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

VERIFICAÇÃO DO NAPROXENO (MATÉRIA-PRIMA)

2.1. INTRODUÇÃO

Por matéria-prima entende-se toda a substância activa, ou não, que se emprega na produção de um medicamento, quer permaneça inalterável quer se modifique ou desapareça no decurso do processo.

As matérias-primas só devem ser adquiridas a fornecedores aprovados e, se for possível, a compra deve fazer-se directamente ao fabricante (27). É importante conhecer a identificação do fabricante para se ter a segurança que as matérias-primas foram preparadas por um método adequado, de modo que estas se apresentem isentas de qualquer tipo de resíduo indesejável ou até mesmo de vestígios dos solventes utilizados para efectuar as extracções. O conhecimento da identificação do fornecedor dá-nos, portanto, a garantia de que as matérias-primas foram preparadas segundo métodos aprovados, os quais conduzem à obtenção de substâncias de confiança, ou seja, matérias-primas eficazes e seguras.

O controlo de qualidade de uma determinada preparação farmacêutica inicia-se com a avaliação da qualidade da matéria-prima. É necessário garantir que o produto com o qual vai ser preparado o medicamento corresponde exactamente ao adquirido e que o mesmo apresenta um grau de pureza adequado ao fim a que se destina.

As matérias-primas podem ser analisadas de acordo com monografias de Farmacopeias, mas na indústria normalmente aos ensaios descritos acrescentam-se outros que têm por finalidade estabelecer regras específicas para a fórmula a preparar.

2.2. IDENTIFICAÇÃO

2.2.1. Poder rotatório específico (V.6.6. da F.P.V - Ensaio A)

O poder rotatório específico $(\alpha)_D^{20}$ de uma substância em solução é o ângulo de rotação α do plano de polarização no comprimento de onda da risca D do sódio (λ=589,3 nm) medido a 20°C numa solução da substância a ensaiar na concentração de 1g/ml referente a uma espessura de 1dm. O poder rotatório específico de uma substância sólida é sempre definido em relação a uma dada concentração num determinado solvente (28).

Segundo a F.P.V, o poder rotatório específico do naproxeno, calculado em relação à substância seca, deve estar compreendido entre +63° e +68,5°.

Aparelhagem e reagentes:

Polarímetro digital

POLARTRONIC UNIVERSAL

Schmidt & Haensch

Clorofórmio p.a (Merck)

Procedimento:

Dissolver 0,500g da amostra em clorofórmio e completar o volume até 25 ml com o mesmo solvente.

Determinar o zero do aparelho enchendo o tubo só com o solvente.

Encher o tubo com a solução da amostra.

Proceder à leitura do poder rotatório específico.

Cálculo do poder rotatório específico

Para substâncias sólidas em solução deve usar-se a fórmula:

$$(\alpha)_D^{20} = 100\ \alpha / l\ c \quad \text{(Eq. 4)}$$

em que:

α-ângulo de rotação em graus lido a 20±0,5° C

l-comprimento do tubo polarimétrico

c-concentração da substância em percentagem m/v

Resultados:

α(20±0,5°C) = +2,66°

l = 2 dm

c = 2,00%

$(\alpha)_D^{20}$ = + 66,5°

O valor do poder rotatório específico (+66,5°) obedece às especificações indicadas pela F.P.V.

2.2.2.Determinação do ponto de fusão (V.6.11.1 F.P.V-Ensaio B)

O ponto de fusão (P.F.) determinado pelo método do tubo capilar corresponde à temperatura à qual passam ao estado líquido as partículas sólidas da substância introduzida num tubo em coluna compacta.

Segundo a F.P.V o P.F. do naproxeno deve estar compreendido entre 154 e 158°C.

Aparelhagem:

Aparelho de fusão METTLER FP 62

O princípio de funcionamento do METTLER FP 62 baseia-se no facto de as substâncias reflectirem a luz incidente quando estão no estado cristalino e serem atravessadas por ela quando fundidas. É então possível determinar o ponto de fusão pelo comportamento óptico da amostra.

Resultados:

Valor médio do ponto de fusão da amostra após três determinações: 155,8°C.

O resultado obtido está entre os valores do intervalo de fusão indicado na F.P.V.

2.2.3. Espectro de Infravermelho (V.6.18 da F.P.V - Ensaio D)

O espectrofotómetro de I.V. consiste num sistema óptico capaz de fornecer uma radiação aproximadamente monocromática na região de 2,5 μm a 15 μm.

Aparelhagem e reagentes:

Espectrofotómetro de I.V.

ATI MATTSON

Genesis series FTIR

Pastilhador

Brometo de potássio p.a (Merck)

Padrão de naproxeno (Aldrich)

Procedimento:

Pesar aproximadamente 200mg de brometo de potássio.

Pesar aproximadamente 1mg de amostra.

Dispersar a mistura de pós num almofariz de ágata.

Submeter a matriz "in vácuo" a uma pressão de aproximadamente 800 mPa (8 t. cm^{-2}). Colocar a pastilha obtida no espectrofotómetro de I.V.

Resultados:

Os espectros de Infra-vermelho da amostra e do padrão de naproxeno encontram-se no Anexo 1.

O espectro da amostra apresenta máximos de absorção nos mesmos comprimentos de onda que o correspondente espectro padrão do naproxeno.

Dado que o espectro de I.V. de um determinado composto é considerado como a sua impressão digital e uma vez que os espectros da amostra e do padrão são sobreponíveis, pode concluir-se que a amostra em análise corresponde ao naproxeno.

2.2.4. Espectro de Ultravioleta (V.6.19 da F.P.V - Ensaio C)

De acordo com a monografia da F.P.V a solução de naproxeno, analisada entre os 230 e os 350nm, deve apresentar quatro máximos de absorção, respectivamente, em 262, 271, 316 e 331nm.

Aparelhagem e reagentes:

Espectrofotómetro de UV/VIS HITACHI U-2000

Metanol p.a (Merck)

Procedimento:

Dissolver 40,0mg de amostra em metanol e completar o volume de 100,0ml com o mesmo solvente. Retirar 10,0ml da solução preparada e completar o volume de 100,0ml com metanol. Traçar o espectro de U.V. entre os 230 e os 350nm.

Resultados:

O espectro de U.V. obtido (Fig. 5) apresenta máximos de absorção a 262, 271, 316 e 331 nm.

Os máximos de absorção obtidos estão de acordo com os valores indicados na F.P.V, e são perfeitamente sobreponíveis com os do espectro padrão da Fig. 6.

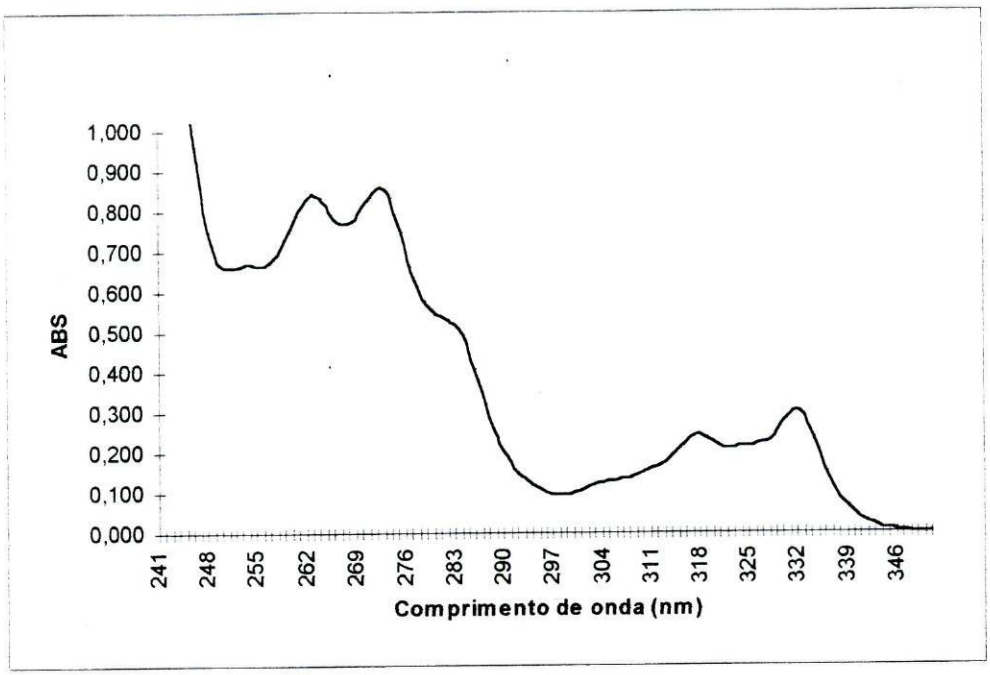


Fig. 5 - Espectro de UV da amostra.

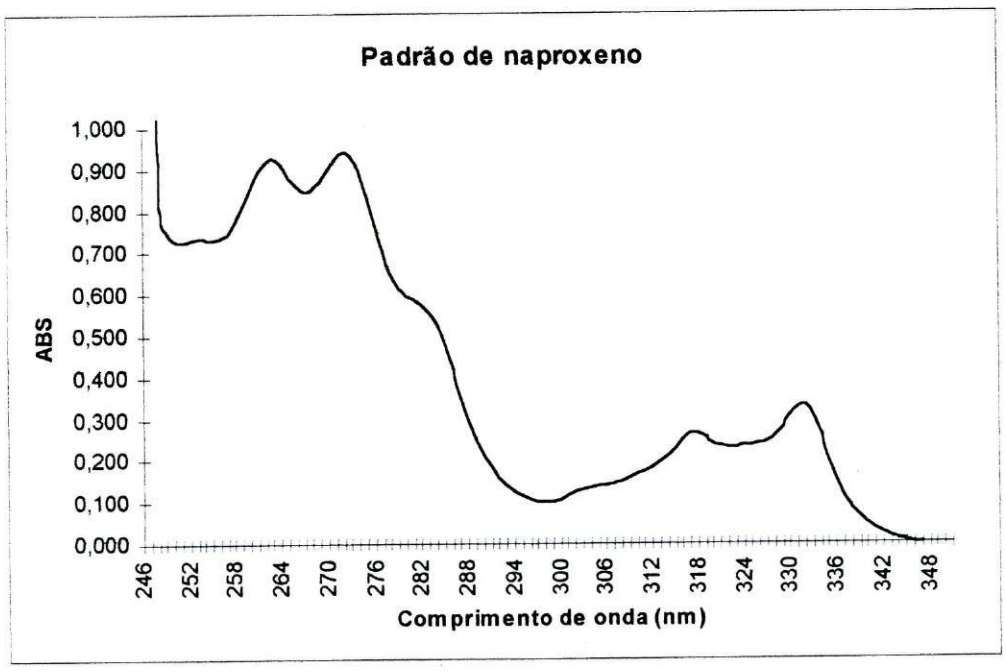


Fig. 6 - Espectro de UV do naproxeno (29).

2.2.5. Ensaio E da monografia do naproxeno da F.P. V

Reagentes:

Ácido sulfúrico p.a (Merck)

Hidrato de cloral p.a (Merck)

Procedimento:

Dissolver 2 mg da amostra em 2 ml de ácido sulfúrico, obter uma solução amarela à qual são adicionados 50 mg de hidrato de cloral e agitar até dissolução.

Resultado:

A coloração amarela passa para alaranjada e depois para vermelho--alaranjada, conforme o descrito na F.P.V.

2.2.6. Discussão dos resultados

Dado que os resultados dos ensaios estão de acordo com o que está descrito na F.P.V, pode concluir-se que a amostra em análise obedece às especificações da mesma relativamente aos parâmetros de identificação.

2.3. SUBSTÂNCIAS APARENTADAS

2.3.1. Cromatografia em camada fina (F.P.V)

A cromatografia em camada fina é um processo de separação que recorre a uma fase estacionária constituída por um material inerte fixo num suporte de material apropriado e a uma fase móvel constituída por um solvente ou mistura de solventes que promovem a migração dos solutos ao longo da fase estacionária.

Aparelhagem e reagentes:

-Placas de vidro para cromatografia como suporte do gele de sílica GF 254

-Câmara de cromatografia

-Microsseringa

-Lâmpada de U.V. CAMAG

-Tolueno p.a (Merck)

-Tetra-hidrofurano p.a (Merck)

-Ácido acético glacial p.a (Merck)

-Metanol p.a (Merck)

-Naproxeno padrão (Aldrich)

Procedimento:

Verter, na câmara de cromatografia, a fase móvel constituída por ácido acético glacial , tetra-hidrofurano e tolueno (3:9:90), colocar a cobertura de modo a manter a câmara hermeticamente fechada e deixar o sistema em repouso a 20-25°C, durante 1 hora.

Activar a placa de cromatografia colocando-a em estufa à temperatura de 100-105°C, durante 1 hora, antes da aplicação das soluções padrão e problema.

Preparar as soluções padrão e problema como a seguir indicado:

Solução problema (X)- Pesar 0,25 g da amostra e dissolver em metanol, completando o volume de 5 ml com o mesmo solvente.

Solução padrão (A) - Retirar 0,5 ml da solução anterior para um balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com metanol.

Solução padrão (B) - Pesar 0,25 g de naproxeno padrão e dissolver em 5 ml de metanol.

Aplicar 10 µl das soluções preparadas a cerca de 20 mm do bordo inferior da placa. Após a evaporação do solvente das soluções aplicadas,

colocar a placa na câmara de cromatografia em posição vertical com os pontos de aplicação acima do nível da fase móvel. Fechar a câmara de cromatografia e deixar eluir a fase móvel até cerca de 15 cm da altura da placa, marcando a linha do solvente. Retirar a placa da câmara, deixar secar ao ar e observar as manchas no comprimento de onda de 254 nm.

Resultados:

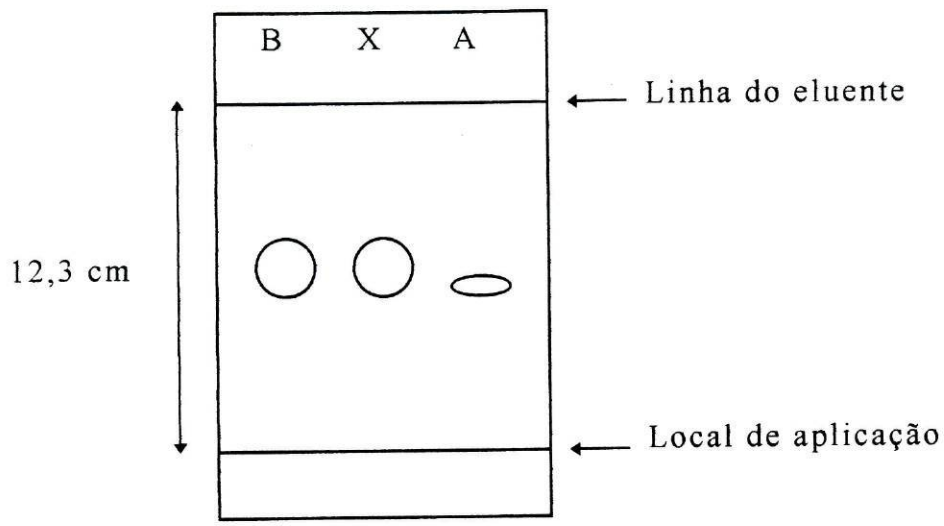


Fig. 7 - Cromatograma do naproxeno matéria-prima.

Cálculo do factor de retenção (R_f)

O R_f corresponde à razão entre a distância percorrida pela amostra e a distância percorrida pelo eluente:

$R_f(B)=7,9/12,3=0,6$

$R_f(x)=8,0/12,3=0,6$

$R_f(A)=8,0/12,3=0,6$

Tanto a amostra (X) como a sua diluição (A) apresentam um R_f idêntico ao da solução padrão.

2.3.2. Perda por secagem (F.P. V)

Aparelhagem:

-Estufa Heraeus

-Balança de precisão Mettler AE 200

-Exsicador

Procedimento:

Tarar uma cápsula mantida em exsicador até peso constante. Pesar 1,000 g de amostra e colocar a cápsula em estufa a 100-105°C, durante 3 horas.

Retirar a cápsula da estufa e pesar.

Resultados:

Peso após secagem = 0,9952 g

Perda por secagem = 0,48%

Segundo a F.P. V a perda de massa por secagem do naproxeno não deve ser superior a 0,5%, portanto, no que se refere ao parâmetro em análise, a matéria-prima está dentro dos limites estipulados.

2.4. DOSEAMENTO

O naproxeno é um ácido fraco, podendo o seu doseamento ser efectuado por meio de uma reacção ácido-base em presença de um indicador apropriado.

Segundo a monografia da F.P. V, o naproxeno deve conter, no mínimo, 98,5 % e, no máximo, o equivalente a 100,5 % de ácido (S)-2-(6--metoxi-2-naftil)propiónico, calculado em relação à substância seca.

1 ml de NaOH 0,1 N<=> 23,03 mg de $C_{14}H_{14}O_3$

Reagentes:

-Metanol p.a (Merck)

-Solução de hidróxido de sódio 0,1 N

-Solução de fenolftaleína

Procedimento:

Pesar 200,0 mg de amostra e dissolver numa mistura de 25 partes de água destilada e 75 partes de metanol. Titular a solução referida com solução de hidróxido de sódio 0,1 N utilizando 1 ml de fenolftaleína como indicador.

Resultados:

Volume de Hidróxido de sódio 0,1 N = 8,60 ml

% de naproxeno existente na amostra = 98,8%

A amostra em análise contém um teor de ácido (S)-2-(6-metoxi-2--naftil) propiónico que está em conformidade com os limites indicados na monografia da F.P.V.

2.5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No Quadro V estão representados, em resumo, os resultados dos ensaios de identificação e de substâncias aparentadas da matéria-prima.

Quadro V - Ensaios de verificação da matéria-prima e respectivos resultados.

Poder rotatório específico $(\alpha)_D^{20}$	+ 66,5°
Ponto de fusão	155,8°C
Espectro de I.V.	Sobreponível ao espectro de I.V. do padrão de naproxeno.
Espectro de U.V.	Sobreponível ao espectro de U.V. do padrão de naproxeno.
Reacção com hidrato de cloral em meio ácido	Conforme a F.P.V.
Cromatografia em camada fina	Conforme a F.P.V.
Perda por secagem	< 0,5%
Doseamento	98,8%

Os resultados dos ensaios, no seu conjunto, permitem concluir que a amostra em estudo está de acordo com as especificações da F.P. V.

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III

ESTUDO DE FORMULAÇÃO

3.1. ESTUDO DE UM MÉTODO DE DOSEAMENTO DO NAPROXENO POR HPLC

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) é um método analítico que permite separar, identificar e quantificar substâncias presentes numa determinada amostra.

A separação processa-se por meio de um mecanismo de interacção selectiva das moléculas da amostra em duas fases, uma móvel e outra estacionária. A fase móvel ou eluente flui continuamente através do sistema, arrastando a amostra injectada.

Devido às suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais, as substâncias presentes na amostra dispõem de diferentes graus de "afinidade" relativamente à fase móvel e à fase estacionária e, por conseguinte, as suas velocidades de migração serão diferentes, permitindo a separação cromatográfica. A substância com menor afinidade para a fase estacionária será a que elui primeiro.

A coluna cromatográfica constitui o componente mais importante e mais crítico de um sistema de cromatografia, pois é nela que ocorre o processo de separação das substâncias. As colunas de HPLC podem ter um enchimento unicamente de sílica (fase normal) ou um enchimento de fase ligada (*bonded phase*), o qual apresenta grupos funcionais (C_{18} ou ODS, C_8, CN, etc.) ligados aos hidroxilos livres da sílica. Os grupos funcionais da fase reversa ligada apresentam, geralmente, uma polaridade baixa ou média (30).

Aparelhagem e reagentes:

Cromatógrafo líquido VARIAN (Fig. 8)

Detector UV/VIS VARIAN 9050

Sistema de controlo de eluentes VARIAN 9012

Computador IBM PS/1

Programa de tratamento de dados VARIAN WORKSTATION

Impressora HEWLETT PACKARD DESKJET 510

Coluna de HPLC - C_{18}, 25cm x 4,6mm, 10µm

Acetonitrilo Lichrosolv (Merck)

Água destilada para HPLC

Naproxeno padrão (Aldrich)

Solução tampão de fosfatos de pH 7,4 (F.P. V)

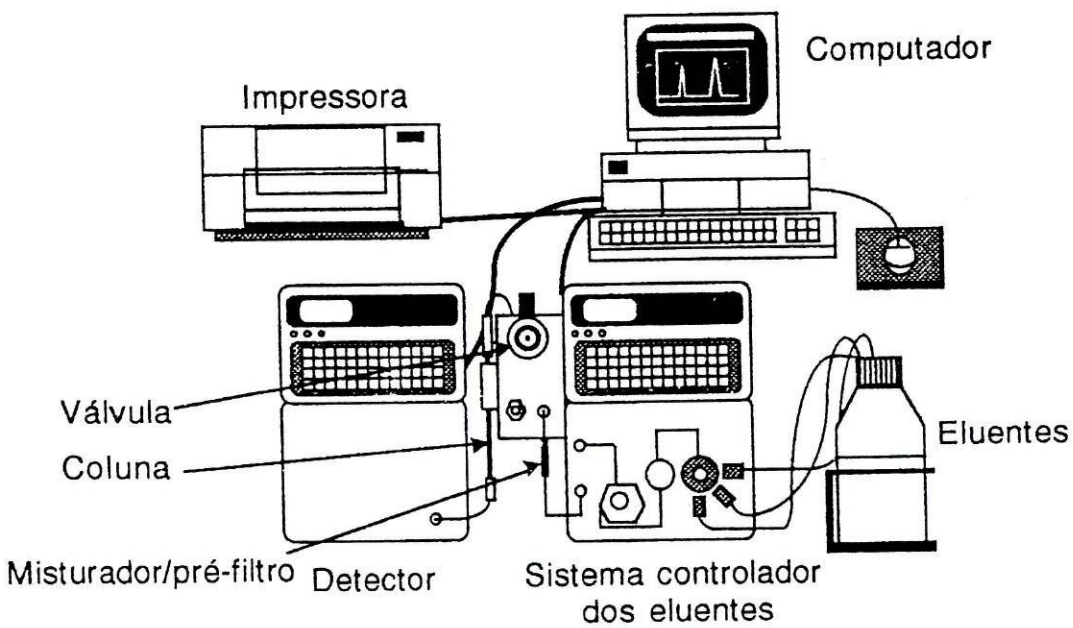


Fig. 8 - Cromatógrafo líquido de alta pressão Varian.

Selecção do comprimento de onda

Injectaram-se amostras de soluções padrão de naproxeno em tampão de fosfatos de pH 7,4 da F.P. V nos diferentes comprimentos de onda de máxima absorção do naproxeno (230, 271, 316 e 331nm). Verificou-se que a 230nm a intensidade dos picos era bastante elevada e que a este comprimento de onda absorviam não só o naproxeno, mas também outros constituintes da solução, facto que conduziria certamente ao aparecimento de interferências. A 271nm os picos apresentavam-se menos intensos do que a 230nm, mas continuavam a existir interferências. A 316 e a 331nm obteve-se uma boa separação dos picos correspondentes ao naproxeno, mas era a 331nm que se conseguiam picos com maior intensidade. Por este motivo, optou-se por efectuar as determinações a 331 nm.

Escolha da mistura de eluentes

Para a escolha da mistura de eluentes mais adequada efectuaram-se várias injecções do mesmo padrão de naproxeno, utilizando-se, em cada injecção, água e acetonitrilo em diferentes proporções. A mistura acetonitrilo:água (60:40, v/v) foi a que apresentou picos mais bem definidos e com um tempo de retenção de aproximadamente 4,5 minutos.

Foram escolhidas as seguintes condições analíticas:

Fase móvel - Acetonitrilo:Água (60:40, v/v)

Fluxo - 1,0 ml/min

Eluição isocrática com a duração de 6 minutos

Detector espectrofotométrico UV/VIS - 331 nm

Volume de injecção (loop) - 20 µl

Acerto automático do zero - no tempo zero

Atenuação - 0,100 AU

Estudo da linearidade de resposta do detector

Para o estudo da linearidade da correlação entre as concentrações de naproxeno e as áreas integradas dos picos correspondentes, foram preparados 100,0ml de uma solução de 100,0mg de naproxeno em solução tampão de fosfatos de pH 7,4. A partir desta solução prepararam-se soluções padrão de naproxeno em solução tampão de fosfatos de pH 7,4 nas seguintes concentrações: 0,2; 0,4; 0,6 e 1,0mg%. Em condições de ensaio idênticas, foi também preparada uma solução em branco.

A curva de regressão demonstrou a existência de uma correlação linear entre a área do pico e a concentração de naproxeno para a gama de concentrações ensaiadas (Fig. 9). Cada ponto da curva corresponde à média de três injecções da mesma amostra.

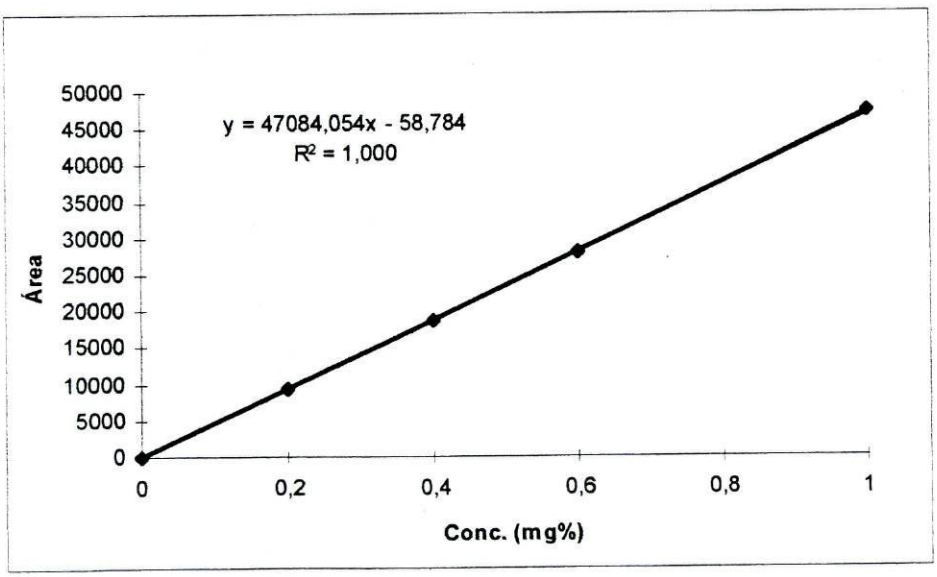


Fig. 9 - Correlação entre a concentração de naproxeno e a área integrada dos picos.

Reprodutibilidade do Método

A reprodutibilidade (R) foi calculada do seguinte modo:

$$R\ (\%) = (\text{Área lida}/\text{Área teórica}) \times 100$$

A área teórica é calculada substituindo o valor de x na equação da recta (y=47084x-58,784), pela concentração teórica*.

Quadro VI - Resultados dos cálculos da reprodutibilidade

Conc.*(mg%)	Área teórica	Área lida	Reprodutibilidade (%)
0,2	9358	9460	101
0,4	18775	18594	99
0,6	28192	28112	100
1,0	47143	47125	100

Reprodutibilidade média do método = 100%

Desvio padrão da média = 0,01

Desvio padrão relativo = 0,01%

O método de doseamento do naproxeno por HPLC apresentou boa reprodutibilidade para a série de concentrações ensaiadas.

3.2. PRÉ-FORMULAÇÃO

3.2.1. Introdução

Os estudos de pré-formulação são aqueles que precedem o estabelecimento da fórmula final e podem demorar vários anos. Estes estudos fornecem ao formulador a informação necessária para o desenvolvimento de uma fórmula estável e com boa biodisponibilidade. Pode definir-se pré-formulação como a avaliação das propriedades físicas e químicas fundamentais de um determinado fármaco, isolado ou associado a diversos excipientes (31,32).

Antes de se submeter à produção em escala industrial de uma determinada formulação, é necessário realizar ensaios de pré-formulação. Uma vez aprovada a comercialização de uma determinada formulação, proceder-se-á à sua produção em larga escala a qual implicará a automatização da produção e também a implementação de padrões de controlo de qualidade para assegurar a estabilidade, a uniformidade, a pureza e a identidade do produto farmacêutico (33).

As propriedades físico-químicas que caracterizam o naproxeno e que podem exercer alguma influência no desenvolvimento de uma fórmula contendo este princípio activo estão descritas no Quadro VI.

Outras características do naproxeno, tais como os espectros de absorção, foram descritas no Capítulo II.

Quadro VI - Propriedades físico-químicas que caracterizam o naproxeno.

Fórmula molecular	$C_{14}H_{14}O_3$
Peso molecular	230,3
Solubilidade	Praticamente insolúvel na água. Solúvel no álcool, no clorofórmio no metanol e no acetonitrilo. Pouco solúvel no éter.
pK_a	4,2 (25°C)
Intervalo de fusão	154-158°C

Além das propriedades apresentadas no Quadro VI, foram também avaliadas experimentalmente a solubilidade do naproxeno a diferentes valores de pH e o seu índice de lipofilia.

3.2.2. Solubilidade

No desenvolvimento de uma formulação de aplicação cutânea a determinação da solubilidade do princípio activo no veículo é um factor importante a ter em consideração para se poder determinar a dose a aplicar. Como foi referido, o naproxeno é praticamente insolúvel em água e, por isso, torna-se difícil a sua inclusão em preparações aquosas.

Realizou-se o ensaio de solubilidade do naproxeno em função do pH, como a seguir se descreve.

Aparelhagem e reagentes:

Espectrofotómetro de UV/VIS HITACHI U-2000

Cromatógrafo líquido VARIAN com detector de UV/VIS

Vórtex Heidolph Reax 2000

Papel *Watman* (0,45µm)

Naproxeno padrão (Aldrich)

Solução de HCl 0,1N

Solução de NaOH

Procedimento:

Preparar soluções saturadas de naproxeno padrão em soluções de HCl 0,1N com pH de: 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,0 e 10,5 (acerto do pH com uma solução de NaOH). Agitar vigorosamente as soluções em vórtex durante 60 segundos à temperatura de 25°C e filtrar por papel *Watman* (0,45µm) antes de se proceder à sua análise cromatográfica.

Preparar soluções padrão de naproxeno nas concentrações-2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg/100 ml de solução de HCl de pH 7,0 e traçar a respectiva curva de calibração.

Realizou-se o mesmo ensaio efectuando-se o doseamento do naproxeno por espectrofotometria de UV/VIS e compararam-se os resultados obtidos através dos dois métodos.

Resultados:

Nas Fig.10 e 11 estão representadas as rectas de regressão relativas aos dois métodos utilizados.

No Quadro VII estão representados os resultados dos ensaios de solubilidade realizados por espectrofotometria de UV/VIS e por cromatografia líquida de alta pressão. A Fig. 12 apresenta a representação gráfica da solubilidade do naproxeno em função do pH.

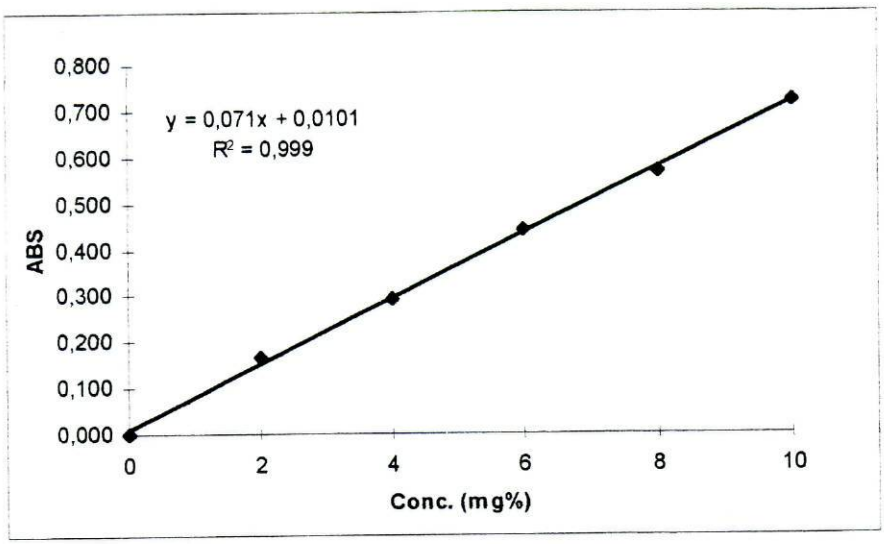


Fig.10 - Correlação entre os valores de absorvência e a concentração de naproxeno.

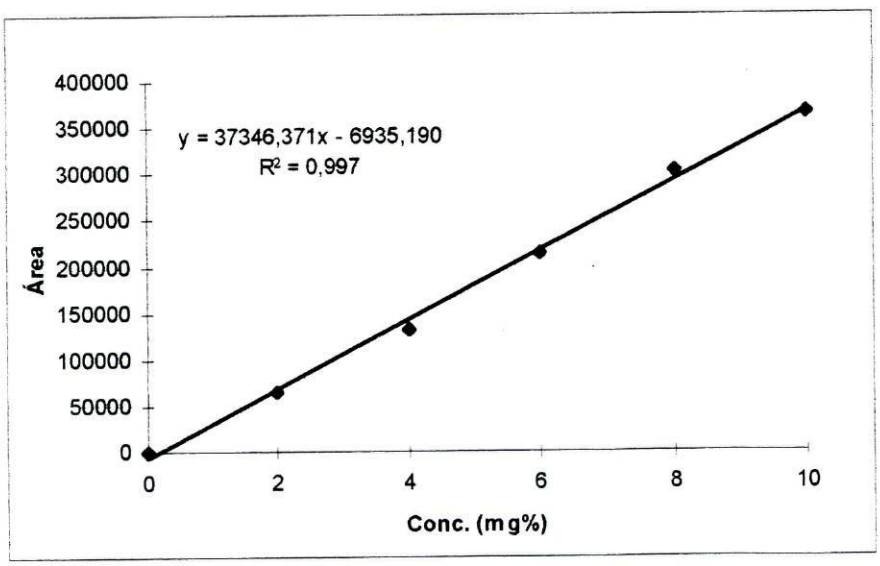


Fig.11 - Correlação entre as áreas de pico e a concentração de naproxeno.

Quadro VII - Solubilidade do naproxeno.

	UV		HPLC	
pH	ABS	C (mg/ml)	Áreas	C (mg/ml)
1,5	0,116	0,02	54807	0,02
3,0	0,125	0,02	61366	0,02
4,5	0,264	0,04	135558	0,04
6,0	0,448	0,25	1052668	0,28
7,0	0,502	2,09	7057390	1,89
10,5	1,281	5,36	18743348	5,01

C-Concentração

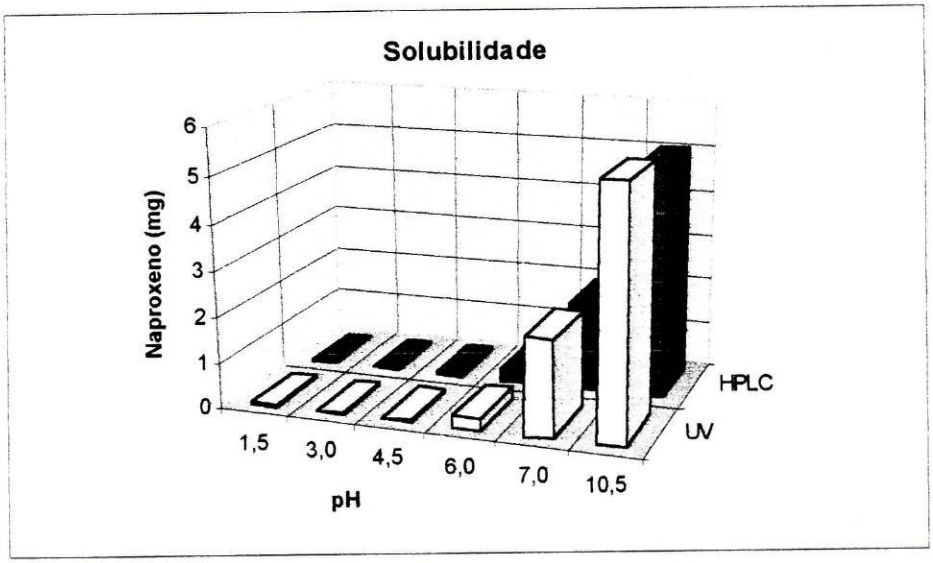


Fig. 12 - Solubilidade do naproxeno em função do pH.

Discussão:

O mesmo ensaio realizado por dois métodos diferentes (espectrofotometria de UV/VIS e HPLC), permitiu verificar que a partir de valores de pH superiores ao pK_a (pK_a=4,2) a solubilidade do naproxeno aumenta significativamente.

3.2.3. Índice de lipofilia

A determinação do índice de lipofilia é um processo muito útil que permite avaliar a lipofilia dos compostos por cromatografia líquida de alta pressão. O índice de lipofilia (I.L. ou logk') pode ser definido como:

$$\log k' = \log ((t_r - t_0)/t_0) \quad \text{(Eq.5)}$$

onde t_r é o tempo de retenção da amostra e t_0 é o tempo de retenção do solvente (34,35).

Dado que a determinação do índice de lipofilia permite obter informações acerca da lipofilia dos compostos, este processo pode ser utilizado em alternativa à determinação do coeficiente de partilha O/A.

Aparelhagem e reagentes:

Cromatógrafo líquido de alta pressão VARIAN
detector espectrofotométrico UV/VIS
Coluna ODS2, 15cm x 4,6mm, 5 μm
Coluna C_{18}, 25cm x 4,6 mm, 10 μm
Metanol Lichrosolv (Merck)
Naproxeno padrão (Aldrich)
Água destilada para HPLC

Procedimento:

Injectar no cromatógrafo líquido (coluna ODS2, 15cmx4,6mm, 5μm) uma solução metanólica a 0,2 mg/ml de naproxeno padrão e utilizar como fases móveis as seguintes misturas de metanol/água: 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 75/25, 70/30, 65/35 e 60/40. Registar os tempos de retenção dos picos correspondentes às eluições com as diversas misturas de solventes.

Representar graficamente o log k' em função da percentagem de metanol. O ponto de intersecção da recta com o eixo dos yy (100% de água) corresponde ao índice de lipofilia.

Efectuou-se o mesmo ensaio com um outro tipo de coluna (coluna C_{18}, 25cmx4,6mm, 10μm) e compararam-se os resultados.

Resultados:

Nos Quadros VIII e IX e nas Fig. 13 e 14 apresentam-se os resultados dos ensaios relativos à utilização dos dois tipos de colunas cromatográficas.

Quadro VIII - Coluna ODS2, 15 cm x 4,6 mm, 5µm

Metanol %	tr	to	log k'
100	1,526	1,500	-1,761
95	1,681	1,526	-0,994
90	1,803	1,526	-0,741
85	1,954	1,526	-0,552
80	2,168	1,526	-0,376
75	2,540	1,526	-0,178
70	3,145	1,526	0,026
65	4,027	1,526	0,215
60	5,418	1,526	0,407

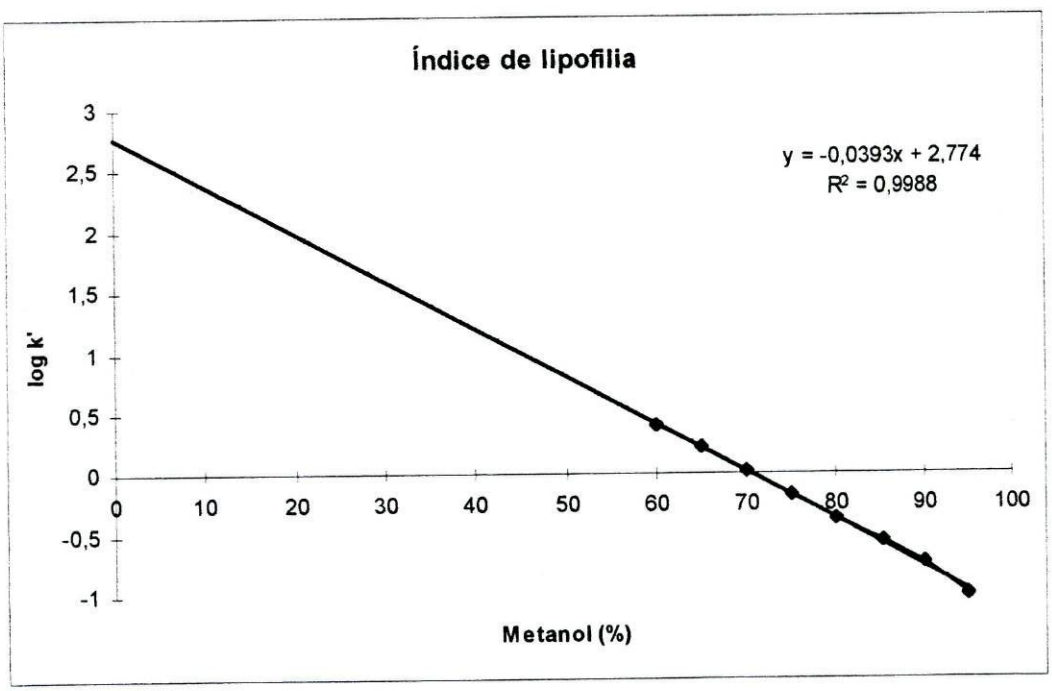


Fig.13 - Índice de lipofilia do naproxeno correspondente às determinações efectuadas com a coluna ODS2, 150x4,6mm, 5µm.

Quadro IX - Coluna C_{18}, 25 cm x 4,6 mm, 10µm

Metanol %	tr	to	log k'
100	3,215	3,203	-
95	3,144	3,143	-
90	3,443	3,215	-1,149
85	3,461	3,215	-1,116
80	3,841	3,215	-0,711
75	4,141	3,215	-0,541
70	4,771	3,215	-0,315
65	5,648	3,215	-0,121
60	6,759	3,215	0,042

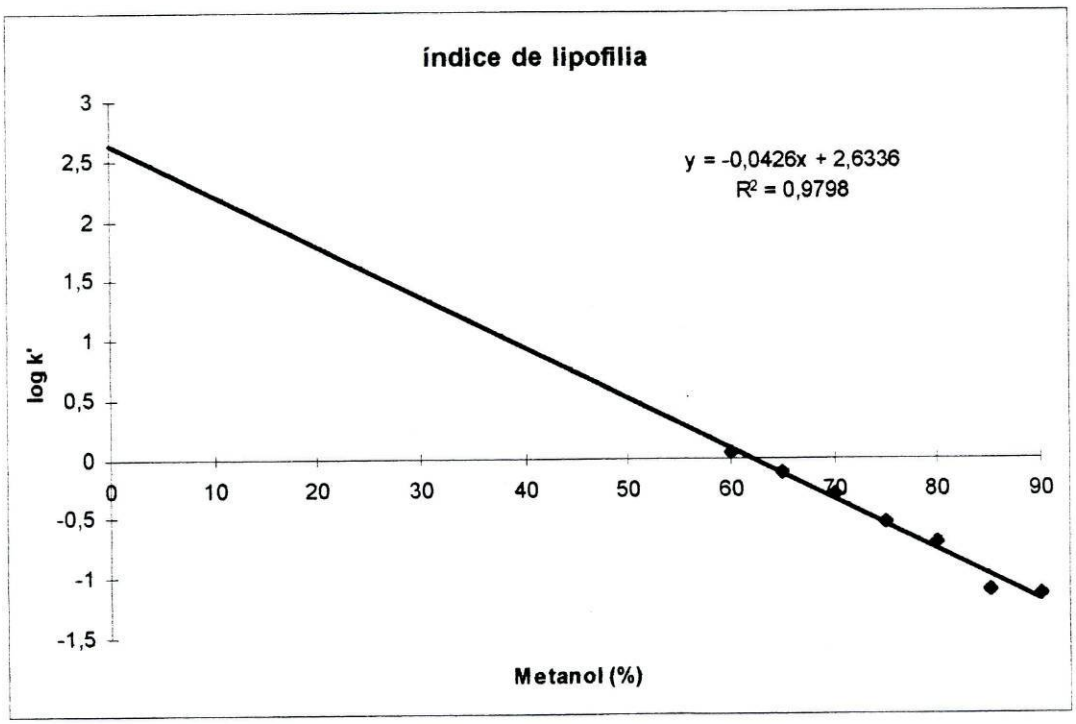


Fig.14 - Índice de lipofilia do naproxeno correspondente às determinações efectuadas utilizando uma coluna C_{18}, 250x4,6mm, 10µm.

Como se pode observar através dos gráficos, existe uma relação linear entre a percentagem de metanol do sistema de eluentes e o logk'.

1-Ensaio realizado com a coluna ODS2 (150x4,6mm, 5μm)

Índice de lipofilia $(I.L.)_{100\%}$=2,77

2- Ensaio realizado com a coluna C_{18} (250x4,6mm, 10μm)

Índice de lipofilia $(I.L.)_{100\%}$=2,63

O Índice de lipofilia médio (IL 100%) do naproxeno é 2,70.

Discussão:

O naproxeno é um composto lipófilo. Como se pode verificar no Quadro X, o naproxeno apresenta um índice de lipofilia mais elevado que os outros fármacos representados (34).

Quadro X - Índice de lipofilia do naproxeno comparativamente com o de outros compostos.

Composto	log k' (100% água)
Naproxeno	2,70
Penicilina G	1,30
Floxacilina	2,14
Amoxicilina	0,48
Ampicilina	0,94

3.3. FORMULAÇÃO

3.3.1. Introdução

Banker, Peck e Baley definiram formulação como o processo cuja finalidade é obter uma fórmula que contenha a quantidade correcta de fármaco, veiculada na forma farmacêutica adequada, e que seja cedida no período de tempo conveniente, à velocidade fixada e no local apropriado, mantendo sempre a integridade química da substância activa. Todavia, esta definição não faz referência às diferentes fases da formulação. De um modo mais lato, Sousa Lobo propõe que a formulação seja definida como o conjunto de operações que visam criar um sistema físico no qual o fármaco se encontra inserido, que obedeça aos requisitos de qualidade previamente fixados (31,36).

A eficácia das formas farmacêuticas de aplicação tópica depende, em grande parte, da composição do veículo. Pode afirmar-se que a capacidade de penetração cutânea de um fármaco contido numa determinada formulação e a sua posterior acção dependem de dois processos consecutivos. Em primeiro lugar o fármaco deve difundir-se do veículo para a superfície da pele e depois deve penetrar nela até atingir o local de acção (37). Estes dois processos estão intrinsecamente relacionados, podendo ser influenciados pela composição da fórmula.

O veículo deve actuar como um meio inerte no qual o fármaco se encontra distribuído da forma o mais homogénea possível. Além disso, o veículo deve contribuir para a boa estabilidade das formulações e deve conferir às mesmas uma aparência agradável.

A distribuição do fármaco no veículo é de primordial importância para a sua libertação. Quando se formulam formas dérmicas é necessário ter em consideração que se o fármaco tiver grande afinidade para o veículo, a sua velocidade de libertação será lenta (38).

O fluxo de uma determinada molécula através da pele é função de dois efeitos: da actividade termodinâmica da molécula na fase dadora (efeito *push*) e da alteração das propriedades de barreira causadas pelo veículo (efeito *pull*). O valor da relação Ptotal/P*push* é designado por factor de promoção (39,40). Aumentando a actividade termodinâmica de um sistema aplicado topicamente por alteração da composição do veículo, pode prever-se um aumento na sua velocidade de libertação (7).

A velocidade de libertação depende, então, dos seguintes factores (41):

- Concentração do fármaco
- Solubilidade do fármaco no veículo
- Coeficiente de partilha entre o veículo e a fase receptora.

Como já foi referido na introdução geral, o transporte de fármacos através da pele decorre, na maioria dos casos, segundo um processo de difusão passiva.

$$dQ/dt = D(PC)C_n / h \quad \text{(Eq. 6)}$$

dQ/dt - Fluxo

D - Coeficiente de difusão do fármaco

PC - Coeficiente de partilha pele/veículo do fármaco

C_n - Concentração do fármaco

h - Espessura da pele

De acordo com a equação anterior, os parâmetros que podem ser modificados pela composição do veículo para facilitar a penetração através da pele são D, PC e C_n. O coeficiente de difusão (D) do fármaco na pele pode ser modificado por influência dos componentes do veículo nas características de barreira da pele. O coeficiente de partilha (PC) do fármaco entre a pele e o veículo pode ser aumentado se diminuir a solubilidade do fármaco no veículo. A concentração do fármaco no veículo

(C_n) pode ser optimizada se for assegurado que o fármaco se encontra em solução saturada (37). Portanto, pode verificar-se que a eficácia das preparações de aplicação tópica está directamente relacionada com a capacidade que o fármaco tem de penetrar na pele.

No caso das preparações de aplicação cutânea há dois aspectos a ter em consideração quando se pretende maximizar a absorção através da pele de um determinado princípio activo. Uma forma de melhorar a capacidade de penetração do fármaco através da pele consiste em incluir na formulação um agente que afecte as suas propriedades de barreira. Alternativamente, é frequente alterarem-se as características físicas do veículo e, deste modo, a difusão do fármaco do veículo para a pele (38).

3.3.2. Preparação de um creme contendo naproxeno

Os fármacos com propriedades anti-inflamatórias necessitam de penetrar nas camadas mais profundas da pele para poderem exercer actividade terapêutica. Por esta razão, este tipo de fármacos deve ser incorporado em preparações dérmicas com elevado poder de penetração, como é o caso dos cremes O/A.

As diaderminas ou cremes evanescentes constituem cremes do tipo O/A altamente penetrantes. Procedeu-se à preparação de uma diadermina com composição a seguir indicada:

Ácido esteárico	24,0g
Trietanolamina	1,2g
Glicerina	13,6g
Nipagin (metilparabeno)	0,1g
Água destilada q.b.p.	100,0g

Todas as matérias-primas foram adquiridas na firma Vaz Pereira, Lda.

Na formulação acima indicada, parte do ácido esteárico reage com a trietanolamina formando estearato de trietanolamina, o qual actua como agente emulsivo. O ácido esteárico que não reage com a trietanolamina constitui a fase oleosa da emulsão.

Os cremes O/A são muito susceptíveis à invasão de microrganismos e por isso é necessária a presença de um conservante, de preferência fungicida. O *Nipagin* é um adjuvante cuja inclusão na composição da diadermina tem a finalidade de evitar o desenvolvimento de microrganismos.

Na preparação de uma diadermina também é conveniente incluir um agente humectante como a glicerina, por exemplo, para evitar a perda excessiva de água da fase externa por evaporação.

No Quadro XI estão representadas algumas características físico-químicas das substâncias utilizadas na preparação da diadermina (42).

Quadro XI - Características físico-químicas dos componentes da diadermina

Ácido esteárico	Trietanolamina	Glicerina	Metilparabeno
P.F. = 54°C Praticamente insolúvel em água, solúvel em éter e clorofórmio. Incompatível com a maioria dos hidróxidos metálicos.	Solúvel em água, metanol e acetona. Incompatível com os sais de metais pesados.	Solúvel em água, álcool e metanol. Insolúvel em éter e clorofórmio. Incompatível com o ácido bórico.	Solúvel em água e na glicerina. Incompatível com os tensioactivos não iónicos (diminuem as propriedades antimicrobianas).

Procedimento:

Fundir o ácido esteárico a temperatura não superior a 75°C e adicionar o *Nipagin* dissolvido na glicerina a quente. Dissolver a trietanolamina na água aquecida à temperatura de aproximadamente 75°C e adicionar lentamente a fase aquosa à fase oleosa agitando sempre. Após a adição da totalidade da fase aquosa, manter a agitação até completo arrefecimento.

Foi posteriormente incorporada, por espatulação, uma quantidade de naproxeno no creme preparado, de forma a obter-se uma formulação a 10% (m/m) que se designou por F_0.

3.3.3. Ensaios de libertação "in vitro" do naproxeno

Realizaram-se vários ensaios de libertação com a formulação preparada (F_0).

O processo de distribuição de um fármaco a partir de uma formulação de aplicação cutânea é controlado pelas interacções físico-químicas entre o fármaco e o veículo, o qual condiciona cinética e termodinamicamente a libertação do fármaco para a pele. Essas interacções podem ser particularmente importantes quando a barreira cutânea está comprometida. Os estudos de libertação "in vitro" têm sido utilizados com a finalidade de avaliar a libertação dos fármacos a partir de preparações semi-sólidas e também os efeitos dos componentes da formulação (22).

Os ensaios de libertação têm sido frequentemente utilizados como critério de avaliação do eventual efeito do veículo na eficácia dos fármacos incorporados em formulações de aplicação tópica (43). Para que o fármaco possa desenvolver a sua acção terapêutica, em primeiro lugar, deve ter capacidade de se libertar do veículo que o contém. Por este motivo, é

necessário avaliar se a formulação apresenta características que permitam a cedência do fármaco.

Aparelhagem e reagentes:

Aparelho de dissolução da F.P. V (Erweka DT)

Cromatógrafo líquido Varian com detector UV/VIS

Recipiente circular

Balança de precisão Mettler AE 200

Solução de fosfatos de pH 7,4 (F.P. V)

Procedimento:

Encher o vaso de dissolução da F.P. V com 500,0 ml de solução tampão de fosfatos de pH 7,4 (F.P. V) e mergulhar no banho termostatado à temperatura de 32 ± 5°C (Fig. 15).

Pesar cerca de 5 gramas de creme no recipiente circular e mergulhar o conjunto no vaso de dissolução. Agitar a solução receptora por intermédio de uma pá agitadora rodando a uma velocidade de 50 r.p.m.

Recolher alíquotas (5,0 ml) da fase receptora aos 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos, e repor sucessivamente o volume retirado com igual volume da mesma solução tampão. Filtrar as amostras por papel de filtro, antes da sua injecção no cromatógrafo (HPLC).

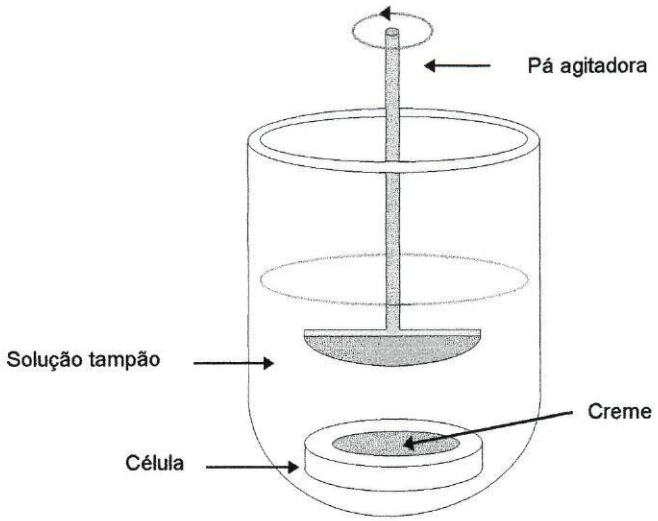


Fig. 15 - Vaso de dissolução adaptado para o ensaio de libertação de formas semi-sólidas.

Condições cromatográficas:

Fase móvel - Acetonitrilo:Água (60:40, v/v)

Fluxo - 1,0 ml/min.

Eluição isocrática com a duração de 6 minutos

Detector espectrofotométrico UV/VIS - 331 nm

Volume de injecção (Loop) - 200 µl

Acerto automático do zero - no tempo zero

Atenuação - 0,100AU

Os valores das áreas dos picos cromatográficos correspondentes às várias alíquotas foram corrigidos, de acordo com a Eq. 7, de modo a considerar o efeito de diluição cumulativa resultante da adição do volume de líquido de compensação na fase receptora após cada determinação.

$$Ac_n = Ax_n + 0{,}01(Ac_{n-1}) \quad (Eq.7)$$

Ac_n - Área corrigida.

Ax_n - Área da amostra.

Ac_{n-1} - Área corrigida determinada anteriormente.

n - número da leitura.

Na Eq. 7 o valor 0,01 corresponde à razão entre o volume de amostra recolhido em cada intervalo de tempo (5,0 ml) e o volume total da fase receptora (500 ml).

A quantidade acumulada de naproxeno que passa para a fase receptora ao fim de cada intervalo de tempo (Q_n) foi calculada através da Eq. 8.

$$Q_n(mg) = Ac_n x5(Cp/Ap) \quad (Eq.8)$$

Ac_n - Área corrigida correspondente à leitura n.

Cp - Concentração do padrão.

Ap - Área do padrão.

Na Eq. 8 o valor 5 corresponde ao factor de diluição.

Resultados:

No Quadro XII estão representados os resultados dos ensaios de libertação do naproxeno.

Quadro XII - Quantidade acumulada de naproxeno libertado expressa em miligramas.

Tempo (min)	Naproxeno libertado (mg)
0	0
30	10,8±0,2
60	17,9±0,6
120	22,8±1,4
180	27,7±1,8
240	32,3±2,3
300	35,1±2,2
360	37,4±2,4

Os resultados correspondem à média de 3 determinações

Ao fim de 360 minutos de ensaio obteve-se o perfil de libertação representado na Fig.16.

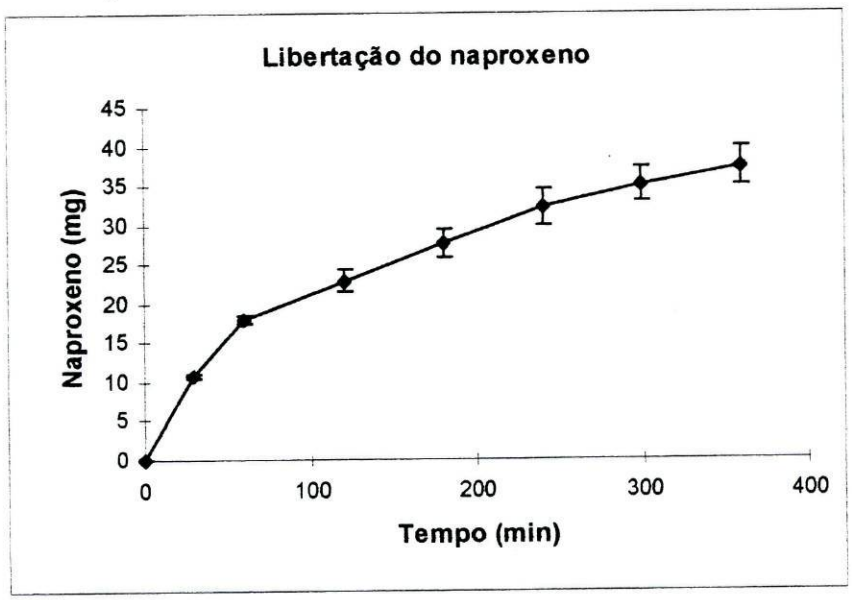


Fig. 16 - Quantidade acumulada de naproxeno libertado em função do tempo.

Como se pode verificar pela análise do gráfico da Fig.16, nos primeiros 60 minutos de ensaio há um aumento mais acentuado da libertação do naproxeno devido à maior diferença entre a concentração do fármaco na fase dadora (veículo) relativamente à fase receptora.

Para a libertação de um determinado fármaco a partir de uma preparação semi-sólida na qual o fármaco se encontra completamente dissolvido, Higuchi estabeleceu a seguinte equação (22,43):

$$Q = 2\ C_o\ (Dt/\pi)^{1/2} \quad \text{(Eq. 9)}$$

onde Q é a quantidade de fármaco libertada por unidade de superfície; C_o é a concentração inicial do fármaco no veículo; D é o coeficiente de difusão e t é o tempo de difusão. De acordo com esta equação a quantidade de fármaco libertada é uma função linear da raiz quadrada do tempo e o declive da recta corresponde à constante de libertação do fármaco a partir do veículo. No entanto, para a utilização desta equação temos que adoptar os seguintes pressupostos:

(a) que a quantidade total de fármaco libertado é inferior a 30% da quantidade inicial de fármaco presente,

(b) só o fármaco difunde a partir do veículo e nenhum outro componente da formulação,

(c) D permanece constante em relação ao tempo

(d) a fase receptora é mantida em condições *sink* (22).

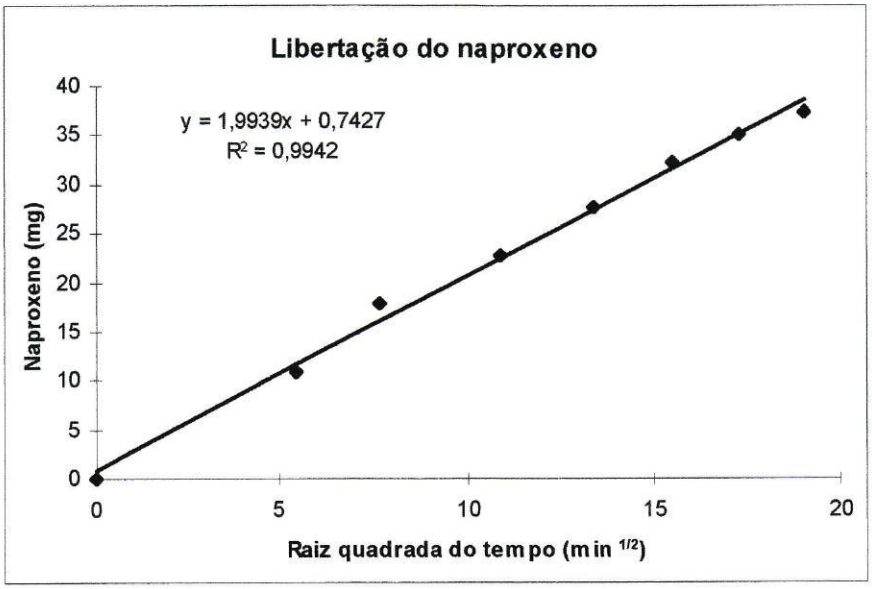


Fig. 17 - Quantidade acumulada de naproxeno libertado em função da raiz quadrada do tempo.

Verifica-se uma correlação linear (R^2=0,994) entre a quantidade de naproxeno que se liberta e a raiz quadrada do tempo.

A constante de libertação do naproxeno no veículo (declive de Q *versus* $\sqrt{t}$) é de cerca de 2mg.min$^{-½}$.

3.3.4. Ensaio de difusão "in vitro" do naproxeno

O principal objectivo da realização de estudos de absorção percutânea prende-se com a necessidade de avaliar o perfil de absorção do fármaco ao longo do tempo, ou seja, a sua biodisponibilidade. O termo biodisponibilidade pode ser definido como a extensão e a velocidade de absorção de um composto activo a partir de uma determinada preparação (44).

A biodisponibilidade dos fármacos depende, pelo menos em parte, da velocidade de libertação dos mesmos a partir da forma farmacêutica. Diferenças nas velocidades de libertação entre fármacos equivalentes

podem fazer prever a ocorrência de diferenças na absorção percutânea e, portanto, diferenças de comportamento terapêutico (45).

Os modelos experimentais escolhidos para medir a permeação cutânea dependem, em primeiro lugar, do tipo de informação necessária, embora os factores externos, tais como o custo e o tempo requerido, também tenham de ser tidos em consideração. Os ensaios "in vitro" apresentam custos baixos devido à simplicidade das condições experimentais e permitem testar um grande número de formulações num espaço de tempo relativamente curto.

Os métodos de difusão "in vitro" utilizam membranas que mimetizam as propriedades de barreira da pele. As membranas utilizadas podem ser materiais sintéticos impregnados com componentes lipídicos (46,47), pele excisada de alguns animais (48,49) ou pele de cadáveres humanos (40,50), sendo esta última a que conduz a resultados que mais se aproximam da situação real.

Embora se reconheça que os ensaios "in vitro" apresentam algumas limitações, nomeadamente no que se refere à diferente permeabilidade da pele excisada dos animais de experiência relativamente à pele humana, os investigadores recorrem muito frequentemente a este tipo de ensaios, pois estes têm permitido testar, com segurança, os fenómenos da absorção percutânea no ser humano (51).

As características de libertação do fármaco a partir de veículos de aplicação cutânea podem ser estudadas através da avaliação do coeficiente de partilha do fármaco entre o veículo e um determinado solvente orgânico. Todavia, para se poderem estudar os efeitos do veículo na função de barreira do estrato córneo, é mais adequado recorrer a ensaios de difusão utilizando a pele ou membranas sintéticas que a substituam.

Dado que o estrato córneo é essencialmente constituído por células mortas, pode considerar-se que as suas funções de barreira se mantêm "in

vitro" e que as informações obtidas apresentam alguma relevância se comparadas com o que acontece "in vivo" (7).

A pele de rato é muito utilizada na realização de estudos de permeação por duas razões: o grau de permeação de vários fármacos através da pele de rato é aproximadamente igual ao da pele humana e as velocidades de permeação são, geralmente, mais lentas no homem que nos outros animais (38).

Quando se comparam diferentes formulações contendo o mesmo princípio activo e se o objectivo do estudo é identificar a formulação que apresenta melhor capacidade de penetração, os ensaios "in vitro" utilizando pele de animais podem ser bastante úteis.

Realizaram-se ensaios de penetração "in vitro" com a preparação F_0.

3.3.4.1. Preparação das membranas biológicas

Quando se realizam ensaios utilizando pele excisada de animais, a pele deve ser removida sempre da mesma zona anatómica porque secções de pele de locais diferentes do mesmo indivíduo podem apresentar permeabilidade diferente.

Neste estudo realizaram-se ensaios de penetração "in vitro" utilizando pele excisada de ratos fêmea da espécie Wistar-Lewis com peso compreendido entre os 200 e os 300g.

Material e reagentes:

Tesoura

Pinça

Solução de Ringer

Creme depilatório à base de tioglicolato de cálcio

Solução tampão de fosfatos de pH 7,4 (F.P.V)

Procedimento:

Após a morte dos ratos, remover a pele da zona abdominal. Lavar a pele com água destilada, mergulhar em solução de Ringer e congelar. No momento da sua utilização, descongelar a pele e depilá-la com auxílio de um creme depilatório. Lavar a pele e deixá-la mergulhada durante alguns minutos na solução receptora (solução tampão de fosfatos de pH 7,4). Proceder depois à secagem da pele entre dois papéis de filtro antes de a colocar na célula de difusão.

3.3.4.2. Montagem e funcionamento do sistema de difusão

Aparelhagem e reagentes:

Célula de difusão de Jhawar-Lordi (Fig. 18)

Aparelho de dissolução Erweka DT (Fig. 19)

Balança de precisão Mettler AE 200

Solução tampão de fosfatos de pH 7,4 (F.P. V)

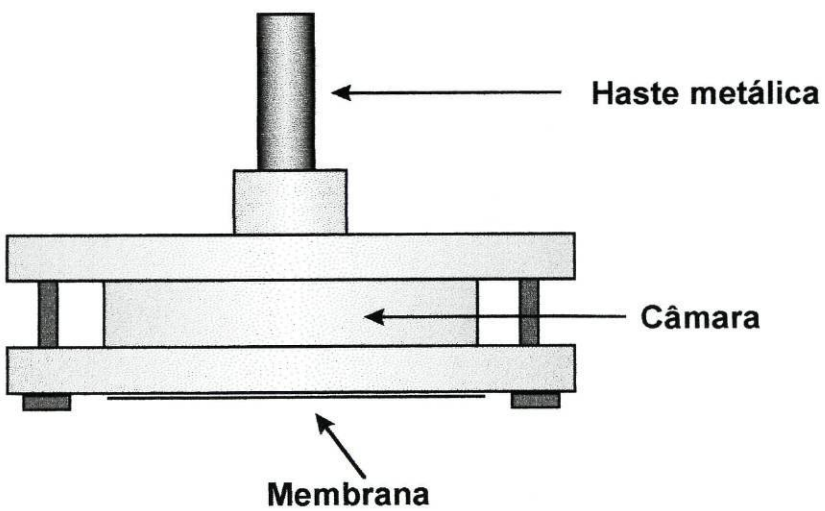


Fig. 18 - Célula de difusão de Jhawar-Lordi.

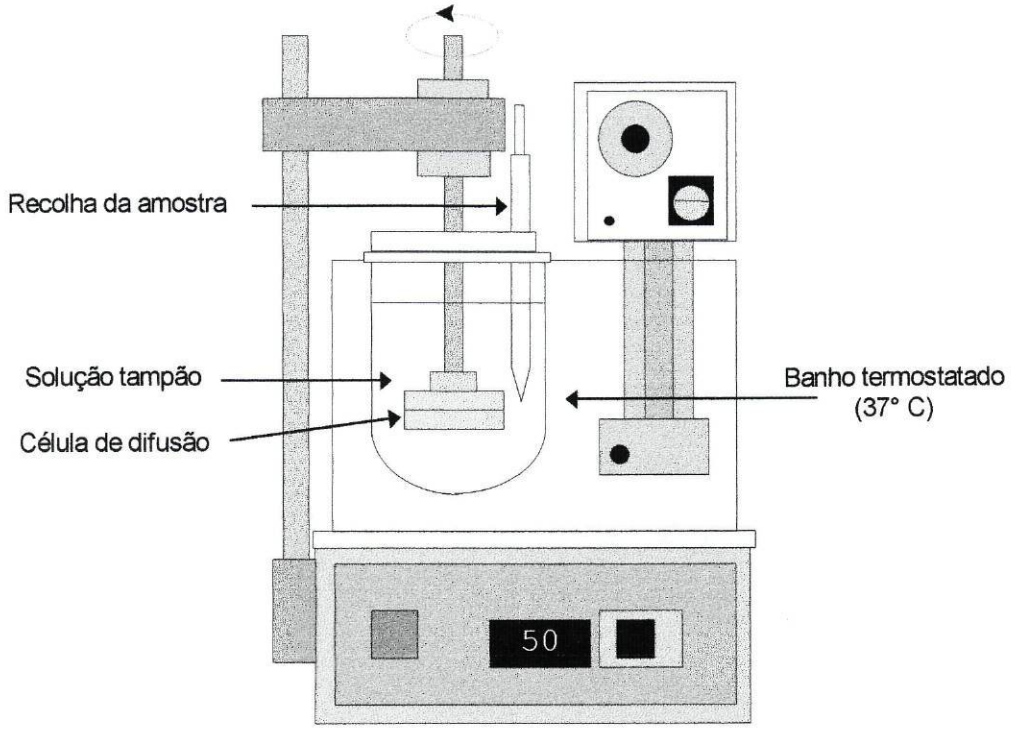


Fig. 19 - Adaptação da célula de difusão no aparelho de dissolução da F.P. V.

Procedimento:

Encher a célula de difusão de Jhawar-Lordi (Fig. 18) com a amostra do creme a ensaiar e pesar o conjunto.

Colocar a parte correspondente ao estrato córneo em contacto com a amostra contida na célula de difusão (área de contacto de 12,6cm^2).

Suspender a célula de difusão numa haste e mergulhá-la no vaso de dissolução da F.P.V (Fig.19) contendo a solução tampão de fosfatos de pH 7,4 (F.P.V). Manter o vaso de dissolução tapado durante o ensaio para minimizar a evaporação da solução receptora e para que a temperatura permaneça constante.

Manter o sistema à temperatura constante de 37±0,5°C por intermédio de um banho termostatado e submetê-lo a uma agitação de 50 r.p.m. para uma melhor homogeneização da solução receptora.

Remover, para doseamento, alíquotas da fase receptora em intervalos de tempo pré-determinados (30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos). Substituir o volume removido ao fim de cada intervalo de tempo por igual quantidade de fase receptora. Dosear por HPLC a quantidade de naproxeno que atravessa a membrana ao longo do tempo, utilizando as condições cromatográficas descritas em 3.1.

Resultados:

Na Fig 20 está representada a quantidade acumulada de naproxeno da fórmula F_0 que difunde através da membrana ao longo do tempo.

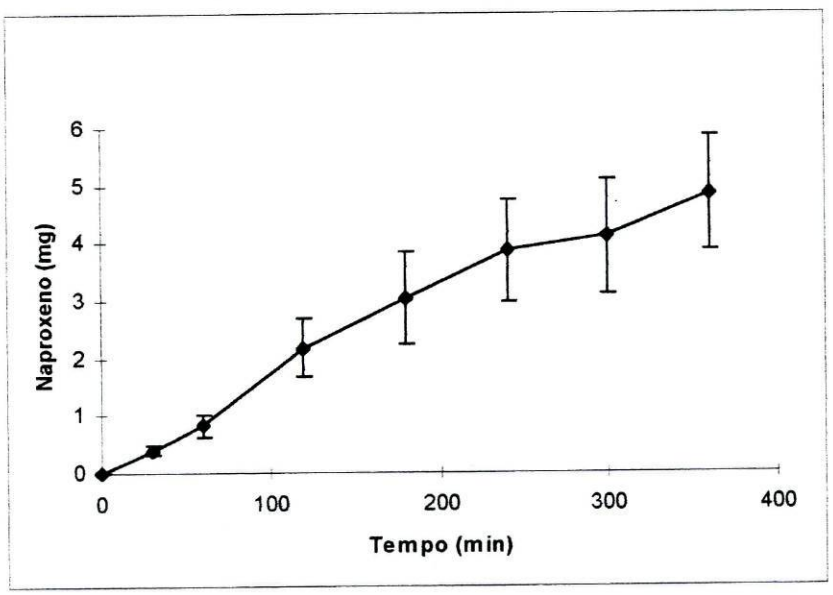


Fig.20 - Quantidade acumulada de naproxeno da F_0 que difunde, em função do tempo.

Na Fig. 21 encontra-se representada a sobreposição dos gráficos correspondentes ao ensaio de libertação e ao ensaio de penetração do naproxeno através da pele excisada de rato.

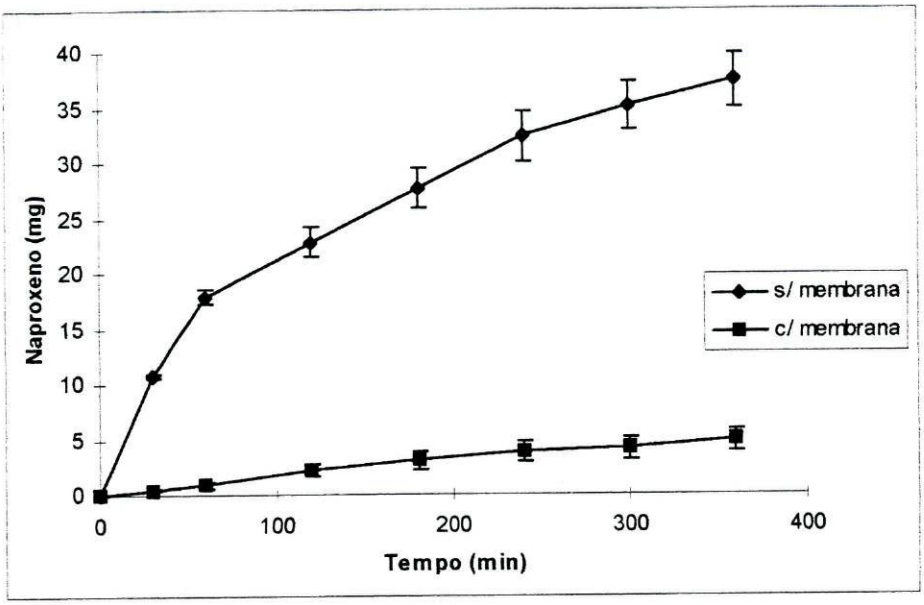


Fig. 21 - Quantidade acumulada de naproxeno detectada na fase receptora nos ensaios realizados com e sem membrana.

Como se pode verificar pela observação da Fig. 21, a quantidade de naproxeno detectada na fase receptora é muito maior no ensaio sem membrana do que no ensaio com membrana, o que demonstra as propriedades de barreira inerentes ao estrato córneo. Os resultados dos ensaios de libertação e de difusão "in vitro" indicam que a penetração através da pele constitui o passo limitante de todo o processo de permeação cutânea do fármaco.

3.4. FORMULAÇÃO DE CREMES CONTENDO PROMOTORES DE ABSORÇÃO

3.4.1. Introdução

Os promotores de penetração são substâncias que podem aumentar a capacidade de um determinado composto de penetrar através do estrato córneo. Pode considerar-se a água como um promotor de penetração, uma vez que ela aumenta o fluxo da maioria dos compostos através do estrato córneo. Por analogia com os resultados de análise diferencial entálpica, pode admitir-se que a água se insere na hélice tripla da queratina, modificando a estrutura das camadas lipídicas (ataque às cabeças polares das moléculas). É também desta forma que actuam os promotores hidrófilos. Os promotores apolares fluidificam a porção lipídica, diminuindo a rigidez da barreira. Os ácidos biliares, e possivelmente os tensioactivos em geral, actuam criando canais hidrófilos nas bicamadas lipídicas. Um dos seus defeitos é a tendência que evidenciam para formar micelas.

O mecanismo de acção dos promotores não parece estar relacionado com o efeito destes compostos no veículo ou na actividade dos fármacos contidos no veículo. Os promotores actuam desorganizando a estrutura de barreira da pele.

Katz e Poulsen definiram uma série de propriedades que, idealmente, os promotores deveriam apresentar (52). Algumas dessas propriedades estão descritas no Quadro XIII.

Quadro XIII

Os promotores de penetração devem ser:

1- Farmacologicamente inertes.

2- Não devem ser tóxicos, irritantes ou alergénicos.

3- Eficazes e a duração do seu efeito deve ser previsível.

4- Não devem provocar alterações irreversíveis na pele.

5- Devem ser química e fisicamente compatíveis com o fármaco e com os adjuvantes farmacêuticos.

6- Devem ser incolores e inodoros.

Apesar de não ser muito provável que existam promotores que reunam todas as características acabadas de referir, há alguns compostos que apresentam um número bastante aceitável de propriedades requeridas para uma promoção eficaz da penetração dos fármacos através da pele. Os promotores são mais eficazes quando interactuam com os componentes intra e intercelulares do estrato córneo (53). A capacidade que um composto tem para causar irritação cutânea depende do seu poder de penetração e de interacção com as proteínas do estrato córneo e da epiderme viável (54).

A azona, os solventes alcoólicos, os solventes apróticos, os ácidos gordos, as pirrolidonas e os tensioactivos têm sido bastante utilizados como promotores de penetração.

Azona

Um dos primeiros compostos a ser reconhecido como promotor foi o laurocaprano (Azona). Este tipo de substância actua em concentrações relativamente baixas e não possui actividade terapêutica, sendo também pouco solúvel na água.

Alcoóis, solventes apróticos e ácidos gordos

Estão descritos vários estudos que indicam os solventes alcoólicos (etanol, propilenoglicol e polietilenoglicóis) como promotores de diversos tipos de substâncias aplicadas na pele. O propilenoglicol, o mais polar dos solventes utilizados como promotores de penetração, é bastante eficaz, mas em concentrações elevadas pode apresentar tendência para provocar alguma irritação na pele.

Os solventes apróticos (dimetilformamida, dimetilacetamida e dimetilsulfóxido) foram utilizados durante muitos anos como promotores de penetração de diversos fármacos, nomeadamente antifúngicos, antibióticos, esteróides e anestésicos locais.

Também têm sido utilizados como promotores vários compostos apolares como o ácido oleico, o álcool láurico e o miristato de isopropilo. O ácido oleico e outros ácidos gordos têm a capacidade de aumentar a absorção percutânea não só dos fármacos, mas também de outras substâncias. Têm sido desenvolvidos vários métodos para estudar o efeito promotor do ácido oleico (55,56). Este composto, a pH neutro, pode ser considerado um agente emulsivo não iónico de baixo EHL.

Pirrolidonas

Sendo o ácido pirrolidono-carboxílico um dos constituintes do factor humectante natural, têm sido empregues como promotores de absorção cutânea a 2-pirrolidona, a N-metil-2-pirrolidona e os derivados substituídos na posição 1 e 4. As pirrolidonas podem ser utilizadas juntamente com uma grande variedade de compostos para promoverem a penetração e para estabelecerem um reservatório do fármaco no estrato córneo e nas unhas.

Apesar de se reconhecer que as pirrolidonas apresentam uma significativa actividade aceleradora da penetração, o seu uso apresenta algumas limitações, pois estas substâncias podem induzir fenómenos de

irritação, toxicidade e dor. A 2-pirrolidona tem a capacidade de promover a penetração de antibióticos, de anti-inflamatórios e da cafeína.

Ureia

A ureia é um promotor natural e os seus derivados cíclicos, facilmente metabolizáveis pelas esterases cutâneas, são compostos bastante promissores.

Tensioactivos

Os cremes têm na sua composição como agentes emulsivos os tensioactivos. No entanto, nas concentrações em que eles estão presentes praticamente não têm influência na permeabilidade cutânea.

A configuração dos agentes tensioactivos interfere com a sua capacidade promotora da absorção. As moléculas dos tensioactivos contêm porções hidrófobas (geralmente grupos arilo ou alquilo) e grupos hidrófilos que podem ser catiónicos, aniónicos ou não iónicos. Os tensioactivos podem também afectar a permeabilidade da pele à água, pois eles ligam-se às proteínas e "empurram" os grupos hidrófilos polares das proteínas para o interior das hélices. Deste modo, ficam à superfície das hélices muito poucos grupos carregados com capacidade de interagirem com a água e com outras substâncias. Os tensioactivos, possivelmente, promovem o seu próprio fluxo através da pele à medida que alteram as características de barreira.

Determinadas experiências realizadas com pele de coelho demonstraram que as preparações contendo tensioactivos alteram o conteúdo, a composição e a velocidade de biossíntese dos fosfolípidos da epiderme (57). Dado que os fosfolípidos são os principais componentes das membranas biológicas, as alterações referidas anteriormente indicam a possível ocorrência de modificações na estrutura da epiderme.

Embora, de um modo geral, sejam miscíveis com a água, os tensioactivos acima da concentração micelar crítica (CMC) formam agregados dinâmicos denominados micelas (Fig.22).

As micelas são vesículas, nas quais os monómeros se encontram alinhados expondo as cadeias hidrófobas para o interior e as cabeças hidrófilas para o exterior, ficando em contacto com o meio aquoso. A incorporação de um fármaco nas micelas, geralmente, baixa a sua actividade termodinâmica no veículo.

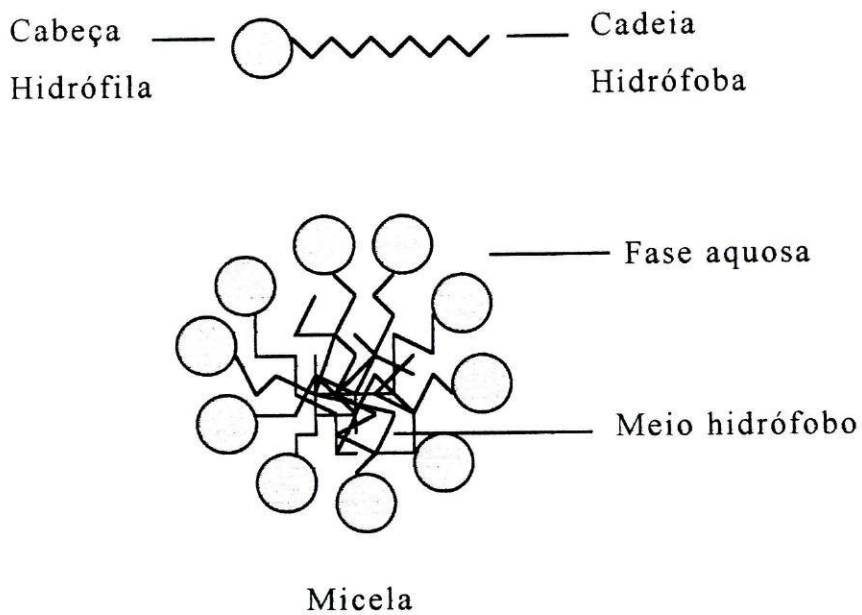


Fig. 22 - Representação de um tensioactivo e respectiva micela.

Os tensioactivos têm a propriedade de reduzir a tensão interfasial e, por isso, são muitas vezes utilizados para estabilizar emulsões água/óleo ou óleo/água.

Os tensioactivos podem interagir com as células queratinizadas do estrato córneo ou com os lípidos intercelulares. Tem sido demonstrado que

a diminuição da resistência oferecida pelo estrato córneo resulta da fluidificação ou da remoção dos componentes lipídicos da membrana. Walters *et al.* consideram que o efeito promotor dos tensioactivos se deve à facilidade com que eles penetram nas membranas lipídicas e demonstraram que os tensioactivos não iónicos são os que conseguem penetrar mais rapidamente nas monocamadas de colesterol (6).

Breuer admitiu que a energia de ligação entre os tensioactivos e as proteínas epidérmicas é uma combinação de ligações iónicas e de atracções hidrofóbicas entre as cadeias alquílicas e as proteínas e que essa energia aumenta com o aumento do comprimento das cadeias. No entanto, a energia necessária para penetrar na matriz proteica também se eleva com o aumento do comprimento da cadeia alquílica, com um óptimo em C-12. A interacção do tensioactivo com os filamentos de queratina das células queratinizadas provoca uma conversão $\alpha \Leftrightarrow \beta$ dos filamentos. Como resultado ocorre desenrolamento dos filamentos de queratina e tumefacção (58).

Tensioactivos não iónicos - Estes tensioactivos são bastante utilizados em produtos dermatológicos devido ao seu potencial de irritação relativamente baixo, não apresentando declaradamente efeitos lesivos na pele. Estes compostos provocam alterações no conteúdo, na composição e na velocidade de biossíntese dos fosfolípidos epidérmicos. Por este motivo, pela acção destes compostos, ocorrem alterações na estrutura da membrana epidérmica devido ao facto de os fosfolípidos serem os principais componentes das membranas biológicas.

Os tensioactivos não iónicos provocam a fluidificação dos componentes lipídicos do estrato córneo.

Tensioactivos catiónicos - A principal acção de alguns tensioactivos catiónicos verifica-se ao nível das fibras de queratina das células cornificadas e o rompimento da matriz célula/lípido promove o aumento da permeabilidade.

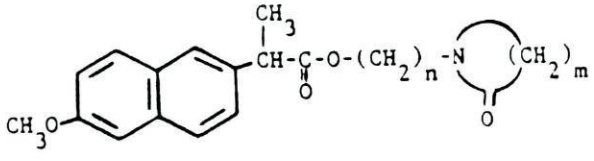
Tensioactivos aniónicos - Os tensioactivos aniónicos interactuam fortemente com a pele, podendo causar grandes alterações nas suas funções de barreira, o que sugere que compostos como o laurilsulfato de sódio podem penetrar através do estrato córneo e atingir a epiderme viável. Alguns tensioactivos deste grupo parecem ser capazes de interactuar fortemente com a queratina e com os lípidos. Pensa-se que estes tensioactivos se ligam fortemente com as α-proteínas, causando uma desnaturação reversível e um desenrolamento dos filamentos. A expansão da membrana, a formação de espaços e a perda de capacidade de ligação de água são compatíveis com a conversão α<=>β da queratina, induzida pela forte ligação do tensioactivo com as proteínas. De um modo geral, estes tensioactivos apresentam maior eficácia na promoção da absorção do que os tensioactivos catiónicos e não iónicos.

Um dos tensioactivos mais utilizados em preparações dermatológicas é o laurilsulfato de sódio. Este composto remove os lípidos intercelulares provocando um aumento da desidratação. Este composto também se liga extensamente à queratina intracelular o que explica alguns efeitos irritantes na pele. Têm sido descritos alguns efeitos indesejáveis do LsS, pois este composto, devido ao facto de provocar a perda transepidérmica de água, induz a vasodilatação local e diminui as propriedades de retenção de água da pele (59).

O LsS aplicado topicamente pode penetrar directamente até uma profundidade de 5-6 mm abaixo do local de aplicação. Pode também detectar-se na corrente sanguínea determinada quantidade de LsS aplicado topicamente. No entanto, os níveis geralmente encontrados são bastante inferiores aos necessários para produzir efeitos sistémicos indesejáveis. Persistem vestígios de LsS sete dias após uma única exposição da pele ao composto durante 24 horas (59).

Geralmente, as alterações produzidas pelos promotores são reversíveis. No entanto, há situações em que estes compostos podem causar danos irreversíveis.

Há casos em que a inclusão de promotores nas formulações pode aumentar a penetração não só do princípio activo, mas também de outros componentes potencialmente irritantes. O recurso aos pró-fármacos parece ser um método alternativo e bastante promissor para aumentar a penetração cutânea dos fármacos. O conceito de pró-fármaco envolve a transformação química do fármaco numa forma biorreversível de modo a alterar as suas propriedades farmacêuticas e farmacocinéticas e, assim, aumentar a sua capacidade de permeação. Com a finalidade de se obterem pró-fármacos do naproxeno com melhor poder de penetração cutânea, Bonina *et al.* sintetizaram vários ésteres 1-Alquilazacicloalcano-2-ona (Fig.23) (60).



I	n= 1	m= 3
II	n= 1	m= 4
III	n= 1	m= 5
IV	n= 1	m= 6
V	n= 2	m= 3
VI	n= 2	m= 4
VII	n= 2	m= 5
VIII	n= 2	m= 6

Fig. 23 - Estrutura química dos ésteres do naproxeno I-VIII

Actualmente, são também investigados meios físicos, como a sonoforese e a iontoforese, com a finalidade de melhorar a penetração cutânea dos medicamentos. A iontoforese permite a permeação de moléculas ionizadas pela influência da corrente eléctrica e tem sido explorada experimentalmente para a penetração cutânea, sobretudo, de proteínas e peptídeos.

3.4.2. Preparação dos cremes contendo promotores de absorção

Prepararam-se cinco formulações (F_1, F_2, F_3, F_4 e F_5) contendo, respectivamente, ácido oleico, propilenoglicol, laurilsulfato de sódio (LsS), *Tween 80* (T80) e 2-pirrolidona como promotores de penetração. Em cada uma das preparações foi posteriormente incorporado por espatulação o fármaco - 10% de naproxeno (m/m).

No Quadro XIV estão representadas as diversas formulações nas quais foi incorporado o naproxeno. As formulações foram preparadas de modo idêntico ao descrito em 3.3.2., tendo o LsS, o T80 e a 2-pirrolidona sido adicionados à fase aquosa e o propilenoglicol e o ácido oleico à fase oleosa. Posteriormente foi incorporado por espatulação 10% de naproxeno, em cada uma das preparações.

Quadro XIV - Composição das formulações expressa em gramas.

	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5
Ácido esteárico	18,00	24,00	24,00	24,00	24,00
Trietanolamina	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
Glicerina	13,60	-	13,60	13,60	13,60
Nipagin	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Ácido oleico	6,0	-	-	-	-
Propilenoglicol	-	10,00	-	-	-
LsS	-	-	0,25	-	-
Tween 80	-	-	-	0,50	-
2-Pirrolidona	-	-	-	-	2,00
Água destilada q.b.p.	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Todas as matérias primas utilizadas eram da firma Vaz Pereira Lda., com excepção da 2--pirrolidona que foi cedida pela BASF.

3.4.3. Ensaio de difusão "in vitro" do naproxeno

As preparações descritas no Quadro XIV foram também submetidas a uma série de ensaios de difusão "in vitro", como foi descrito em 3.3.4., com a finalidade de se eleger aquela que apresentava melhores características de penetração cutânea.

Resultados:

No Quadro XV estão representados os resultados dos ensaios de difusão "in vitro" do naproxeno. Os resultados (em miligramas) foram calculados através das equações 7 e 8 descritas anteriormente em 3.3.3. e correspondem à média de três determinações.

A quantidade acumulada de naproxeno das fórmulas F_1, F_2, F_3, F_4, e F_5, que difunde através da pele excisada de rato está representada, respectivamente, nas Fig. 24, 25, 26, 27, 28.

Quadro XV - Quantidade acumulada de naproxeno (mg) que difunde em função do tempo

Tempo (min.)	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	Gele
0	0	0	0	0	0	0
30	1,5±1,1	2,4±1,8	2,8±1,9	1,1±0,5	0	0,8±0,6
60	3,4±2,2	3,0±2,1	5,2±2,9	2,8±1,0	0	1,7±0,8
120	5,9±4,2	4,9±2,9	8,3±2,9	4,2±0,5	3,4±2,5	2,6±0,9
180	8,8±5,6	7,3±4,0	10,7±4,3	5,7±0,8	5,8±3,3	3,8±0,6
240	11,5±7,3	8,6±5,2	11,9±4,9	7,0±1,1	7,9±3,4	4,8±0,2
300	11,9±6,4	10,0±6,4	14,9±3,2	8,2±1,2	9,0±4,8	5,6±0,1
360	14,0±6,2	11,0±6,5	17,0±3,5	9,1±2,2	10,4±4,1	6,6±0,8

Os resultados correspondem à média de três determinações ± desvio padrão.

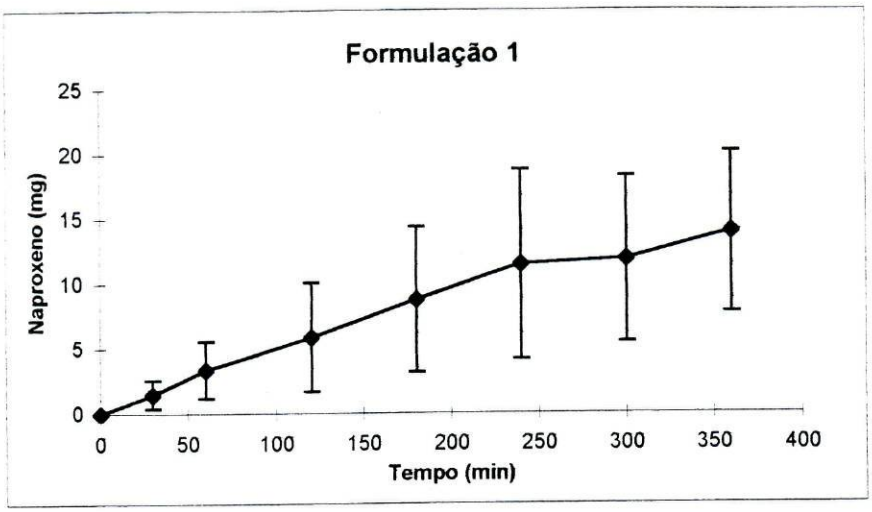


Fig. 24 - Quantidade acumulada de naproxeno da F_1 que difunde.

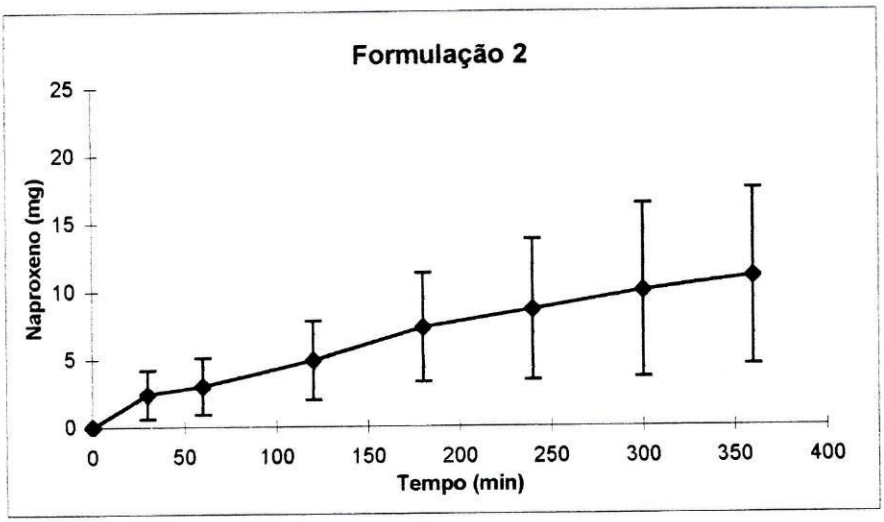


Fig. 25 - Quantidade acumulada de naproxeno da F_2 que difunde.

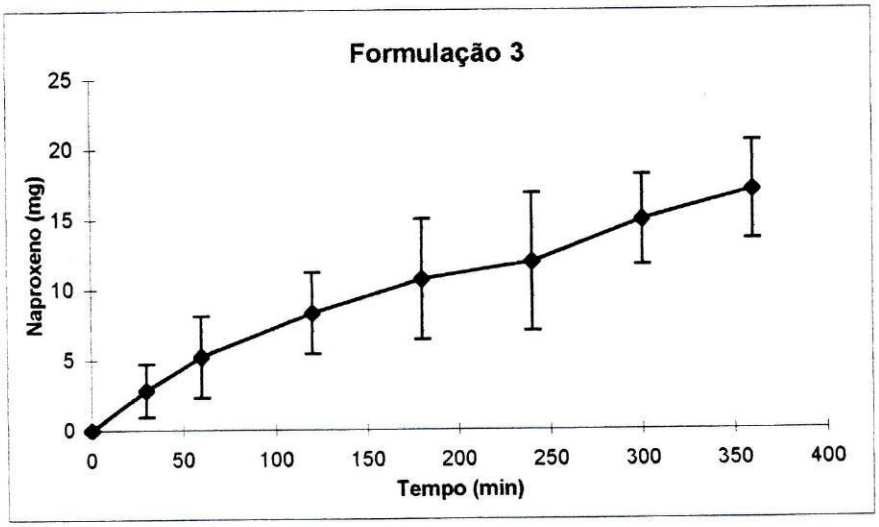


Fig. 26 - Quantidade acumulada de naproxeno da F_3 que difunde.

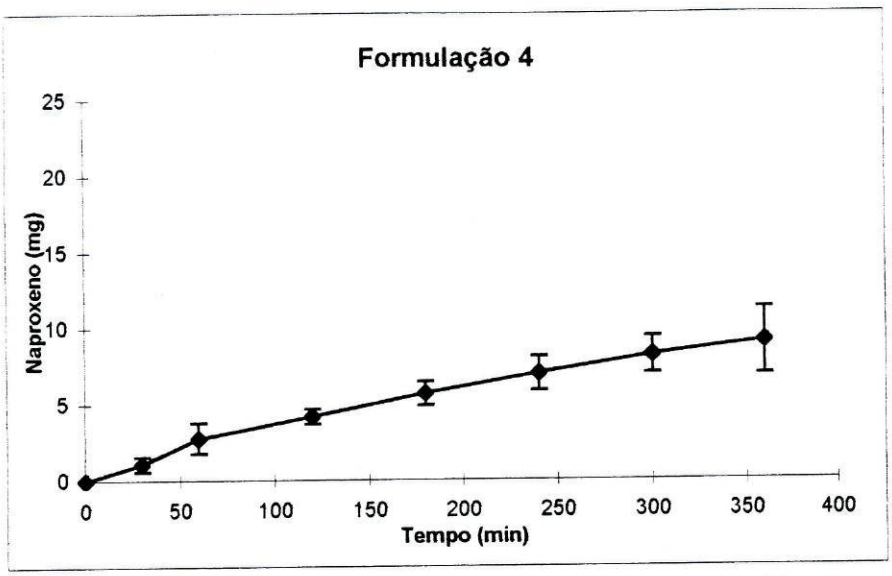


Fig. 27 - Quantidade acumulada de naproxeno da F_4 que difunde.

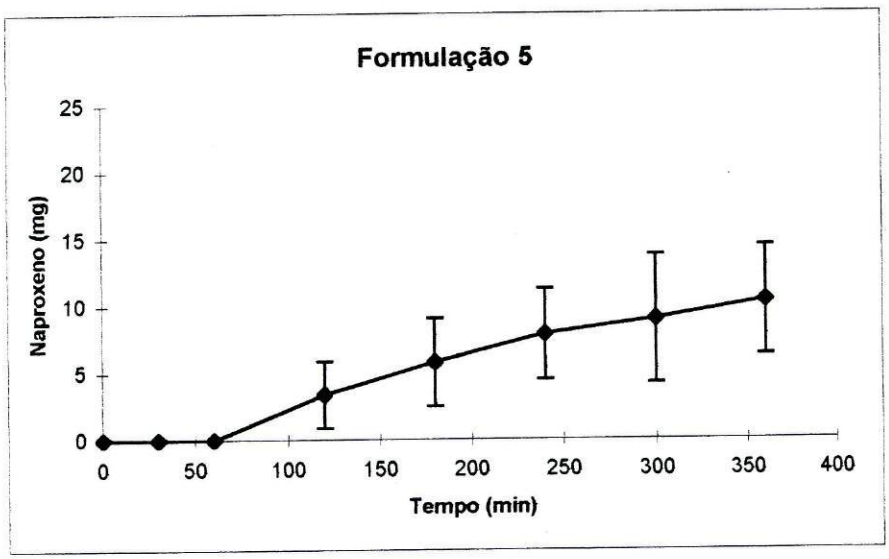


Fig. 28 - Quantidade acumulada de naproxeno da F_5 que difunde.

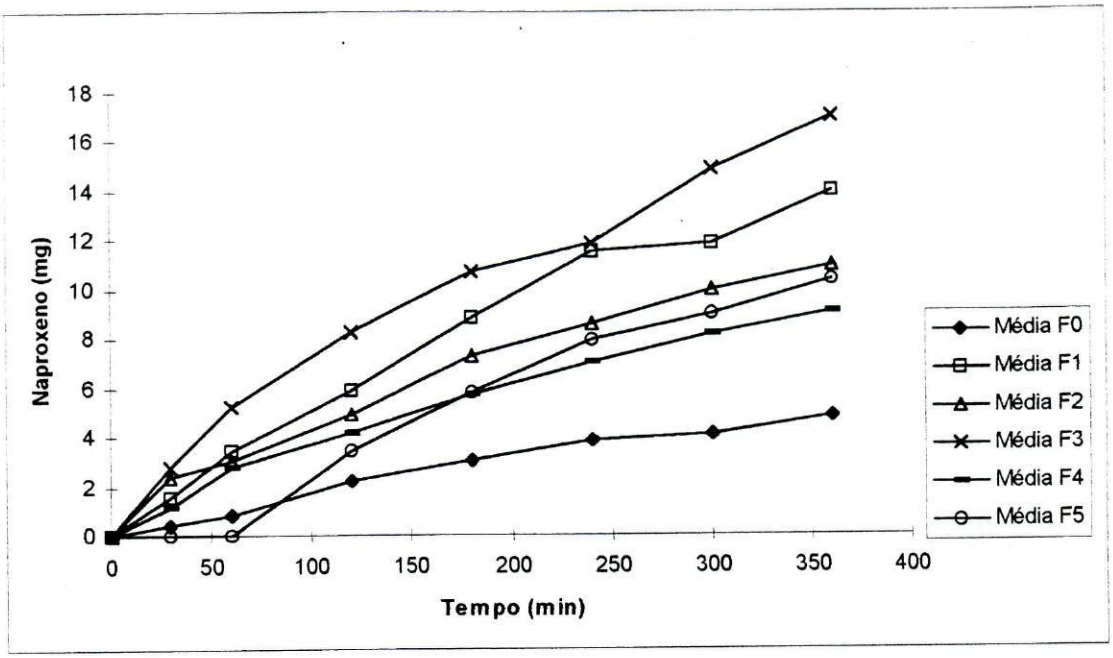


Fig. 29 - Quantidade acumulada de naproxeno que penetra em função do tempo.

Como se pode observar através do gráfico, a fórmula contendo LsS a 0,25% como promotor de penetração (F_3) foi a que apresentou maior poder de penetração ao fim das seis horas de ensaio. No entanto, a análise de variância dos resultados da F_3 relativamente às outras fórmulas ensaiadas (teste t de *Student*, para um nível de significância de 5% e 4 graus de liberdade) demonstrou existirem diferenças significativas apenas em relação à formulação F_4 e à formulação sem promotor (F_0).

Chowhan e Pritchard em ensaios realizados para avaliar o efeito dos tensioactivos na absorção percutânea do naproxeno verificaram que o efeito dos tensioactivos não iónicos, catiónicos e anfotéricos no fluxo relativo do naproxeno era pequeno. Os mesmos autores verificaram também que os tensioactivos aniónicos como o laurato de sódio e o laurilsulfato de sódio produziam um apreciável aumento do fluxo do naproxeno "in vitro" (61,62).

Na Fig.30 estão representadas as velocidades de penetração ($\Delta Q/\Delta t$) relativas à F_0 e à F_3.

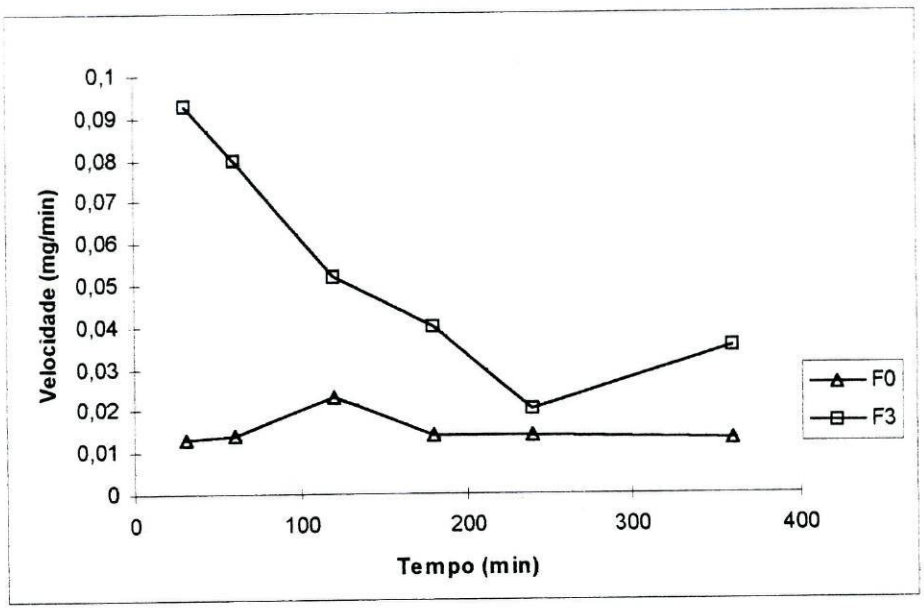


Fig.30 - Velocidade de penetração da F_0 em comparação com a da F_3.

A fórmula F_3 apresenta uma velocidade de penetração muito superior à F_0 nos primeiros 60 minutos de ensaio, diminuindo progressivamente à medida que as concentrações na fase receptora se vão aproximando das concentrações na fase dadora. No caso da fórmula F_0 a velocidade de penetração não sofre grandes alterações ao longo do tempo. Pela análise do gráfico pode concluir-se que o LsS promove de forma significativa a penetração do naproxeno através da pele excisada de rato.

3.4.4. Comparação dos cremes com um gele comercializado em Portugal

Realizaram-se ensaios de difusão "in vitro" do naproxeno contido num gele comercializado em Portugal (*Naprosyn gel* da Cilag-Medicamenta) em condições idênticas às descritas anteriormente. O *Naprosyn gel* é um gele transparente com uma concentração em naproxeno de 10% (m/m).

Resultados:

No Quadro XV encontram-se os resultados deste ensaio comparativamente com os resultados obtidos com as cinco fórmulas ensaiadas. Na Fig. 31 está representada a quantidade acumulada de naproxeno contido no gele, que difunde ao longo das 6 horas de ensaio.

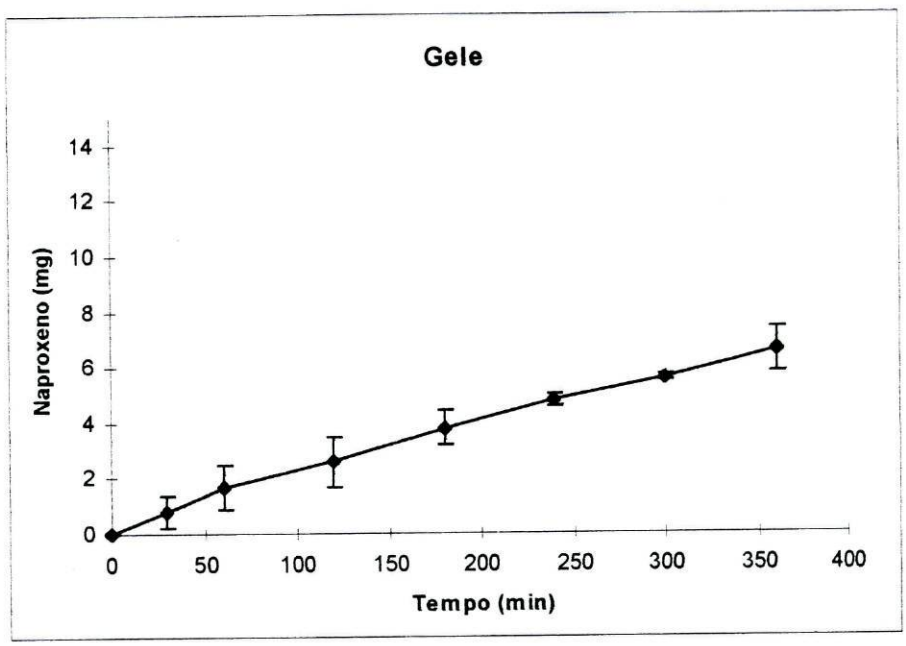


Fig. 31 - Quantidade acumulada de naproxeno contido no gele que difunde em função do tempo.

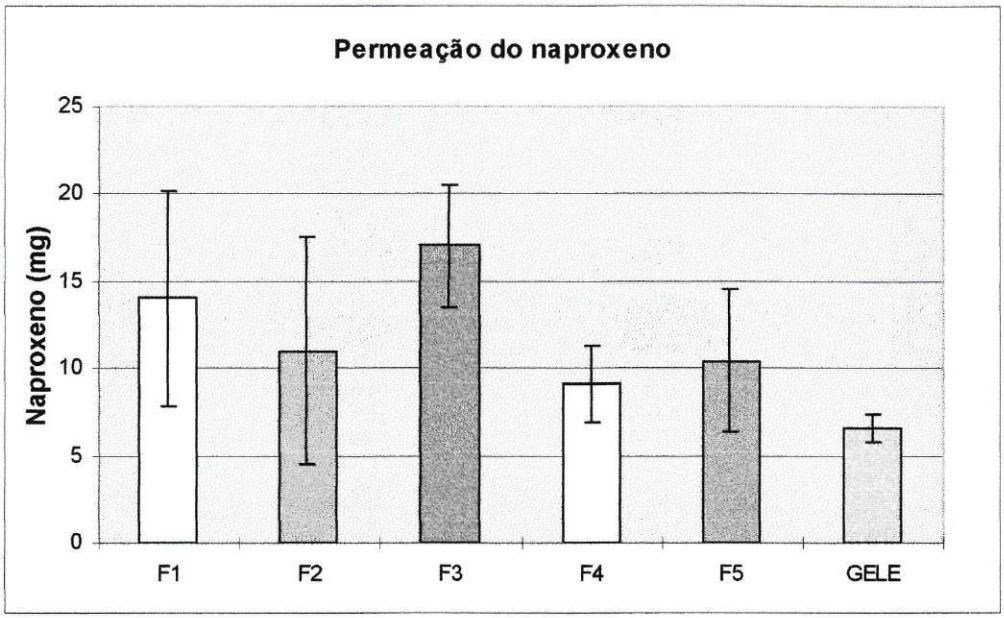


Fig. 32 - Difusão "in vitro" do naproxeno contido num gele comercial ao fim de 6 horas de ensaio, comparativamente com a das diversas fórmulas ensaiadas.

Como se pode verificar pelo gráfico representado na Fig.32, ao fim de 6 horas de ensaio, o naproxeno contido no gele apresenta um nível de penetração inferior à maioria das fórmulas em creme. A análise de variância dos valores de penetração do gele relativamente às formulações em creme (teste t de *Student* para um nível de significância de 5% e 4 graus de liberdade) revelou não existirem diferenças significativas entre os níveis de penetração do naproxeno contido no gele relativamente às formulações F_2 e F_4.

3.5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os estudos de pré-formulação forneceram indicações acerca do naproxeno que permitiram seleccionar de forma coerente o excipiente mais apropriado para o desenvolvimento de uma preparação viável do ponto de vista terapêutico. A incorporação do naproxeno num creme do tipo O/A (diadermina) teve como objectivo a elaboração de uma forma galénica com penetração do tipo diadérmico.

Os ensaios de libertação do naproxeno incorporado na preparação sem promotor (F_0) permitiram concluir que o fármaco tem capacidade de se libertar do excipiente, apresentado um perfil de libertação que está de acordo com a teoria de Higuchi.

A natureza lipófila do naproxeno faz prever a sua passagem através da pele pela via transepidérmica. Uma vez na fase receptora (solução tampão de fosfatos de pH 7,4) o naproxeno passa à forma iónica solúvel em solução aquosa.

Devido ao facto de a preparação F_0 apresentar uma baixa velocidade de penetração "in vitro", procedeu-se ao estudo da influência de vários promotores de penetração incorporados na mesma formulação base. A F_3, apesar de ser a fórmula que apresentava uma menor percentagem de agente promotor (0,25% de LsS), foi uma das preparações que apresentou maiores níveis de penetração, ao fim de 6 horas de ensaio.

O LsS é um tensioactivo e este tipo de compostos, em solução aquosa, acima da concentração micelar crítica tem tendência a formar micelas. As micelas têm a capacidade de incluir no seu interior as moléculas do fármaco, facilitando a sua passagem através da pele. Além disso, os tensioactivos ao fazerem baixar a tensão interfasial creme/membrana, também aumentam a absorção pela via anexial.

A configuração da micela tem influência não só na quantidade de fármaco que nela se fixa, mas também na facilidade com que este se

consegue libertar. Segundo Rehbinder, para pequenas concentrações de tensioactivo as micelas adquirem forma esférica, passando à forma de bastonete até formarem uma dupla camada, consoante aumenta a quantidade do agente tensioactivo. A utilização de 0,25% de LsS na preparação da fórmula F_3, justifica-se pelo facto de vários ensaios "in vitro" utilizando este agente tensioactivo terem demonstrado ser esta a concentração que promovia uma maior penetração dos fármacos através da pele (63).

O efeito promotor do LsS está relacionado com a afinidade que este composto tem para a α-queratina. A ligação do LsS com esta proteína da pele provoca a sua desnaturação e a consequente distensão dos filamentos, fragilizando as propriedades de barreira cutâneas.

A realização de ensaios em que se utilizam amostras biológicas, conduz, geralmente, à obtenção de resultados diferentes relativos à mesma amostra analisada rigorosamente nas mesmas condições. Essa variabilidade nos resultados é bastante relevante quando se trata de ensaios em que se utiliza pele, pois esta pode apresentar algumas diferenças mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Pelas razões referidas é conveniente realizar vários ensaios da mesma amostra (no mínimo três) para que se possam obter resultados de maior confiança. Os desvios padrão dos resultados das experiências "in vitro" relativas a algumas das preparações estudadas reflectem, de certa forma, a grande variabilidade das amostras de pele utilizadas nos ensaios.

O estudo comparativo das várias preparações em creme, com um gele comercial permitiu concluir que a maioria das fórmulas ensaiadas apresentaram, ao longo de 6 horas, níveis de penetração mais elevados do que a forma comercial denominada *Naprosyn gel*. No entanto, não se podem tirar conclusões definitivas apenas através da realização de ensaios "in vitro". Os ensaios "in vitro" são úteis, nomeadamente quando se pretendem comparar diversas formulações, mas não representam exactamente o que

ocorre "in vivo" e por isso, por vezes, é necessário recorrer a estes para se obterem resultados mais fiáveis.

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV

CONTROLO DE QUALIDADE DO PRODUTO ACABADO

4.1. INTRODUÇÃO

A qualidade de um medicamento passa pela procura da maior eficácia por forma a evitar ou curar a doença com a maior inocuidade possível. Para que a qualidade do medicamento seja atingida, é necessário haver investigação e concepção das matérias-primas numa fase inicial de fabrico, formulação, ensaios clínicos, controlo, validação de métodos, estudos de estabilidade e também normas de boa fabricação e distribuição.

Como qualidade de fabrico entende-se a manutenção, de unidade para unidade e de lote para lote, das características do produto através de normas e controlos intensivos e contínuos.

O conceito de controlo de qualidade é muito menos lato que o conceito de garantia de qualidade. O primeiro destina-se a verificar se os medicamentos estão de acordo com as especificações, enquanto que a garantia de qualidade abrange um conjunto de acções planeadas e sistematizadas que garantem um grau de confiança adequado para que o produto, e neste caso o medicamento, cumpra os requisitos previstos para o fim a que se destina.

Um sistema de garantia de qualidade requer procedimentos documentados que, quando seguidos, permitem obter produtos mais eficazes e seguros. As normas ISO 9000 constituem um sistema para a gestão e garantia da qualidade de produtos industriais e serviços, composto por uma série de 5 normas criadas em 1987 pela "International Standard Organization" (ISO), sediada em Genebra. Um sistema de garantia de qualidade baseado na ISO 9000 é um fundamento excelente para um sistema de qualidade total (64). As Normas NP EN 29000 são a versão portuguesa

das Normas Europeias EN 29001, 29002, 29003 e 29004, as quais têm origem nas normas ISO.

O controlo farmacêutico de qualidade deve garantir a conformidade do medicamento com as especificações que lhe dizem respeito, bem como a sua inocuidade e eficácia, de modo que cada lote preparado tenha características idênticas às do lote padrão. O controlo de qualidade executado em lotes piloto e algumas vezes durante o fabrico ou no produto acabado torna possível comprovar que se respeitam os princípios básicos aceites e que todo o processo satisfaz às exigências criadas na formulação. Daqui poderem estabelecer-se, para cada caso, as Boas Práticas de Fabrico (BPF) ou *Good Manufacturing Practice* frequentemente representadas pela sigla G.M.P.

A maior parte dos produtos de aplicação cutânea (cremes, pomadas propriamente ditas, geles), devido ao facto de não serem nem líquidos (como os injectáveis) nem sólidos (como os comprimidos), podem manifestar problemas de estabilidade específicos. Consequentemente, as técnicas de envelhecimento utilizadas para avaliar a estabilidade dos produtos de aplicação dérmica, muitas vezes, têm que ser adaptadas ao produto em estudo para que possa ser detectado qualquer tipo de instabilidade e/ou alterações nas propriedades reológicas da preparação.

Os ensaios realizados após a preparação das formas farmacêuticas são bastante diversificados e têm por objectivo o conhecimento, o mais aprofundado possível, das características essenciais para a definição do produto.

Os ensaios de rotina realizados durante e após o fabrico têm a finalidade de assegurar a qualidade do produto e verificar a reprodutibilidade do fabrico (65).

Pode definir-se estabilidade de uma preparação farmacêutica como o grau de resistência da mesma às alterações químicas e físicas. A eficácia de

uma preparação farmacêutica deve permanecer constante (ou alterar-se apenas dentro dos limites legais), até à data de expiração da validade.

O estado de um princípio activo incorporado num creme pode evoluir em função de determinados factores como, por exemplo, a temperatura. Um princípio activo disperso pode sofrer modificações no tamanho e na forma das suas partículas e um princípio activo dissolvido pode cristalizar.

No QuadroXVI estão representados os factores internos e externos que influenciam a estabilidade dos fármacos.

Quadro XVI - Factores que influenciam a estabilidade dos fármacos

Factores internos	Factores externos
Interacções fármaco-fármaco	Componentes da atmosfera (O_2, CO_2, H_2O)
Interacções fármaco-excipientes	Temperaturas elevadas
	Luz
	Interacções fármaco-embalagem

No Quadro XVII estão indicadas as principais alterações químicas que podem ocorrer nos componentes das preparações farmacêuticas durante o armazenamento.

Quadro XVII

Alterações químicas
Hidrólises
Oxidações
Racemizações
Isomerizações
Polimerizações
Decomposição enzimática
Rearranjo estérico

No capítulo anterior foi demonstrado que a F_3 é a fórmula que apresenta melhores características de penetração "in vitro". Por este motivo, os ensaios de controlo de qualidade a seguir descritos são relativos a este creme após a preparação e ao longo do tempo de armazenamento a três temperaturas diferentes (5°C, 25°C e 40°C).

4.2. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

A análise das características organolépticas dos cremes dá-nos a primeira noção acerca da sua qualidade. Qualquer indivíduo, após a aplicação de um creme na pele, submete-o involuntariamente a uma análise visual, olfactiva e táctil.

A fórmula F_3 apresenta cor branca opaca, aspecto homogéneo sem grumos, ausência de odor e consistência semi-sólida, espalhando-se com facilidade na pele.

A análise das características organolépticas foi realizada logo após a preparação e durante o estudo da estabilidade do produto acabado.

As características organolépticas podem ser avaliadas com maior rigor através da análise microscópica de uma pequena amostra do produto.

Análise microscópica

O exame microscópico tem como objectivo avaliar o tamanho, a forma e a homogeneidade de distribuição das gotículas de gordura. Este exame permite também avaliar a presença de partículas em suspensão ou de bolhas de ar.

A uniformidade do tamanho das gotículas é muito importante para a estabilidade do creme, pois se existirem partículas muito pequenas e outras de maiores dimensões, acontece que aquelas se aglomeram entre estas últimas, resultando a coalescência da fase interna. A coalescência ou reagrupamento dos glóbulos da fase dispersa pode conduzir à separação de

fases, ficando desfeita a emulsão. O ritmo de coalescência depende, além de outros factores, das características do agente emulsivo primário, pois quanto mais eficaz for a película interfasial que este origina, mais retardado será o reagrupamento das gotículas da fase dispersa.

Aparelhagem:

Microscópio Nikon

Objectiva micrométrica Nikon

Lâminas

Lamelas

Procedimento:

Colocar sobre a lâmina de vidro uma pequena porção de creme. Recobrir a amostra de creme com uma lamela de forma a obter uma película fina premindo ligeiramente para eliminar as bolhas de ar.

Observar com a objectiva de 40 X.

Medir, pelo menos, 300 gotículas do creme.

Resultados:

Ao microscópio o creme apresentava um aspecto homogéneo, sem partículas em suspensão e sem bolhas de ar.

No Quadro XVIII estão representados os resultados da avaliação das dimensões das gotículas oleosas da fase interna da fórmula F_3 após a preparação e 4 meses após o seu armazenamento a 5°, 25° e 40° C.

Quadro XVIII - Dimensões das gotículas oleosas.

Intervalo de dimensões (μm)	Após a preparação	4 Meses		
		5°C	25°C	40°C
< 25	79%	83%	80%	61%
25 - 50	18%	10%	12%	23%
> 50	3%	7%	8%	16%

40 divisões da ocular micrométrica ⇔ 10 divisões da objectiva

1 divisão da objectiva ⇔ 0,01 mm

1 divisão da ocular ⇔ 2,5 μm

Quatro meses após a preparação da fórmula F_3, esta apresentou uma maior percentagem de gotículas oleosas de grandes dimensões (> 50μm), sendo este facto mais relevante no caso do creme conservado à temperatura de 40°C. Dado que a coalescência das gotículas oleosas é mais acentuada em situações de temperatura mais elevada, é conveniente aumentar a quantidade de agente emulsivo da fórmula de modo a melhorar a capacidade de fazer baixar a tensão interfasial.

4.3. DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH das preparações dérmicas é extremamente importante, pois é conveniente que estas apresentem um pH compatível com a zona de aplicação. Além disso, a determinação do pH fornece indicações acerca da eventual ocorrência de alterações químicas.

Procedeu-se à determinação potenciométrica do pH da formulação F_3 armazenada em recipiente vedado a diferentes temperaturas (5°, 25° e 40°C), de acordo com a F.P.V.

Aparelhagem:

691 pH Meter METROHM

Agitador magnético Heidolph MR 2002

Procedimento:

Homogeneizar o creme, pesar 5,0g para num copo de 250ml e adicionar 100g de água neutra. Após a obtenção de uma mistura homogénea mediante agitação, proceder à determinação do pH.

Resultados:

Os resultados das determinações do pH do creme armazenado a diferentes temperaturas ao longo de três meses estão representados no Quadro XIX.

Quadro XIX - Valores de pH do creme armazenado a diferentes temperaturas em função do tempo.

Tempo	5°C	25°C	40°C
1 dia	6,1	6,1	6,1
15 dias	6,1	6,1	6,2
30 dias	6,2	6,2	6,2
60 dias	6,2	6,2	6,2
90 dias	6,2	6,2	6,2

Como se pode observar pela análise dos resultados do Quadro XIX, o pH manteve-se sem grandes alterações ao longo de 3 meses.

4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA

A determinação do teor de água é um ensaio delicado, extremamente variável nos seus resultados consoante a técnica utilizada. Este tipo de determinação possibilita a avaliação da eficácia do agente humectante contido na formulação.

Os cremes do tipo O/A são muito susceptíveis à perda de água por evaporação devido ao facto de a fase aquosa ser a fase externa. A quantidade de água evaporada depende de vários factores, tais como a temperatura, a humidade e a superfície de exposição do creme.

Determinou-se o teor de água do creme F_3 conservado em bisnagas de alumínio fechadas, pelo método de Karl-Fisher. Este método baseia-se na redução do iodo pelas moléculas de água. Quando toda a água tiver reagido com o iodo, forma-se um sistema de duas espécies solúveis em equilíbrio (iodo/iodeto), ocorrendo passagem de corrente entre dois eléctrodos de platina aos quais é aplicada uma pequena diferença de potencial (66).

Aparelhagem e reagentes:

METROHM 652 KF - Coulometer

Reagente iodossulforoso (Merck)

Metanol anidro (Merck)

Procedimento:

Diluir a amostra em metanol anidro e injectá-la sob a forma de uma dispersão metanólica.

Fazer um ensaio em branco.

Resultados:

Os resultados da avaliação do teor de água do creme armazenado a 5°C, 25°C e 40°C estão representados no Quadro XX.

Quadro XX - Teor de água do creme armazenado a diferentes temperaturas.

Temperatura	5° C	25° C	40° C
Após a preparação	52,1%	52,1%	52,1%
3 meses após a preparação	52,3%	52,4%	53,2%

As determinações do teor de água não apresentaram grandes variações 3 meses após a preparação do creme.

4.5. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

É desnecessário referir que é indesejável que os medicamentos contenham um nível considerável de microrganismos. Um grau "tolerável" de contaminação dependerá do tipo de preparação, do modo de aplicação e das espécies de microrganismos contaminantes.

Em preparações de aplicação cutânea, um baixo grau de contaminação microbiana não patogénica pode ser tolerado. No entanto, espécies designadas inofensivas, em condições específicas podem conduzir a efeitos indesejáveis, pois a virulência depende das sub-espécies de microrganismos e do paciente. A maior parte dos incidentes que ocorrem no caso das

preparações de aplicação cutânea - particularmente cremes e pomadas propriamente ditas - são devidos a bactérias Gram-negativo. A presença de fungos é também indesejável porque há várias micotoxinas que podem exibir efeitos carcinogénicos, hepatotóxicos ou mutagénicos.

Se um medicamento contém uma quantidade considerável de microrganismos não patogénicos, embora possa não existir directamente perigo para o doente, pode ocorrer degradação dos princípios activos e consequente redução do efeito terapêutico. Além disso, as alterações físicas, químicas e/ou bioquímicas resultantes de uma contaminação microbiana significativa podem afectar o aspecto e a estabilidade da preparação farmacêutica (67).

Os cremes são produtos muito susceptíveis a contaminações microbianas. A aplicação estrita das boas práticas de fabrico e de produção farmacêutica e ainda o estabelecimento de normas de contaminação microbiana para as diversas matérias primas devem limitar as contaminações no decurso do fabrico.

Os ensaios microbiológicos não devem ser apenas realizados após a preparação do produto, mas também ao longo do armazenamento, pois qualquer que seja o sistema de conservação escolhido, há sempre o risco de contaminação por parte de um germe resistente (65).

As preparações dérmicas que não se destinem a ser aplicadas em feridas abertas ou nos olhos são consideradas como produtos não obrigatoriamente estéreis. No caso das preparações dérmicas não obrigatoriamente estéreis, os ensaios microbiológicos devem compreender (28):

- Contagem de germes aeróbios viáveis totais (bactérias, fungos e leveduras).
- Pesquisa de microrganismos específicos (enterobactérias, *S. Aureus* e *P. Aeruginosa).*

Aparelhagem e material:

Autoclave

Agitador mecânico Heidolph MR 2002

Estufa Heraeus

Balança Mettler AE 200

Bico de Bunsen

Balões de 250 ml de boca larga

Matrazes de 250 ml de boca larga

Pipetas graduadas de 1,0 e de 10,0ml

Placas de Petri estéreis

Ansa

Espátulas

4.5.1. Determinação dos germes aeróbios viáveis totais em placas de gelose

Os ensaios de determinação dos germes aeróbios viáveis totais foram realizados de acordo com a F.P V, em condições rigorosas de assepsia de forma a minimizar o risco de contaminação acidental do produto em análise (28).

Preparação da amostra - Pesar 10g de creme, suspendê-lo, mediante agitação vigorosa, na solução de peptona tamponada, com cloreto de sódio, de pH 7,0 e completar o volume de 100 ml com a mesma solução.

Determinação de bactérias - Introduzir 1 ml de amostra em placas de Petri estéreis e cerca de 15 ml de meio PCA (Plate Count Agar) liquefeito. Incubar as placas a 30-35°C durante 5 dias.

Determinação de fungos e leveduras - Procedeu-se de modo idêntico ao descrito anteriormente para as bactérias, mas neste caso foi utilizado o

meio de Sabouraud e as placas foram deixadas a incubar à temperatura de 20-25°C durante 5 dias.

4.5.2 Pesquisa de microrganismos específicos

Escherichia Coli - Preparar uma amostra de modo idêntico ao descrito para a determinação dos germes aeróbios viáveis totais, mas utilizar o meio líquido lactosado em vez da solução de peptona tamponada. Homogeneizar e deixar a incubar algumas horas para revivificar as bactérias. Semear 1 ml da amostra preparada em 100ml de meio de Mac Conkey líquido e deixar a incubar em estufa a 43-45°C durante 24 horas. Efectuar subculturas em placas contendo meio de Mac Conkey sólido, as quais são deixadas 24 horas a incubar à temperatura de 43-45°C.

Pseudomonas aeruginosa - Proceder a uma cultura de enriquecimento semeando 100 ml de meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth) com 10 ml da amostra preparada para a determinação dos germes aeróbios viáveis totais. Incubar a cultura de enriquecimento a 35-37°C durante 24 horas. Preparar subculturas em placas contendo meio gelosado de cetrimida. As placas são incubadas a 35-37°C durante 48 horas.

Staphylococcus aureus - Proceder à preparação de subculturas em Manitol Salt Agar a partir da cultura de enriquecimento preparada como indicado para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa.* Incubar as placas a 35-37°C durante 48 horas.

Resultados:

-Não se verificou o desenvolvimento de qualquer tipo de microrganismos no creme após preparação.

-Não se verificou o desenvolvimento de fungos nem de bactérias no creme acondicionado em bisnagas de alumínio, mantidas fechadas, 3 meses após o seu armazenamento a 5°C, 25°C e a 40°C.

-Não ocorreu desenvolvimento de nenhum microrganismo específico 3 meses após o acondicionamento do creme em bisnagas de alumínio fechadas e armazenado a 5°C, 25°C e 40°C.

No Anexo 2 está representada a composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios de controlo microbiológico.

4.6. PENETROMETRIA

A determinação da consistência de uma preparação semi-sólida por penetrometria consiste em fazer cair sobre esta um corpo rígido de forma e massa conhecidas, a uma temperatura estabelecida.

Embora o método da penetrometria tenha interesse prático, a determinação isolada da profundidade atingida por um cone num produto não é suficientemente elucidativa. Velon propôs o emprego de uma equação empírica, exprimindo a penetração em função do tempo, cujos parâmetros dependiam da consistência do produto em análise:

$$h = a \log t + b \quad \text{(Eq.10)}$$

sendo

h - a profundidade atingida ao fim do tempo t,

a - o coeficiente angular,

b - o valor da penetração ao fim de 1 segundo.

O coeficiente *b* dá ideia da consistência do creme, aumentando à medida que aquela diminui. O coeficiente angular (a) praticamente não varia com a consistência, podendo o seu valor servir para diferenciar duas pomadas que apresentem um *b* com a mesma grandeza. Delonca *et al.* demonstraram que a equação proposta por Velon se verificava na prática

para qualquer penetrómetro de forma cónica, independentemente da sua massa (68).

Aparelhagem:

Penetrómetro da F.P.V (Fig. 31)

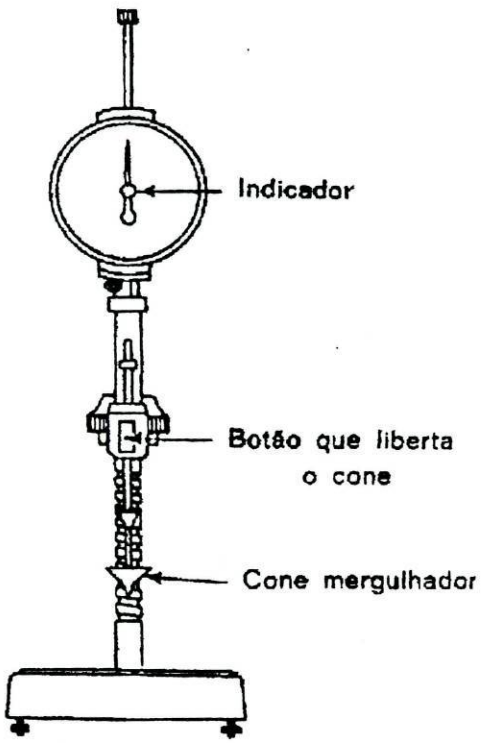


Fig. 31 - Penetrómetro da F.P.V

Procedimento:

Colocar o vértice do cone menor em contacto com a superfície da amostra do creme (conservado 24 horas a 25°C). Deixar cair o cone no seio do creme durante 5 segundos e avaliar a penetração. A profundidade de penetração é expressa em décimos de milímetro pela média aritmética de 3 resultados.

Resultados:

Quadro XXI - Valores de penetrabilidade, em décimos de milímetro, em função do tempo e da temperatura de armazenamento.

Tempo (dias)	5° C	25° C	40° C
1	318	318	318
30	280	273	270
90	260	245	250
120	240	240	225

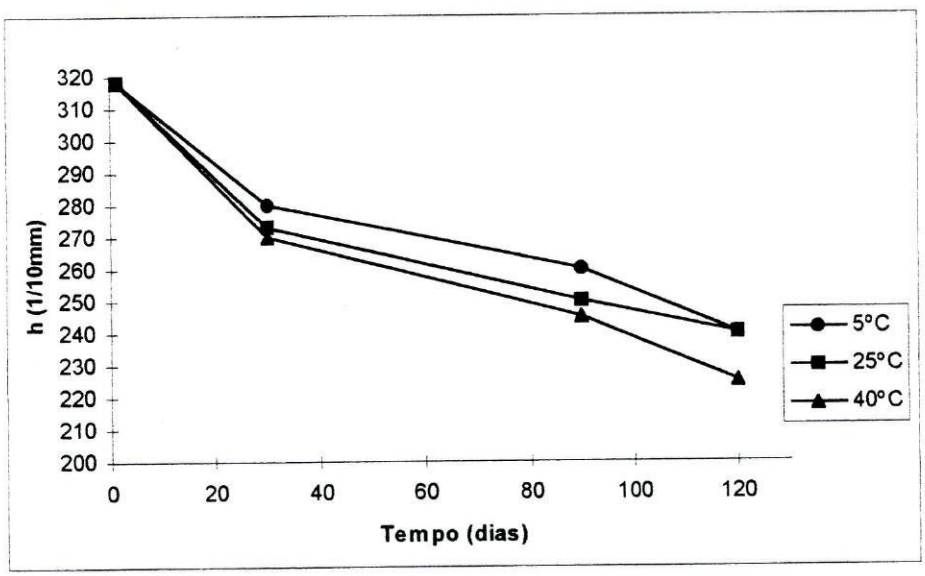


Fig.32 - Profundidade de penetração em função do tempo de armazenamento

Como se pode verificar através do Quadro XXI e da Fig.32, ocorreu uma diminuição na profundidade de penetração ao longo do tempo, sendo o creme armazenado a 40°C o que apresenta valores mais baixos, 4 meses após a preparação.

4.7. COMPORTAMENTO REOLÓGICO

A reologia é o ramo da física que estuda a deformação e o fluxo da matéria (69).

A viscosidade traduz a resistência ao escoamento. Ao recíproco da viscosidade dá-se o nome de fluidez.

Muitas preparações farmacêuticas são dispersões de sólidos ou de líquidos em veículos líquidos ou semi-sólidos e na sua eficácia interferem, muitas vezes, as suas propriedades de fluxo. A maior parte dessas preparações apresenta um comportamento do tipo não Newtoniano.

Comportamentos Newtonianos e não Newtonianos

Os líquidos simples (líquidos puros constituídos por pequenas moléculas e soluções em que o soluto e o solvente são moléculas pequenas) apresentam uma viscosidade que depende apenas da composição dos mesmos, da temperatura e da pressão, e aumenta com o aumento da pressão e com a diminuição da temperatura. Os líquidos simples comportam-se de acordo com a lei de Newton, segundo a qual existe proporcionalidade directa entre a tensão cortante τ (*shear stress, shearing stress ou stress)* expressa em Pascal (Pa) e a velocidade de corte $\dot{\gamma}$ (*shear rate ou rate of shear*) expressa em s^{-1}.

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \quad \text{(Eq. 10)}$$

η - viscosidade expressa em Pa.s ou Poise

Graficamente, o escoamento dos líquidos Newtonianos corresponde a uma linha recta que passa pela origem. A viscosidade corresponde ao declive da recta ou à tangente do ângulo que a mesma recta faz com o eixo das abcissas. Na Fig.33 estão representados os perfis de escoamento característicos dos diferentes tipos de comportamento, apresentados por sistemas homogéneos e heterogéneos, líquidos ou semi-sólidos.

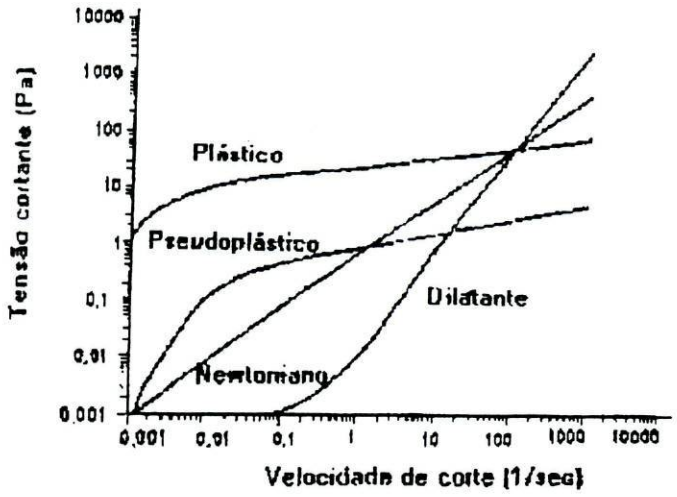


Fig.33-Curvas de escoamento.

Pseudoplástico - Neste tipo de comportamento a viscosidade não é constante (em condições de temperatura e composição constantes), mas diminui com o aumento da pressão (emulsões, dispersões, suspensões).

Plástico - Certos materiais semi-sólidos não fluem quando se lhes imprime pouca pressão, podendo nestas circunstâncias apresentar elasticidade. Quando uma preparação só apresenta escoamento a partir de uma tensão mínima (stress), denominada valor de cedência, diz-se que tem comportamento plástico (certos cremes).

Dilatante - Diz-se que um sistema tem comportamento dilatante quando a sua viscosidade aumenta com o aumento da pressão. Este tipo de comportamento verifica-se no caso das dispersões concentradas de partículas que não têm tendência para agregarem (pastas e composições com elevada concentração em pigmentos).

Quando a consistência dos materias depende da duração da pressão exercida, bem como da velocidade de corte, diz-se que eles apresentam tixotropia. A tixotropia pode ser representada quantitativamente pela

denominada área de histerese que corresponde à área delimitada pelas curvas ascendente e descendente do reograma (70).

4.7.1. Viscosidade

Os cremes apresentam valores de viscosidade variáveis. Por este motivo, deve ser estabelecido um certo número de condições quando se avalia a viscosidade, o que implica que os valores obtidos correspondam a uma viscosidade aparente. Dado que qualquer alteração nas condições de medição pode conduzir a alterações nos valores da viscosidade aparente, as dimensões do instrumento de medição e as condições de ensaio devem ser cumpridas e especificadas por quem procede à sua determinação.

Os viscosímetros rotativos são instrumentos muito utilizados para se efectuarem determinações da viscosidade aparente. Estes aparelhos consistem numa agulha imersa no produto em análise e medem a resistência ao movimento da parte giratória.

Os viscosímetros dispõem de agulhas de diversos tamanhos, possibilitando assim a avaliação de produtos com viscosidades distintas e permitindo imprimir diferentes velocidades de rotação ao componente móvel.

Para a determinação da viscosidade aparente, a temperatura da substância a ser medida deve ser convenientemente controlada, pois pequenas alterações de temperatura podem conduzir a profundas alterações na viscosidade (71).

Procedeu-se à avaliação da viscosidade aparente como se descreve a seguir.

Aparelhagem:

Viscosímetro rotativo Brookfield modelo RV (Fig.34)

Agulha Nº 6*

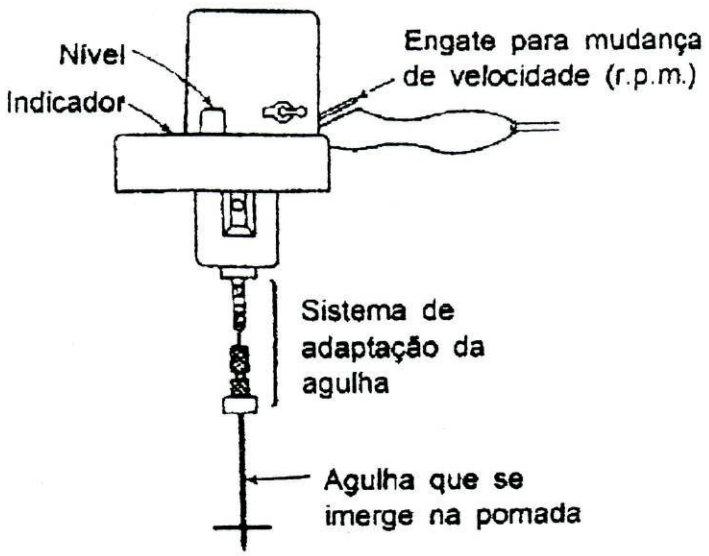


Fig. 34 - Viscosímetro rotativo Brookfield, RV.

(*) A escolha da agulha n°6 para a realização dos ensaios deveu-se ao facto de ser esta a única que permitia obter leituras em toda a gama de velocidades de corte.

Procedimento:

Mergulhar a agulha n° 6 na amostra de creme (à temperatura de 20°C) e imprimir à mesma diferentes velocidades de rotação, segundo a sequência: 10-20-50-100-50-20-10 rpm. Submeter o creme a cada uma das velocidades de rotação durante 1 minuto. Determinar a viscosidade correspondente a cada uma das velocidades de rotação a que foi sujeita a agulha mergulhada na amostra. Entre cada determinação o sistema deve ser mantido em repouso durante 1 minuto.

Efectuar a determinação da viscosidade aparente da formulação F_3 armazenada a três temperaturas diferentes (5°, 25° e 40°C). Calcular o valor da tensão cortante (F ou τ), o qual corresponde ao produto da viscosidade aparente (η) pela velocidade de corte (G ou $\dot{\gamma}$): $F = \eta \times G$

Resultados:

No Quadro XXIII estão representados os resultados dos valores da tensão cortante relativos às determinações da viscosidade aparente do creme F_3 armazenado a diferentes temperaturas.

Quadro XXIII - Valores de F correspondentes aos valores de G para as temperaturas de 5°, 25° e 40°C.

G(rpm)	$Fx10^3$ (dine cm^{-2})									
		5°C			25°C			40°C		
	1dia	1 M*	2 M	3 M	1 M	2 M	3 M	1 M	2 M	3 M
10	120	216	270	275	242	303	220	353	416	320
20	170	318	345	320	298	330	300	415	500	450
50	265	416	450	410	402	375	370	495	625	570
100	365	504	515	470	430	420	440	505	690	602
50	230	346	360	315	313	310	300	393	515	440
20	130	217	240	215	210	205	190	298	380	336
10	75	134	155	145	132	150	130	258	300	275

(*)M - Mês

Nas Fig. 35, 36 e 37 estão representados os reogramas do creme F_3 armazenado a diferentes temperaturas em função do tempo.

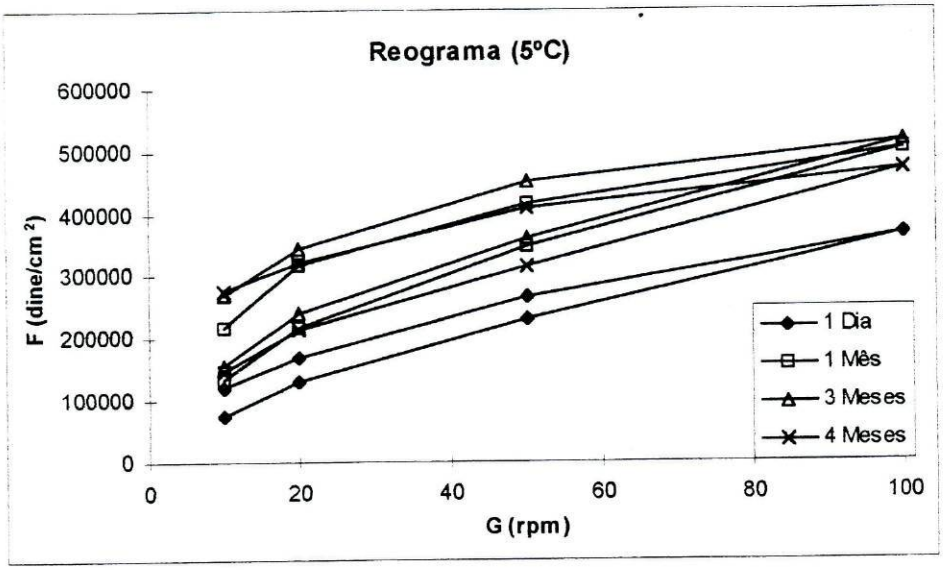


Fig. 35 - Reograma do creme F_3 armazenado a 5°C.

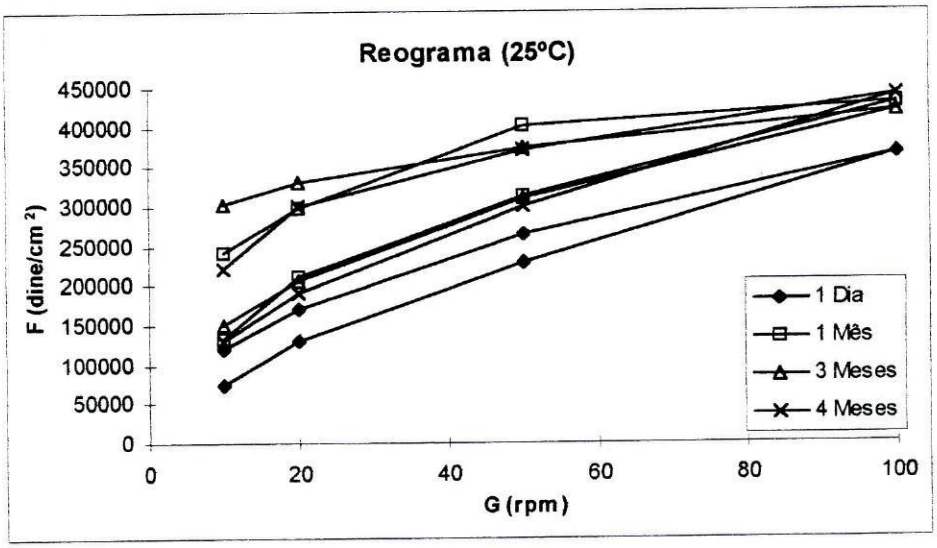


Fig. 36 - Reograma do creme F_3 armazenado a 25°C.

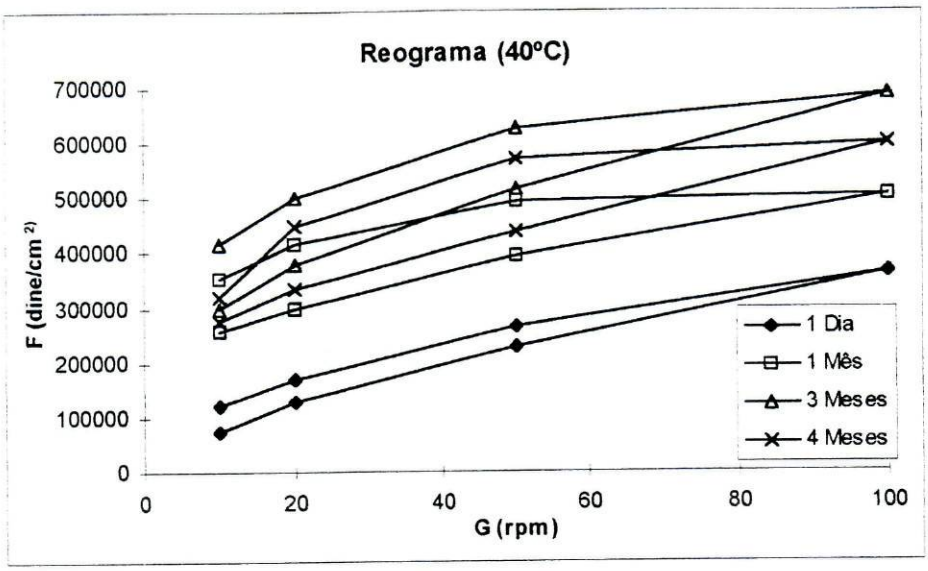
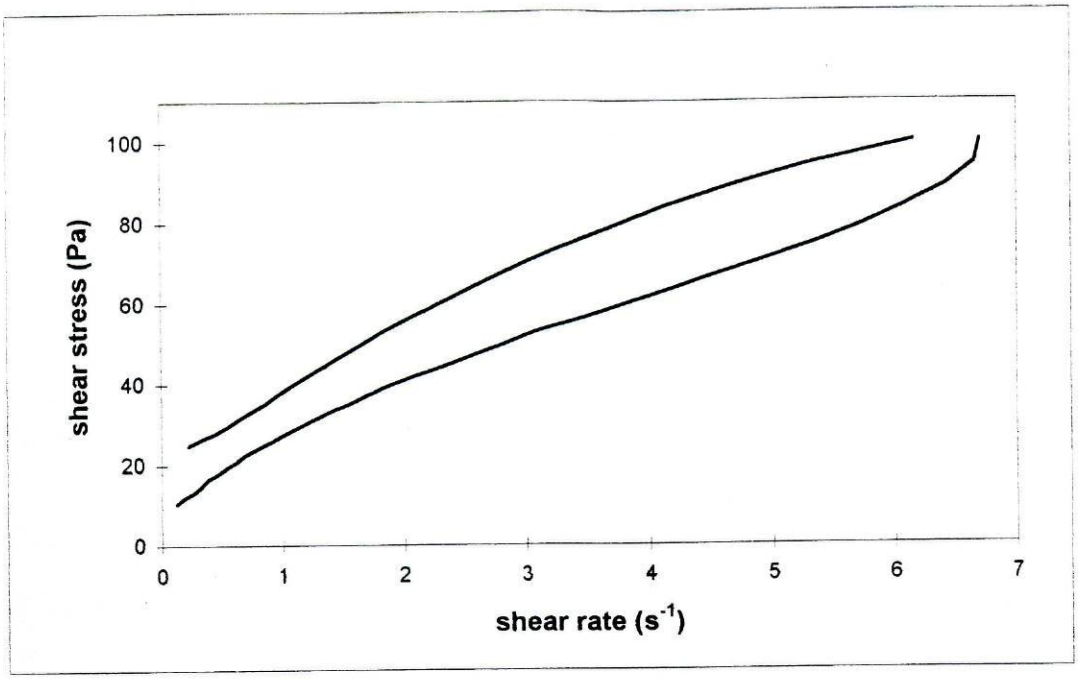


Fig. 37 - Reograma do creme F_3 armazenado a 40°C.

A análise dos reogramas (Fig. 35, 36 e 37) obtidos permite concluir que o comportamento apresentado pelo creme de naproxeno é do tipo plástico com tixotropia, traduzido, respectivamente, pelo valor de cedência e pela área relativa às curvas ascendente e descendente.

É característico dos sistemas com este tipo de comportamento apresentarem partículas com tendência para aglomerarem, formando um retículo tridimensional com valor de cedência, devido às pontes contínuas interpartículas que se criam no seio da preparação.

No gráfico da Fig. 38 está representado o reograma do creme F_3, 4 meses após a sua armazenagem a 25°C, obtido pela realização de ensaios de escoamento utilizando um reómetro rotativo CARRIMED CSL 50 (Fig.39).



Fig,38 - Reograma do creme F_3, 4 meses após o seu armazenamento a 25°C

No caso concreto da formulação F_3 e tratando-se de um creme O/A, o valor de cedência bem como o grau de tixotropia evidenciados, poderão justificar-se pela percentagem de substância activa adicionada à preparação base e que foi de 10% de naproxeno em pó.

Estas duas características - valor de cedência e tixotropia - constituem duas propriedades importantes que as preparações para aplicação na pele devem apresentar, pois traduzem uma maior facilidade no que diz respeito ao acondicionamento, bem como à sua utilização, uma vez que os sistemas tixotrópicos se tornam mais fluidos e mais fáceis de espalhar quando submetidos a uma pressão externa.

Relativamente ao comportamento do creme F_3 em função da temperatura e do tempo de armazenagem, há a registar a boa estabilidade da preparação face a estes parâmetros, apesar do aumento de viscosidade

verificado para a temperatura de 40°C. Visto tratar-se de um creme O/A será de recomendar a armazenagem em locais frescos e aumentar, eventualmente, a concentração do humectante utilizado.

A sobreposição dos reogramas a partir de 1 mês e a diferença destes relativamente ao comportamento reológico após a preparação (1 dia) são indicativos de que o creme sofreu um amadurecimento até atingir a estabilidade.

4.7.2. Propriedades dinâmicas

Os sistemas com características reológicas intermédias entre as apresentadas por um líquido ideal e um sólido elástico apresentam um comportamento viscoelástico (63,69,70).

A viscoelasticidade de um sistema pode ser analisada recorrendo-se quer a ensaios oscilatórios quer a ensaios de fluência ou "creep--compliance" que completam a caracterização das propriedades reológicas.

A análise da viscoelasticidade baseia-se na resposta dos sistemas aos movimentos oscilatórios ou às tensões de corte constantes de pequena intensidade que sobre eles são exercidas.

Para um líquido ideal a tensão e a deformação estão desfazadas 90° e toda a energia é dissipada sob a forma de calor (*Storage modulus* G'=0). No caso de um sólido elástico ideal, a tensão e a deformação estão em fase e toda a energia é armazenada (*Loss modulus* G''=0). G'' corresponde ao *modulus* de perda e G' corresponde ao *modulus* de armazenagem.

Num sistema viscoelástico, as curvas de tensão e de deformação formam um ângulo entre 0° e 90°. Quanto mais próximo de zero for o ângulo, mais elástico e menos viscoso será o sistema. Portanto, um determinado material comportar-se-á como um sólido se G'>>>G'' e comportar-se-á como líquido se a energia for em grande parte dissipada, isto é, se G''>>>G'.

Os ensaios de "creep-compliance" permitem traduzir a resposta dos sistemas quando se exerce sobre eles uma tensão cortante constante de pequena intensidade durante um determinado tempo. Quando se realiza este tipo de ensaios verifica-se um aumento linear da deformação com o tempo no caso dos líquidos viscoelásticos, enquanto que para os sólidos viscoelásticos a deformação é praticamente nula.

Aparelhagem:

Reómetro rotativo cone/prato CARRIMED CSL 50 (Fig.39)

Computador

Sistema de tratamento de dados

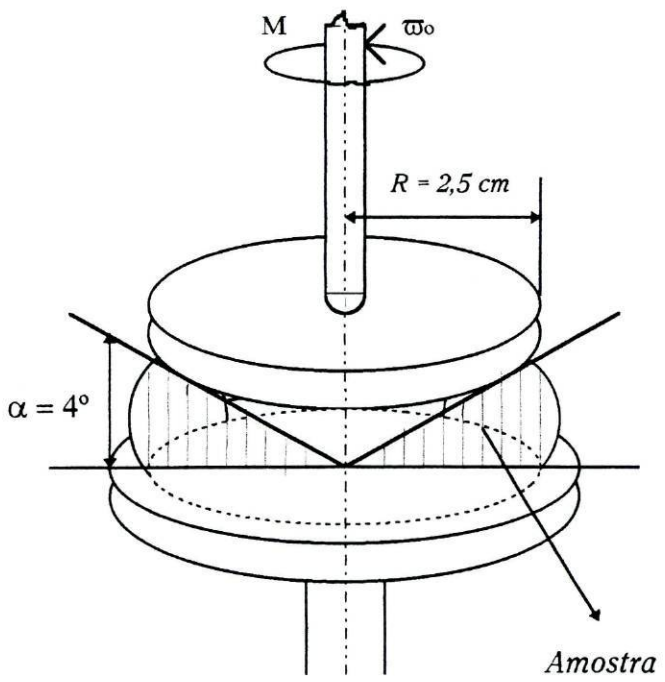


Fig.39 - Cone/prato do CARRIMED CSL 50.

Resultados:

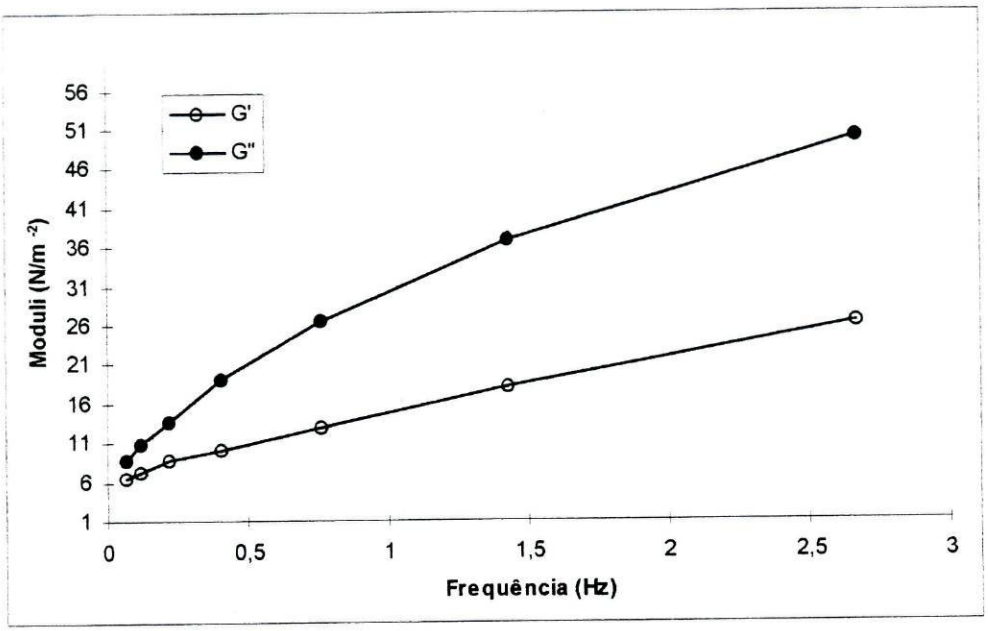


Fig. 40 - Espectro mecânico obtido com os *moduli* G' e G'', 4 meses após a preparação do creme F_3, armazenado a 25°C.

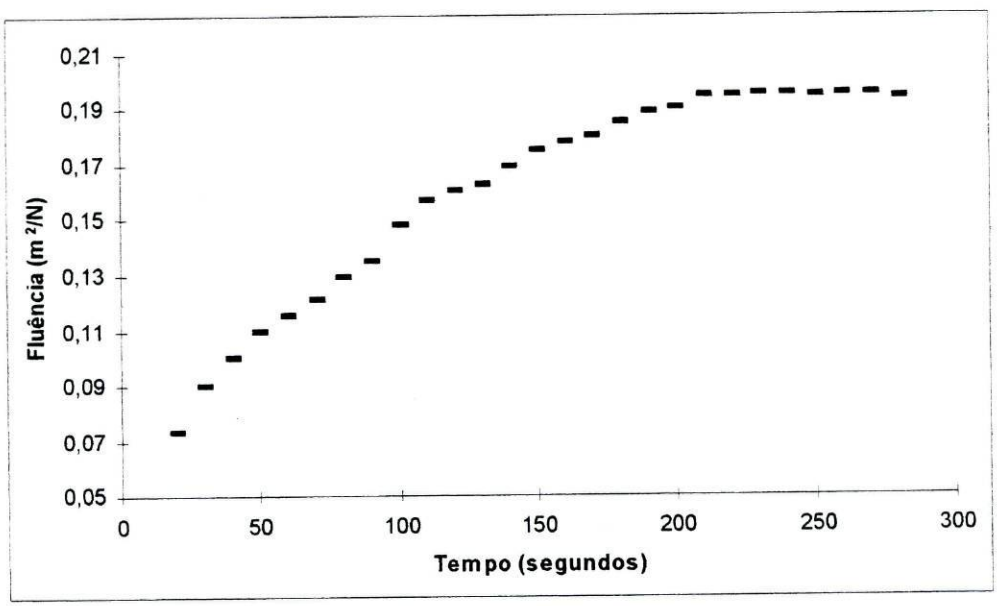


Fig. 41 - Curva de fluência em função do tempo, do creme F_3 armazenado a 25°C, 4 meses após a preparação.

O espectro mecânico obtido com os *moduli* G' e G'' (Fig. 40) indica que o *modulus* G'' é superior ao G' pelo que a preparação estudada apresenta mais propriedades do sistema viscoso do que do sistema elástico.

Esta característica pode ser confirmada pelo ensaio de fluência ou *creep-compliance* (Fig. 41), na qual é bem notória a crescente deformação em função do tempo, não se registando qualquer reconversão após interrupção da tensão aplicada, ocorrida a partir dos 200 segundos.

4.8. IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO DO NAPROXENO NO PRODUTO ACABADO

A identificação e o doseamento do naproxeno no produto acabado foram realizados por cromatografia líquida de alta pressão.

Aparelhagem e reagentes:

Cromatógrafo líquido de alta pressão Varian

Detector U.V. Varian 9050

Controlador de solventes Varian 9012

Coluna - C_{18}, 25 cmx4,6 mm, 10 μm

Agitador magnético HEIDOLPH MR 2002

Metanol Lichrosolv (Merck)

Acetronitrilo Lichrosolv (Merck)

Naproxeno padrão (Aldrich)

Procedimento:

Pesar, rigorosamente, 200mg de creme num goblet de 400ml, adicionar 100ml da mistura de 25 partes de água destilada e 75 partes de metanol. Agitar durante cerca de 15 minutos e filtrar por papel de filtro.

Tomar 0,1ml de filtrado para balão aferido de 10ml e completar o volume com água destilada.

Proceder ao doseamento, por HPLC, do naproxeno no produto acabado utilizando as seguintes condições cromatográficas:

Coluna C18, 25cm x 4,6mm, 10µm

Fase móvel - Água:Acetonitrilo (40:60, v/v)

Fluxo - 1,0 ml/min.

Eluição isocrática com a duração de 6 minutos

Detector espectrofotométrico UV/VIS - 331 nm

Volume de injecção - 200 µl

Acerto do zero - no tempo zero

Atenuação - 0,100AU

Preparar uma solução pesando 50mg de naproxeno padrão e dissolvendo na mistura metanol/água (75:25), completando o volume de 50ml com a mesma mistura de solventes. Preparar soluções padrão diluídas com concentrações de 1,0;3,0; 5,0 e 8,0 µg/ml e injectar no cromatógrafo nas condições cromatográficas descritas anteriormente.

Resultados:

A curva de regressão demonstrou a existência de uma relação linear entre a absorvência expressa em área de pico e a concentração de naproxeno, para a gama de concentrações ensaiadas entre 1,0 e 8,0 µg/ml (Fig.42).

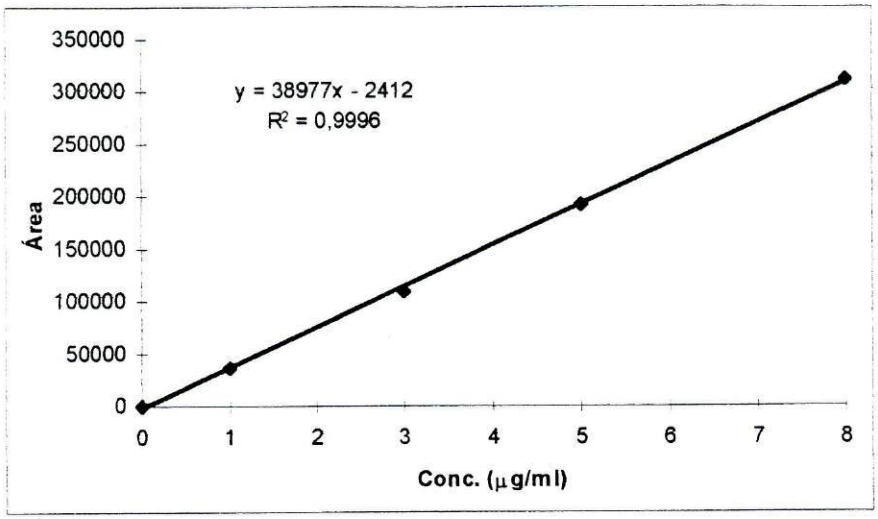


Fig.42 - Correlação entre a concentração de naproxeno e as áreas de pico (R^2=0,9996).

A amostra apresentava o mesmo tempo médio de retenção (4.5 minutos) dos padrões de naproxeno injectados nas mesmas condições cromatográficas.

Após a preparação, o creme apresentava um teor de 10% de princípio activo (naproxeno).

O teor de princípio activo do creme conservado a 5°C, 25°C e 40°C, manteve-se sem alteração (a 10%) ao longo dos três meses de ensaio.

4.9. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O Quadro XXIV apresenta, em resumo, os resultados dos ensaios de verificação do creme F_3 após a preparação e passados três meses.

Quadro XXIV - Resumo dos resultados de alguns dos ensaios de verificação do creme F_3.

Tª	Verificação	Após a preparação	3 meses após a preparação
5°C	Aspecto	Homogéneo	sem alteração
	pH	6,1	6,2
	Teor de água	52,1	52,3%
	E. Microbiológico	Conforme*	sem alteração
	Teor em p.activo	10%	sem alteração
25°C	Aspecto	Homogéneo	sem alteração
	pH	6,1	6,2
	Teor de água	52,1	52,4%
	E. Microbiológico	Conforme*	sem alteração
	Teor em p.activo	10%	sem alteração
40°C	Aspecto	Homogéneo	sem alteração
	pH	6,1	6,2
	Teor de água	52,1	53,2%
	E. Microbiológico	Conforme*	sem alteração
	Teor em p.activo	10%	sem alteração

(*)Ausência de germes aeróbios viáveis totais, Enterobactérias,*S. aureus* e *P. aeruginosa.*

No que se refere ao aspecto o creme F_3 não apresentou alteração, embora a análise microscópica tenha revelado uma certa coalescência das gotículas de gordura no caso da amostra armazenada a 40°C.

O pH da preparação F_3 armazenada a diferentes temperaturas manteve-se praticamente constante ao longo de três meses.

A ocorrência de variações pouco significativas no teor de água do creme conservado a diferentes temperaturas sugere que o agente humectante (glicerina) demonstrou ser eficaz.

A ausência de desenvolvimento de qualquer tipo de microrganismo é um indicativo da eficácia do conservante utilizado (*Nipagin*) e do sistema de acondicionamento e revela uma boa estabilidade do creme 3 meses após a sua preparação.

Relativamente ao teor de princípio activo não se verificaram alterações ao longo do tempo, facto que demonstra a boa estabilidade do produto submetido a diferentes temperaturas.

As preparações semi-sólidas são reologicamente complexas, por isso torna-se por vezes difícil avaliar as suas características de escoamento e as razões pelas quais as mesmas sofrem alterações ao longo do tempo. O ligeiro aumento da consistência do creme F_3 não parece ser devido à diminuição do teor de água, uma vez que as determinações deste parâmetro não revelaram tal ocorrência. O aumento da consistência será devido, provavelmente, ao alinhamento e aproximação das partículas, do que resultou uma diminuição da quantidade de líquido da fase externa existente entre elas.

O aumento mais pronunciado da consistência da amostra conservada a 40°C pode ser devido à coalescência de algumas gotículas da fase interna, evidenciada através do exame microscópico das várias amostras.

O creme F_3 manteve estáveis as suas propriedades nos três meses após a sua preparação.

CAPÍTULO V

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO "IN VIVO" DO NAPROXENO

5.1. INTRODUÇÃO

O principal objectivo da realização de estudos de absorção percutânea está relacionado com a necessidade de avaliar o perfil de absorção do fármaco ao longo do tempo, ou seja, a sua biodisponibilidade. O termo biodisponibilidade pode ser definido como a extensão e a velocidade de absorção de um composto activo a partir de uma determinada preparação.

A biodisponibilidade dos fármacos depende, pelo menos em parte, da velocidade de libertação dos mesmos a partir da forma farmacêutica. Diferenças nas velocidades de libertação entre fármacos equivalentes podem fazer prever a ocorrência de diferenças na absorção percutânea e portanto diferenças de comportamento terapêutico (45).

Embora se reconheça que os ensaios "in vivo" com animais apresentam algumas limitações, nomeadamente no que se refere à diferente permeabilidade da pele dos animais de experiência relativamente à pele humana, os investigadores recorrem muito frequentemente a este tipo de ensaios, pois têm permitido explicar, com segurança, os fenómenos da absorção percutânea no ser humano.

A determinação dos níveis sanguíneos dos fármacos aplicados na pele pode ser difícil devido à conjugação de dois factores: 1) o baixo grau de absorção e 2) a baixa velocidade de absorção.

Recentemente tem sido demonstrado que podem ser atingidos níveis elevados de fármaco nos músculos, nas articulações e nos fluidos sinoviais após a aplicação cutânea de vários AINE em animais.

Os estudos farmacocinéticos dos fármacos administrados por via cutânea requerem métodos analíticos altamente sensíveis devido ao facto de

a quantidade de fármaco que atinge a circulação sanguínea através da pele ser baixa.

Os métodos instrumentais de análise com separação cromatográfica têm a vantagem de permitir eliminar interferências de quantidades vestigiais de amostras biológicas (26). Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos vários métodos de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) para a determinação do naproxeno, dos seus metabolitos ou dos seus enantiómeros nos fluidos corporais (soro/plasma, fluido sinovial e urina). Os métodos descritos apresentam vários tipos de detecção tais como a espectrofotométrica (26,73,74,75), a fluorescência (73-79) ou a detecção electroquímica (80). Utilizando as propriedades fluorescentes do naproxeno, têm sido desenvolvidos métodos fluorimétricos altamente sensíveis. Tem sido demonstrado que a detecção fluorimétrica apresenta maior sensibilidade que o detector U.V. ou que o diode-array. No entanto, a espectrofluorimetria, geralmente, requer processos morosos de extracção, preparação e purificação das amostras.

A cromatografia gasosa também tem sido utilizada (81,82), mas esta técnica requer um processo de derivatização prévio para esterificação da função carboxílica do naproxeno. Recentemente têm sido descritos métodos fosforimétricos para a determinação rápida de naproxeno no soro (83).

A eficácia dos diversos métodos de doseamento do naproxeno em fluidos biológicos depende de factores tais como a eficácia do processo extractivo, a qualidade cromatográfica, a simplicidade do método, entre outros.

Nos métodos de doseamento por HPLC a composição e o pH da fase móvel afectam de forma significativa o cromatograma do naproxeno. O naproxeno é um ácido fraco (pK_a=4,2), por este motivo, apresenta um tempo de retenção maior no caso de a fase móvel apresentar um pH muito baixo (factor de capacidade elevado) comparativamente com o que acontece no caso de se usar uma fase móvel com pH mais elevado. Este facto pode

ser atribuido à maior absortividade da forma ácida do naproxeno relativamente à fase estacionária apolar da coluna (19).

5.2. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE DOSEAMENTO DO NAPROXENO NO SORO

Procedeu-se ao estudo de um método de extracção do naproxeno do soro recorrendo-se a vários solventes orgânicos como o metanol, o diclorometano e o acetonitrilo, tendo sido este último o que apresentou resultados mais satisfatórios.

5.2.1. Recolha de sangue e separação do soro

Recolheram-se amostras de sangue em ratos fêmea da espécie Wistar-Lewis.

Aparelhagem:

Microcentrífuga Hawksley

Material e Reagentes:

Câmara de vidro

Tubos de hematócrito não heparinizados

Bisturi

Seringas de 1,0 ml

Tubos *Eppendorf*

Éter etílico p.a (Merck)

Procedimento:

Anestesiar os animais colocando-os numa câmara saturada com éter etílico. Com o auxílio de um bisturi fazer um pequeno corte numa das veias da cauda e recolher o sangue em tubos de hematócrito não heparinizados.

Vedar os tubos com plasticina numa das extremidades e colocá-los na microcentrífuga. Depois de se submeterem os tubos a uma centrifugação de 2000 rpm durante 15 minutos, remover o soro sobrenadante para tubos *Eppendorf*, com o auxílio de uma seringa de 1,0 ml.

5.2.2. Extracção e doseamento do naproxeno no soro

Aparelhagem:

Cromatógrafo líquido Varian

Detector U.V. Varian 9050

Sistema controlador de eluentes Varian 9012

Vórtex Heidolph Reax 2000

Centrífuga Ecco, type EII/11

Material e reagentes:

Tubos de centrífuga de 10 ml

Pipetador automático

Acetonitrilo Lichrosolv (Merck)

Padrão de naproxeno (Aldrich)

Procedimento:

Pipetar para tubos de centrífuga de 10ml, 200µl de soro e 200µl de solução padrão de naproxeno em acetonitrilo nas concentrações de 5, 10, 12, 15 e 20µg/ml (Solução C da Fig. 43). Agitar em vórtex durante 10 segundos, adicionar 500µl de acetonitrilo e agitar novamente em vórtex durante 30 segundos. Vedar os tubos e submetê-los à centrifugação de 2000 rpm, durante 20 minutos. Filtrar o sobrenadante utilizando filtros de 0,2 µm antes de proceder à sua injecção no cromatógrafo.

Fazer paralelamente um branco (Solução B da Fig.43) submetendo ao processo referido anteriormente 200µl de soro isento de naproxeno.

Condições cromatográficas:

Coluna - C_{18}, 25 cm x 4,6 mm, 10 μm

Eluente - Acetonitrilo:Água (60:40, v/v)

Detecção espectrofotométrica - 331 nm

Velocidade de fluxo - 1,0 ml/min.

Volume de injecção - 50 μl

Atenuação - 0,050 AU

Acerto do zero - no tempo zero

Eluição isocrática com a duração de 6 minutos.

Resultados:

Estabeleceu-se uma correlação entre as áreas de pico do naproxeno recuperado após o processo extractivo e a concentração do naproxeno adicionado ao soro (84).

A resposta foi linear, para a gama de concentrações entre 5 e 20μg/ml, como mostra a Fig.44.

No Quadro XXV estão representados os valores de recuperação relativos às diferentes concentrações ensaiadas.

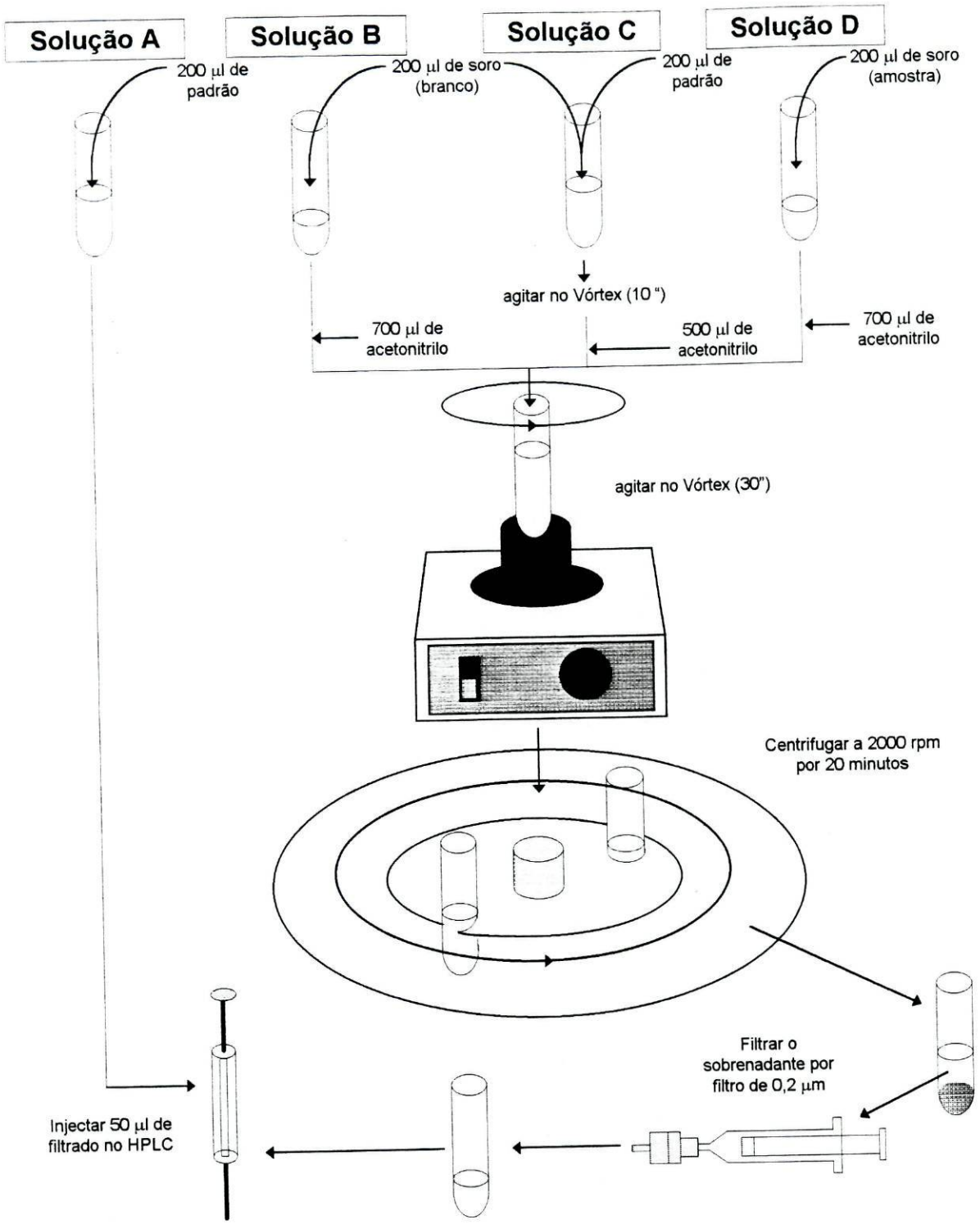


Fig. 43 - Solução A-solução padrão, Solução B-soro (branco), Solução C-soro (branco)+padrão, Solução D-soro (amostra).

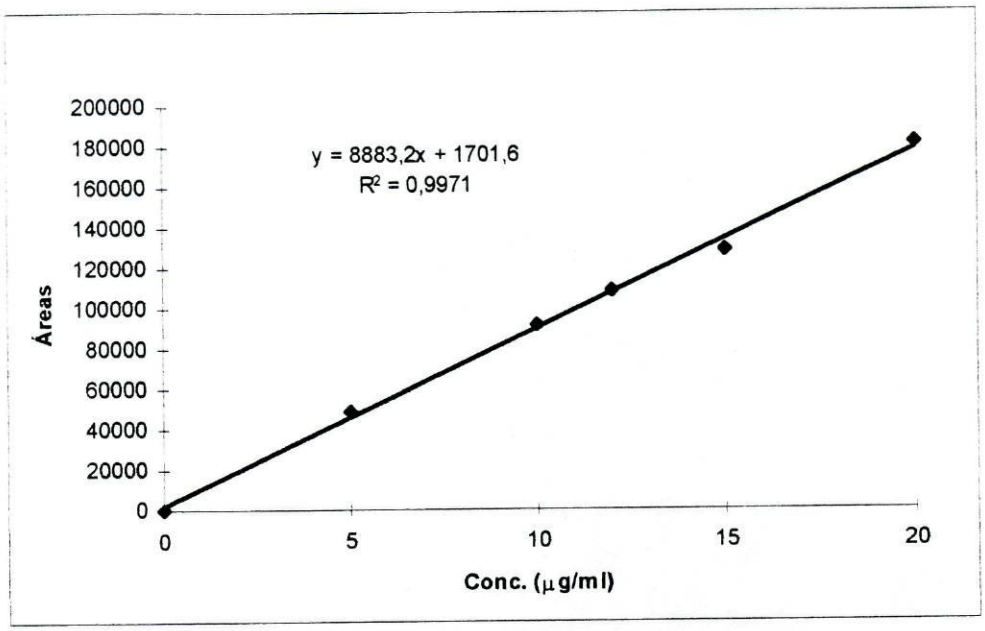


Fig.44 - Correlação entre as áreas correspondentes ao naproxeno recuperado e a concentração do naproxeno adicionado ao soro.

Quadro XXV - Valores da recuperação do naproxeno relativos às várias concentrações ensaiadas.

Concentração (µg/ml)	Recuperação (%)
5	101
10	107
12	103
15	95
20	90
Recuperação (média)	99%
Desvio padrão	6,8
Desvio padrão relativo	6,9%

5.3. ABSORÇÃO "IN VIVO" DO NAPROXENO VEICULADO NO CREME F_3 E NO GELE COMERCIAL

Realizaram-se ensaios de absorção "in vivo" do naproxeno veiculado no creme F_3. Os ensaios foram realizados em ratos fêmea da espécie Wistar--Lewis com peso compreendido entre os 180 e os 250 gramas.

Aparelhagem:

Cromatógrafo líquido Varian com detector UV/VIS

Vórtex Heidolph Reax 2000

Centrífuga Ecco, type EII/11

Material e reagentes:

Tubos de centrífuga de 10 ml

Pipetador automático

Filtros de 0,2 μm

Acetonitrilo Lichrosolv (Merck)

Éter etílico (Merck)

Creme depilatório à base de tioglicolato de cálcio

Procedimento:

Anestesiar os animais com éter etílico e depilar a zona abdominal com um creme depilatório não irritante à base de tioglicolato de cálcio. No dia seguinte, aplicar duas vezes sobre a zona depilada (com $12cm^2$ de área) uma quantidade de creme F_3 correspondente a aproximadamente 25mg de naproxeno, espalhando até completa absorção.

Vinte e quatro horas após a primeira aplicação do creme, proceder como foi descrito em 5.2.1.

Pipetar 200 μl de soro (Solução D da Fig.43), adicionar 700 μl de acetonitrilo, agitar em vórtex durante 30 segundos e centrifugar durante 20

minutos a 2000 rpm. Filtrar o sobrenadante através de filtros de 0,2μm e injectar 50μl de filtrado no cromatógrafo, utilizando as condições cromatográficas descritas em 5.2.2.

Realizaram-se ensaios idênticos ao anterior, aplicando *Naprosyn gel* em substituição do creme F_3.

Para o cálculo da concentração sérica de naproxeno utilizou-se a equação de regressão: $C=1,13x10^{-4}A - 0,192$, em que A é a área do pico cromatográfico e C é a concentração de naproxeno no soro 24 horas após a primeira aplicação cutânea de uma quantidade de creme F_3 correspondente a 25mg de princípio activo numa área de $12cm^2$. Utilizou-se a mesma equação para o cálculo da concentração sérica de naproxeno após a aplicação cutânea, em idênticas condições, de *Naprosyn gel*.

Resultados:

Os resultados dos cálculos dos ensaios realizados com o creme F_3 e com o gele encontram-se representados, respectivamente nos Quadros XXVI e XXVII.

Quadro XXVI - Concentrações séricas de naproxeno 24 horas após a primeira aplicação cutânea do creme F_3.

	Área (HPLC)	Conc. (µg/ml)
Rato 1	39948	4,2
Rato 2	41548	4,5
Rato 3	20978	2,2
Rato 4	75049	8,2
Rato 5	22667	2,4
Conc. Média (µg/ml)		4,3
Desvio padrão		2,4
Desvio padrão relativo		55,0%

Quadro XXVII- Concentrações séricas de naproxeno 24 horas após a primeira aplicação cutânea do *Naprosyn gel.*

	Área (HPLC)	Conc. (µg/ml)
Rato 1	28044	3,0
Rato 2	28941	3,1
Rato 3	34695	3,7
Rato 4	34534	3,7
Conc. Média (µg/ml)		3,4
Desvio padrão		0,4
Desvio padrão relativo		11,8%

Com base nos valores de variância dos resultados dos ensaios de absorção "in vivo", realizou-se o teste t para se averiguar se as diferenças entre as médias obtidas eram ou não significativas. Na tabela t de *student*, para o nível de significância de 5% e com 7 graus de liberdade, o valor de t é de 2,36. Como o valor de t calculado (0,73) é inferior ao valor da tabela (2,36), pode concluir-se que não existem diferenças significativas entre as

médias das concentrações séricas de naproxeno após a aplicação cutânea do creme F_3 e do *Naprosyn gel.*

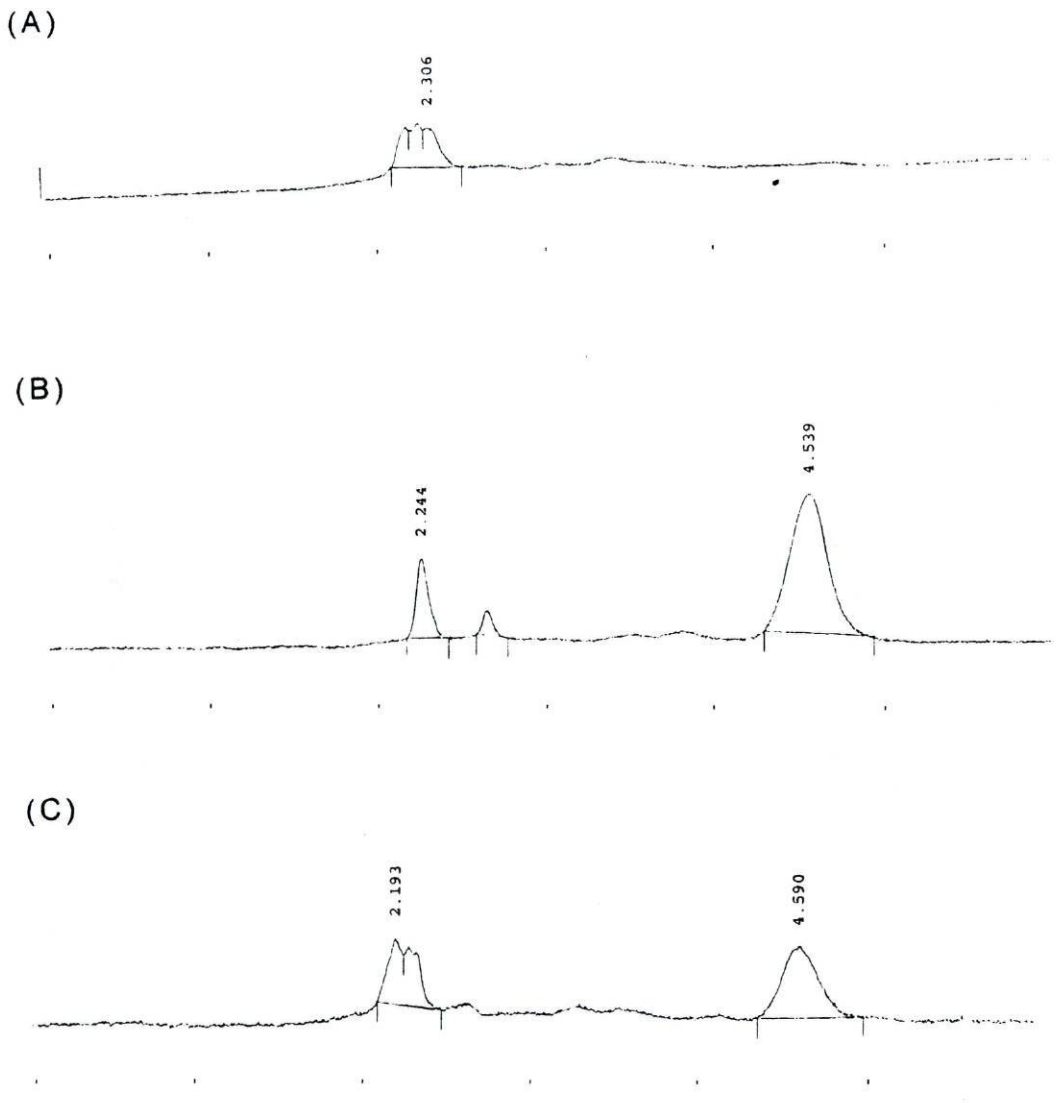


Fig.45 - Cromatogramas: (A) soro isento de medicamento, (B) soro com 10μg/ml de padrão de naproxeno e (C) soro de rato, 24h após a primeira aplicação cutânea do creme F_3 contendo naproxeno.

5.4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos ensaios biológicos são, de um modo geral, muito variáveis e por isso quando se procede à análise dos mesmos, deve ter-se em atenção, para cada caso, as condições experimentais utilizadas.

A precipitação das proteínas do soro com acetonitrilo constitui um método simples e rápido que requer um pequeno volume de amostra. A obtenção de um elevado grau de recuperação (valor médio de 99%) significa que praticamente não ocorrem perdas no decurso do processo extractivo.

O doseamento do naproxeno sérico por HPLC é um método simples e com elevada sensibilidade. A precisão do método descrito, avaliada a partir da curva de calibração e expressa em desvio padrão relativo, é de 6,9%. O método possui uma sensibilidade adequada ao fim a que se destina e permite detectar concentrações até 1μg/ml.

A aplicação cutânea de uma quantidade elevada de medicamento tem duas justificações: 1) a maior facilidade no procedimento analítico e 2) a garantia de conseguir detectar quantidades mensuráveis de fármaco no soro.

Os ensaios de penetração "in vivo" foram realizados sem oclusão para que as condições experimentais se aproximassem o mais possível da situação real.

A análise estatística dos ensaios "in vivo" permitiu concluir que não existem diferenças significativas nos valores de absorção da fórmula em estudo relativamente ao gele comercial, apesar da primeira apresentar um valor médio superior. No entanto, verificou-se uma maior variância nos resultados dos ensaios realizados com o creme. Tal variância poderá dever-se, entre outros factores, ao facto de o creme, pelas suas características, implicar um processo de aplicação menos homogéneo do que o gele.

A realização de cortes histológicos nos animais aos quais foram aplicadas as preparações poderia revelar a eventual ocorrência de um efeito

reservatório, o que possibilitaria chegar a conclusões complementares acerca dos resultados obtidos.

CAPÍTULO VI

CAPÍTULO VI

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em todo o mundo existem milhares de pessoas que padecem de reumatismo. Por este motivo, o estudo de fármacos antirreumatismais e a elaboração de preparações farmacêuticas que os veiculem de uma forma cada vez mais eficaz e segura assumem grande importância no âmbito da actual investigação clínica.

O objectivo da presente dissertação consistiu em desenvolver uma formulação em creme contendo um anti-inflamatório não esteróide pertencente ao grupo dos derivados do ácido propiónico - o naproxeno.

A realização de estudos de pré-formulação forneceu dados importantes acerca das características físico-químicas do naproxeno. Alguns dados relativos ao fármaco em estudo foram obtidos através de ensaios descritos na Farmacopeia Portuguesa V e outros foram obtidos através de ensaios realizados de acordo com informações adquiridas através de pesquisa bibliográfica.

Após a realização dos estudos de pré-formulação passou-se à fase seguinte denominada formulação. Tendo em consideração as características do princípio activo e as de vários excipientes, foi preparada uma diadermina na qual foi posteriormente incorporado 10% de naproxeno (m/m). O creme preparado foi depois submetido a vários ensaios que permitiram averiguar se este apresentava características que permitissem a cedência do fármaco num período de tempo conveniente. Os resultados dos ensaios demonstraram que o naproxeno se conseguia libertar da formulação e passar facilmente para uma fase receptora (solução tampão de fosfatos de pH 7,4). No entanto, através da realização de ensaios de penetração "in vitro" com pele excisada de rato, verificou-se que a velocidade de penetração do naproxeno através da pele era lenta. Procedeu-se, então, ao

estudo da influência de alguns promotores (ácido oleico, propilenoglicol, T80, LsS e 2-pirrolidona) na capacidade de penetração do fármaco através da pele. Este estudo demonstrou ser o LsS o promotor mais adequado para o fim terapêutico pretendido - penetração diadérmica do fármaco com absorção e distribuição pelos tecidos adjacentes ao local de aplicação do creme.

Efectuaram-se, também, ensaios de penetração "in vitro" com um gele comercializado em Portugal contendo naproxeno e verificou-se que este apresentava , ao fim de 6 horas, um nível de penetração inferior ao da maior parte das formulações em creme.

Os ensaios de controlo de qualidade da fórmula escolhida demonstraram que esta apresentava características que estavam em conformidade com os parâmetros de qualidade a que os cremes devem obedecer. A realização de ensaios de estabilidade, ao longo de vários meses, demonstrou que a fórmula em estudo (conservada a diferentes temperaturas) não sofreu alteração significativa relativamente às características apresentadas após a preparação.

A finalizar realizaram-se ensaios "in vivo" (utilizando a melhor formulação), sem oclusão, com ratos fêmea da espécie Wistar-Lewis. Estes ensaios permitiram verificar que 24 horas após a primeira aplicação cutânea de creme na zona abdominal dos ratos era possível detectar quantidades mensuráveis de naproxeno na corrente sanguínea. O mesmo ensaio realizado com um gele comercial contendo naproxeno revelou valores de níveis séricos do anti-inflamatório, cujas diferenças entre os dois tipos de preparação farmacêutica são estatisticamente não significativas. No entanto, dada a grande variabilidade biológica inerente à pele, deveria ser realizado um maior número de ensaios para se poderem tirar conclusões mais seguras acerca da eficácia e da biodisponibilidade relativa da preparação farmacêutica desenvolvida ao longo deste trabalho.

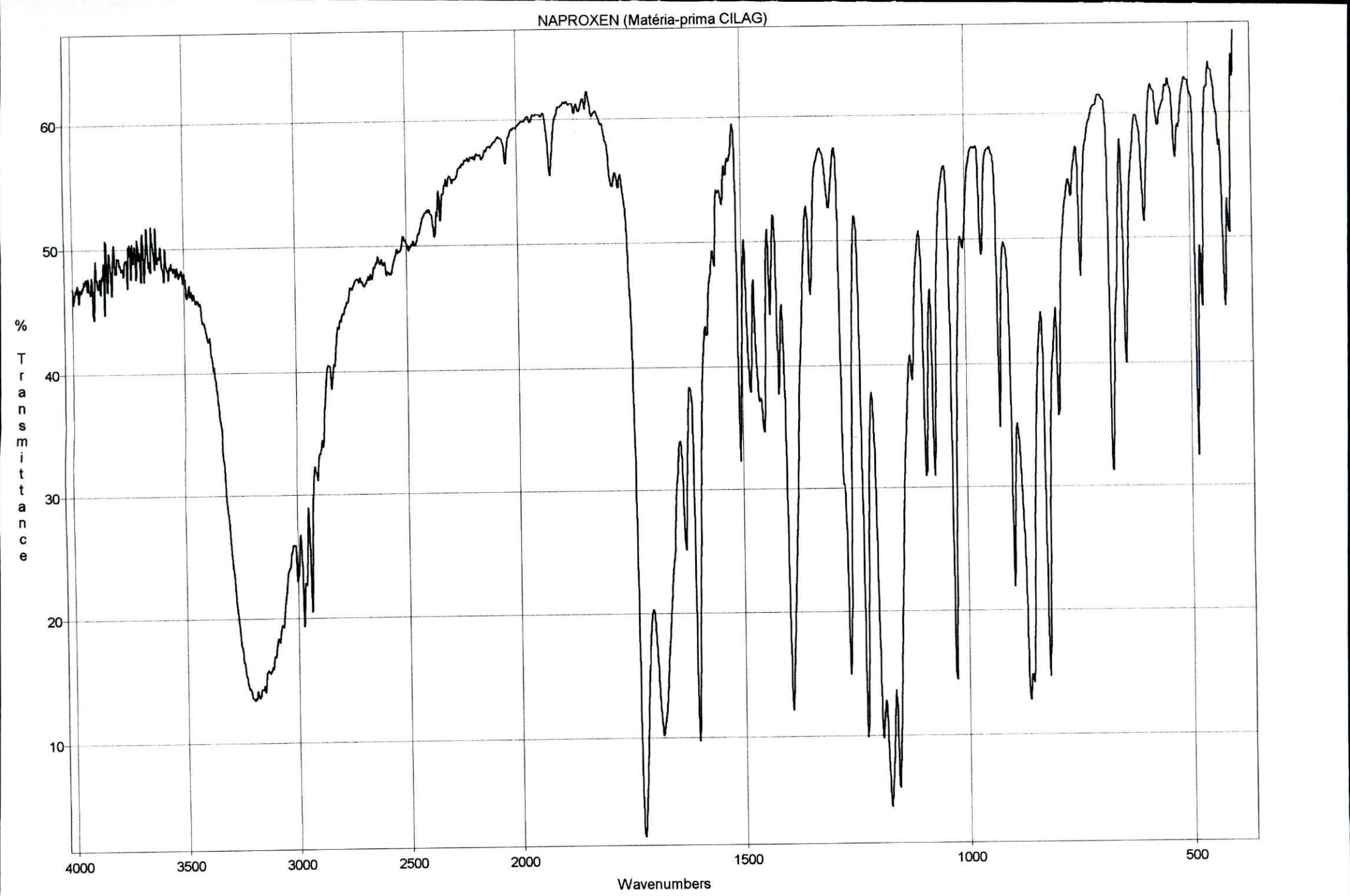
Seria pertinente em trabalhos futuros realizar ensaios clínicos para avaliar o poder anti-inflamatório do naproxeno veiculado no creme em estudo, após a administração, em animais de experiência, de substâncias indutoras da inflamação tais como, por exemplo, a carragenina.

O desenvolvimento de uma nova preparação farmacêutica exige a elaboração minuciosa de uma gama muito variada de ensaios não só da área da Tecnologia Farmacêutica, mas também de ciências como a Biologia, a Química, a Física, a Bioquímica, a Farmacologia e a Toxicologia. Assim sendo, a Tecnologia Farmacêutica é uma ciência que vai buscar aos outros ramos do saber os conhecimentos básicos de que necessita para transformar os fármacos em formas farmacêuticas facilmente administráveis e dotadas de eficácia terapêutica.

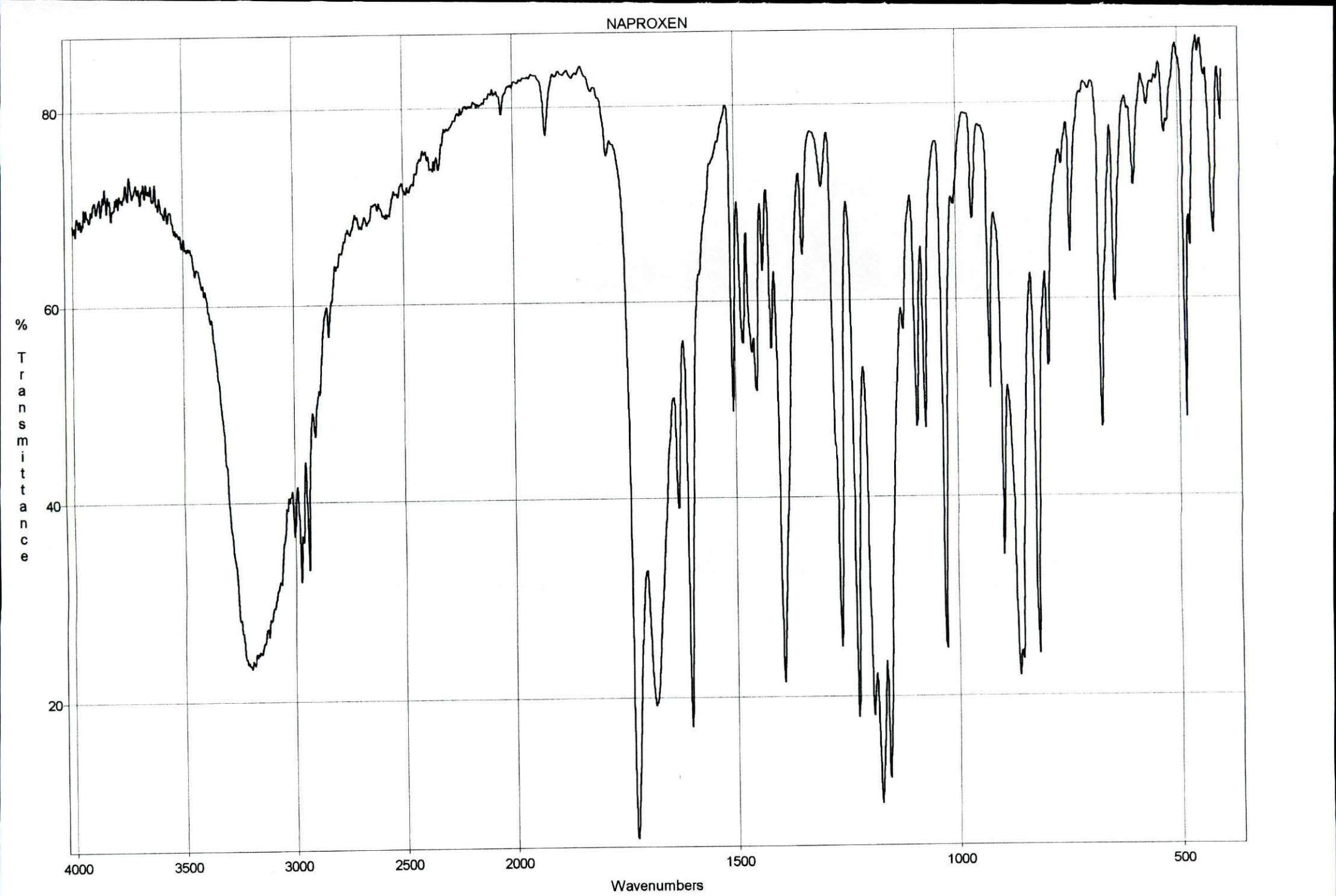
ANEXOS

ANEXO 1

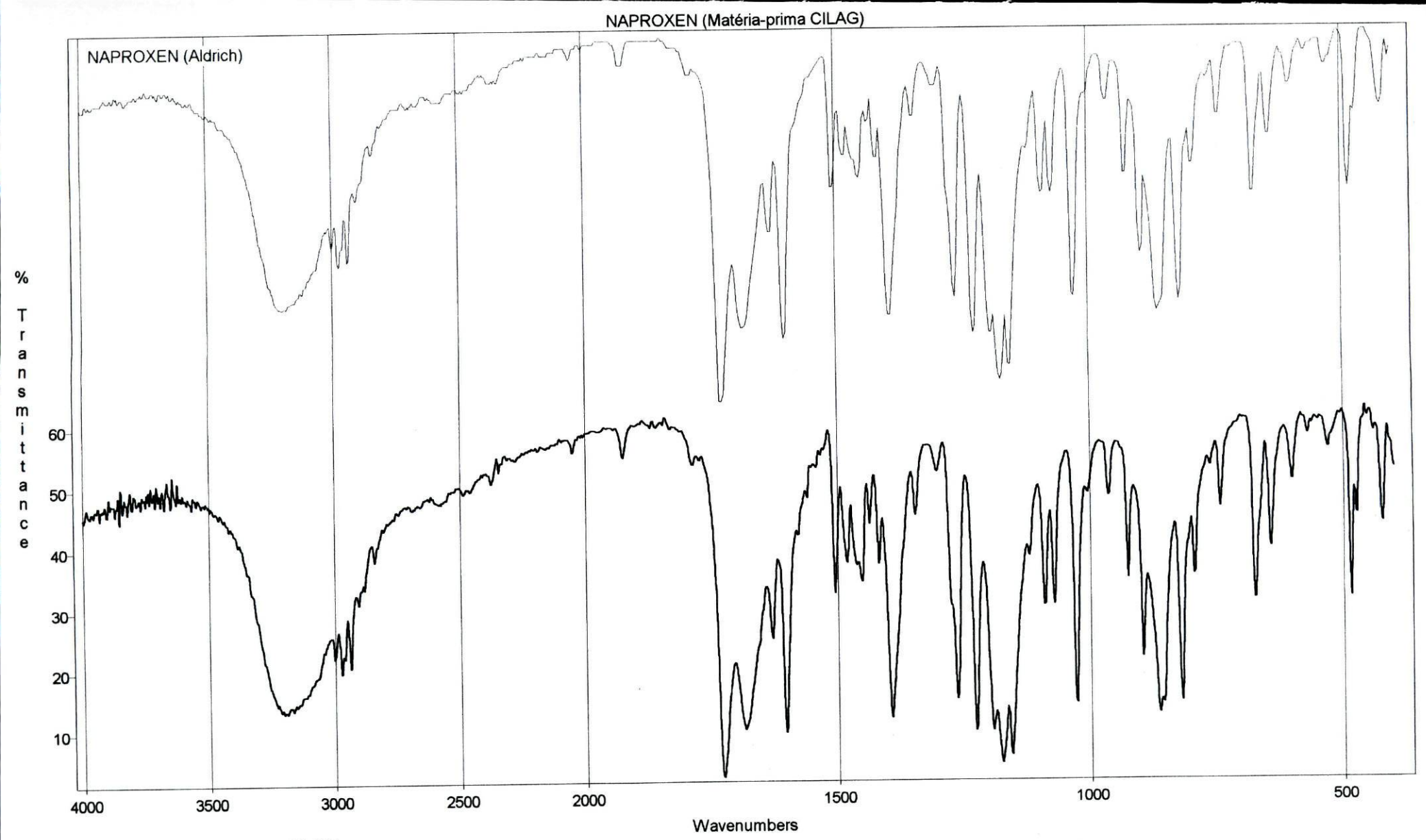
Nas páginas 136, 137 e 138 estão representados, respectivamente, os espectros de I.V. da matéria-prima (Janssen-Cilag), do naproxeno padrão (Aldrich) e a sobreposição dos dois espectros anteriores.



1: tmp83: NAPROXEN (Matéria-prima CILAG)



1: tmp82: NAPROXEN



1: tmp84: NAPROXEN (Matéria-prima CILAG)
2: QO: NAPROXEN (Aldrich)

Results for tmp84.ras

1	QO	3	0.99	NAPROXEN (Aldrich)
2	QO	2	0.28	Sulfametazina
3	QO	1	0.20	Sulfamerazina

ANEXO 2

Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios de controlo microbiológico (Capítulo IV).

Solução de peptona tamponada, com cloreto de sódio, de pH 7,0

Fosfato monopotássico	3,56g
Fosfato dissódico di-hidratado	7,23g
Cloreto de sódio	4,30g
Peptona de carne ou de caseína	1,0g
Água purificada	1000 ml

Meio de Sabouraud

Peptonas de carne e de caseína	10,0g
Glicose mono-hidratada	40,0g
Gelose	15,0g
Água purificada	1000 ml

Meio líquido lactosado

Extracto de carne	3,0g
Hidrolisado pancreático de gelatina	5,0g
Lactose	5,0g
Água purificada	1000 ml

Meio líquido de Mac Conkey

Hidrolisado pancreático de gelatina	20,0g
Lactose	10,0g
Bílis de boi desidratada	5,0g
Púrpura de bromocresol	10mg
Água purificada	1000ml

Plate Count Agar

Tryptona	5,0g
Extrato autolítico de levedura	2,5g
Glucose	1,0g
Agar agar bacteriológico	15,0g

Meio gelosado de Mac Conkey

Hidrolisado pancreático de gelatina	17,0g
Peptonas de carne e de caseína	3,0g
Lactose	10,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Sais biliares	1,5g
Gelose	13,5g
Vermelho neutro	30,0mg
Violeta de cristal	1,0mg
Água purificada	1000ml

Meio gelosado com cetrimida

Hidrolisado pancreático de gelatina	20,0g
Cloreto de magnésio	1,4g
Sulfato dipotássico	10,0g
Cetrimida	0,3g
Gelose	13,6g
Água purificada	1000 ml
Glicerina	10,0ml

Manitol Salt Agar ou Chapman

Extrato de carne	1,0g
Bio-polytone	10,0g
Cloreto de sódio	75,0g
D-Manitol	10,0g
Agar	15,0g
Vermelho de fenol	0,025g

Tryptic Soy Broth

Tryptona	17,0g
Peptona papaínica de soja	3,0g
Glucose	2,5g
Fosfato dissódico	2,5g
Cloreto de sódio	5,0g

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1-Amaral, H., Aplicação Cutânea de Anti-inflamatórios - Formulação e Avaliação da penetração, Seminário apresentado na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1995.

2-Zatz, J. L., Skin Permeation - Fundamentals and Application, Allured Publishing Corp. Wheaton, Il, 1993.

3-Prista, L. N., Alves, A. C., Morgado, R. M., Tecnologia Farmacêutica, I Vol., 5ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

4-Ribaud, C., Garson, J., Doucet, J., Lêvêque, J., *Pharm. Research*, 11:1414-1418, 1994.

5-Lippold, B., C., *Pharm. Acta Helv.*, 67:294-300, 1992.

6-Ashton, P., Hadgraft, J., Walters, K., *Pharm. Acta Helv.*, 61, 228-235, 1986.

7-Francoeur, M. L., Monteiro-Riviere, N. A., Riviere, J. E., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (3), 175-183, 1995.

8-Laurence, D. R., Bacharach, A. L., Evaluation of Drug Activities: Pharmacocinetics, Vol. 2, Academic Press, 815-826, 1964.

9-Fonseca, A., Prista, L. N., Manual de Terapêutica Dermatológica e Cosmetologia, 1ª Edição, Livraria Roca Lda., 99, 1984.

10-Garrett e Oswald, Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas - Manual de Farmacologia e Farmacoterapia, I Vol., Porto Editora, 2ª Edição, 1986.

11-Singh, P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 26: 144-151, 1994.

12-Goodman and Gilman, As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 8ª Edição, Guanabara - Koogan, 438, 1992.

13- Farmacopeia Portuguesa V, Imprensa Nacional Casa da Moeda, Parte II, Tomo VII.

14-Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Company, 1118, 1990.

15-The Merck Index, 19th Edition, Merch & Co. Inc., 6330, 1989.

16-Martindale de Extra Pharmacopeia, 30th Edition, 25-26, 1993.

17-Todd, P.,A., Clissold, S. P., *Drugs*, 40: 91-137, 1990.

18- Runkel, R. Chaplin, M., Boost, G., Segre, E., Forchielli, E., *J. Pharm. Sci.*, 61: 703-708, 1972.

19-Suh, H., Jun, H. H., Lu, G. W., *J. Liq. Chrom.*, 18 (15), 3105-3115, 1995.

20-Thompson, G. F., Collins, J. M., *J. Pharm. Sci.*, 62: 937-941, 1973.

21-Upton, R. A., Buskin J. N., Williams, R. L., Holford, N. H., Riegelman S., *J. Pharm. Sci.*, 69:1254-1257, (1980).

22-Suh, Hearan, Jun, H. W., *Int. Jour. Pharm.*, 129: 13-20, 1996.

23-Roszkowski, A. P., Wendell, H. R., Tomolonis, A. J., Miller, L. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 179: 114-123, 1971.

24-Índice Nacional Terapêutico, Tupam Editores, 1304, 1996.

25-American Hospital Formulary Service, Drug Information 84, American Society of Hospital Pharmacists, 615, 1984.

26-Wanwimolruk, S., *J. Liq. Chrom.*, 13 (8), 1611-1625, 1990.

27-Guia para o Bom Fabrico de Medicamentos, Imprensa Nacional Casa da Moeda, 39, 1992.

28-Farmacopeia Portuguesa V, Imprensa Nacional Casa da Moeda, Parte I.

29-Clarke's, Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluid and Post-morten material, Second Edition, The Pharmaceutical Society of Great Britain, 799-800, 1986.

30-Chust, R. B., *Boletim SPQ*, 39:43-53, 1990.

31-Prista, L. N., Alves, A. C., Morgado, R. M., Tecnologia Farmacêutica, III Vol., 4ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

32-Avis, K. E., Lachman, L., Lieberman, H., Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol. 1, Marcel Dekker, Inc. 89-138, 1984.

33-Rácz, I., Drug Formulation, Jhon Wiley & Sons, 13, 1989

34-Yamana, T., Tsuji, A., Miyamoto, E., Kubo, O., *J. Pharm. Sci.*, 66: 747--749, 1977.

35-Negishi, J., Takayama, K., Hgashiyama, K., Chida, Y., Isowa, K., Nagai, T., *S.T.P. Pharma Sciences*, 5 (2), 156-161, 1995.

36-Sousa Lobo, J. M., Contribuição para o Estudo do Fabrico, Estabilidade e Biodisponibilidade de Formas Farmacêuticas Contendo Dipirona, Tese de Doutoramento apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1989.

37-Ostrenga, J., Steinmetz, C., Poulsen, B., *J. Pharm. Sci.*,60:1975-1979, 1971.

38-Ayres, J., Laskar, P., *J. Pharm. Sci.*, 63: 1402-1406, 1974.

39-Prista, L. N., Bahia, M. F., Vilar, E., Dermofarmácia e Cosmética, I Vol., Associação Nacional das Farmácias, 109, 1992.

40-Kadir, R., Stempler, D., Liron, Z., Cohen, S., *J. Pharm. Sci.*, 76: 774--778, 1987.

41-Brandau, R., Lippold, B. H., Dermal and Transdermal Absorption, Paperback APV, 1982.

42- Handbook of Pharmaceutical Excipients, The Pharmaceutical Society of Great Britain, 1986.

43-Higushi, W. L., *J. Pharm. Sci.*, 77:802-804, 1962.

44-Swarbrick, J., Boylan, J. C., Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Vol. 1, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1988.

45- Wu, S. T., Shiu, G. K., Simmons, J. E., Bronaught, R. L., Skelly, J. P., *J. Pharm. Sci.*, 81: 1153-1156, 1992.

46-Santoyo, S., Arellano, A., Ygartua, P., Martín, C., *Pharm. Acta Helv.*, 71:141-146, 1996.

47-Steeman, G., Goyanes, L., Bregni, C., *Revista de la O.F.I.L.*, 3:256-258, 1993.

48-Bronaugh, R. L., Stewart, R. F., *J. Pharm. Sci.*, 73:1255-1258, 1984.

49-Goto, S., Uchida, T., Lee, C. K., Yasutake, T., Zhang, J., *J. Pharm. Sci.*, 82:959-963, 1993.

50-Cooper, E. R., *J. Pharm. Sci.*, 73:1153-1156, 1984.

51-Wurster, D. E., Kramer, S. F., *J. Pharm. Sci.*,50: 288-293, 1961.

52-Barry,W.B., Dermatological Formulations - Percutaneous Absorption, Vol. 18, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1983.

53-Goodman, M., Barry, B. W., *Int. J. Pharm.*, 57:29-40, 1989.

54-Ashton, P., Walters, K. A., Brain, K. R., Hadgraft, J., *Int. J. Pharm.*, 87: 265-269, 1992.

55-Garrison, M. D., Doh, L. M., Potts, R. O., Abraham, W., *J. Cont. Release*, 31: 263-269, 1994.

56-Yamashita, F., Koyama, Y., Kitano, M., Takakura, Y., Hashida, M., *Int. J. Pharm.*, 117:173-179, 1995.

57- Mezei, M., Ryan, K. J., *J. Pharm. Sci.*, 61: 1329-1331, 1972.

58-Breuer, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 30: 41, 1978.

59- Patil, S., Singh P., Sarasour, K., Maibach, H., *J. Pharm. Sci.*, 84: 1240--1244, 1995.

60-Bonina, F.P., Montenegro, L., Guerrera, F., *Int. J. Pharm.*, 100, 99-105, 1993.

61- Chowhan, Z. T., Pritchard, R., Rooks, W. H., Tomolonis, A., *J. Pharm. Sci.*67:1645-1647, 1978.

62- Chowhan, Z. T., Pritchard, R., *J. Pharm. Sci.*, 67:1272-1274, 1978.

63-Santos, D., Absorção Percutânea - Geles de Carbopol contendo Fentiazac, Tese de Doutoramento apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1995.

64- Edmunds, T., *Cosm. & Toilet.*, 5:50-54, 1993.

65-"Les pommades: propositions d'essais", Rapport d'une commission SFSTP, *S.T.P. Pharma 6 (5)*, 333-343, 1990.

66-The Pharmacopoeia of Japan, Ninth Edition, Society of Japanese Pharmacopoeia, 1291-1298, 1976.

67-Yellore, S., *The Eastern Pharmacist*, 41-43, Sept. 1992.

68-Prista, L. N., Alves, A. C., Morgado, R. M., Tecnologia Farmacêutica, II Vol., 5ªEdição, Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

69-Scott Blair, G. W., Elementary Rheology, Academic Press, London and New York, 1969.

70-Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Company, 310-326, 1990.

71-The United States Pharmacopeia XXIII, National Formulary XVIII, U. S. Pharmacopeial Convention, Inc., 1619,1995.

72-Loenhout, J. W. A., Ginneken, C. A. M., Ketelaars, H. C. J., Kimenai, P. M., Tan, Y., Gribnau, F. W. J., *J. Liq. Chrom.*, 5 (3), 549-561, 1982.

73-Nielsen-Kudsk, F., *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 47: 267-273, 1980.

74-Satterwhite, J. H., Boudinot, F. D., *J. Chromatogr.*, 431:444, 1988.

75-Burgoyne, R. F., Brown P. R., Kaplan, S. R., *J. Liq. Chrom.*, 3:101-111, 1980.

76-Karidas, T., Avgerinos, A., Malamataris, S., *Analytical Letters*, 26, 11: 2341-2348, 1993.

77-Shimek, J. L., Rao, N. G. S., Khalil, S. K. W., *J. Pharm. Sci.*,71:436--439, 1982.

78-Antilla, M., *J. Pharm. Sci.*, 66: 433-434, 1977.

79-Singh, A. K., Jang, Y., Mishra, V., Granley, K., *J. Chromatogr.*, 568: 351, 1991.

80-Kazemifard, A. G., Moore, D. E., *J. Chromatogr.*, 533: 125, 1990.

81-Amos, B., Marple, L., Smithers, J., Martin, S. B., *J. Chromatogr.* 206:151, 1981.

82-Panadero, S., Gómez-Hens, A., Pérez-Bendito, D., *Analytical Letters*, 28:1405-1419, 1995.

83-Maya, M., Morais, J., *Revista Port. Farm.*, nº1, 31-35, 1990.