



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

OBTENÇÃO TECNOLÓGICA E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE UMA MICROEMULSÃO
CONTENDO FENOBARBITAL PARA USO TRANSDÉRMICO

Kayo Alves Figueiredo

Teresina – Piauí

Setembro/2013

KAYO ALVES FIGUEIREDO

OBTENÇÃO TECNOLÓGICA E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE UMA MICROEMULSÃO
CONTENDO FENOBARBITAL PARA USO TRANSDÉRMICO

Dissertação de mestrado submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Co-Orientador: Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho

Teresina – Piauí

Setembro/2013

KAYO ALVES FIGUEIREDO

OBTENÇÃO TECNOLÓGICA E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE UMA MICROEMULSÃO
CONTENDO FENOBARBITAL PARA USO TRANSDÉRMICO

Dissertação de mestrado submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (Orientador)
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – CCS/UFPI

Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho (Co-Orientador)
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – CCS/UFPI

Prof. Dra. Hercília Maria Lins Rolim (Examinador interno)
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – CCS/UFPI

Prof. Dra. Adriana da Rocha Tomé (Examinador externo)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida (Examinador externo)
Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido – UNIVASF

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a Regina Ferraz Mendes

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a Lina Gomes Santos

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Dedico este trabalho a Deus,
que sempre me proporcionou muitas graças
e a todos que, de alguma forma,
contribuíram para este momento...

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, ser maior, pela existência e que sempre permitiu as conquistas alcançadas.

Aos *meus pais*, pelo amor, incentivo e por tudo o que fizeram por mim.

À *Jéssica Freire*, pelo carinho e companheirismo a mim dedicados e por me fazer viver um amor de verdade.

A todos os *amigos, irmãos, tios, primos e toda a família* pelo apoio e por entenderem os muitos momentos de ausência.

Ao *Prof. André*, pelas várias idéias e grandiosas contribuições. Uma peça fundamental neste trabalho.

Ao *Prof. Rivelilson*, exemplo de pesquisador, pela oportunidade, contribuições e pelo grande incentivo. A motivação recebida foi importantíssima nesta etapa final.

Ao *PPGCF* e à *UFPI*, pela contribuição ao meu crescimento científico.

Aos colegas de *Lapnex*, pelo acolhimento e ajuda sempre que precisei.

À *Farmácia Escola da UFPI*, pela cessão dos laboratórios e pelas experiências profissionais vivenciadas desde a graduação.

Ao *Biotec*, pela ajuda com a realização de alguns protocolos experimentais.

À *Profa Adriana Tomé* pela ajuda com a realização do histopatológico.

À *Jamilly Kelly e José Aleksandro* pela disponibilização dos laboratórios da UEPB.

Aos *colegas de Mestrado*, pela troca de experiências e bons momentos vividos juntos.

À *Shirlene* pela valiosa ajuda nos protocolos *in vivo* e à *José Terceiro* pelas ótimas dicas para a validação.

À *Daniel, Luan, Adson, Verônica, Lucas, Vítor, Gláucia, Iluska* e ao *LADERM* pela ajuda nas trabalhosas cinéticas e em outros importantes protocolos.

A meus locais de trabalho, *Departamento de Saúde do IFPI e Farmácia – HUT*, principalmente aos farmacêuticos *José Ubirajara e Ilka de Carvalho Barros*, pelo total apoio nos muitos momentos que necessitei.

À *Rosana e Juliana*, novamente estudando juntos. A amizade e incentivo de vocês foi essencial. Saudades, ETERNOS...

Enfim, a todos, o meu MUITO OBRIGADO!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE QUADROS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1. EPILEPSIA	21
3.1.1 Definição	21
3.1.2 Epidemiologia	21
3.1.3 Características clínicas	21
3.1.4 Tratamento das crises epiléticas	22
3.1.5 Avaliação pré-clínica de fármacos antiepiléticos	23
3.2 FENOBARBITAL	23
3.2.1 Características físico-químicas	23
3.2.2 Uso clínico	24
3.2.3 Farmacocinética	26
3.2.4 Especialidades farmacêuticas disponíveis	27
3.2.5 Formulações em desenvolvimento	27
3.3. VIA DE ADMINISTRAÇÃO TRANSDÉRMICA	28
3.3.1 Importância	28
3.3.2 Estudos de fármacos para a via transdérmica	30
3.4. MICROEMULSÕES	30
3.4.1 Características especiais	30
3.4.2 Estudos farmacológicos de fármacos em microemulsões	33
3.4.3 Permeação transdérmica de microemulsões	34
4. CAPÍTULO I: OBTENÇÃO, DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMETRICA UV/VIS E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO DE FENOBARBITAL EM MICROEMULSÃO ..	36
RESUMO	38

ABSTRACT	39
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
Materiais	42
Reagentes e amostras	42
Equipamentos e condições de análise	42
Métodos	42
Preparo da microemulsão e incorporação do FEN.....	42
Caracterização físico-química	42
Estabilidade preliminar	44
Validação de método analítico para determinação de FEN em microemulsão.....	45
Cinética de liberação <i>in vitro</i> de FEN em microemulsão.....	47
Análise estatística.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
Obtenção da microemulsão e caracterização físico-química.....	48
Estabilidade preliminar	50
Validação de método analítico para determinação de FEN em microemulsão	53
Cinética de liberação <i>in vitro</i> de FEN em microemulsão	56
Determinação da solubilidade de FEN em diferentes meios tampão.....	56
Cinética de liberação <i>in vitro</i>	58
CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS	59
5. CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO ANTIEPILEPTICA E ANTIOXIDANTE <i>IN VIVO</i> DE UMA MICROEMULSÃO PARA ADMINISTRAÇÃO TRANSDÉRMICA DE FENOBARBITAL.....	65
RESUMO	67
ABSTRACT	68
INTRODUÇÃO.....	70
MATERIAL E MÉTODOS.....	72
Animais.....	72
Preparo das amostras para tratamento	72
Modelo de epilepsia induzida por pilocarpina.....	72
Avaliação do estresse oxidativo em hipocampo de ratos.....	73
Determinação da peroxidação lipídica e do conteúdo de nitrito.....	73
Determinação de glutathiona reduzida (GSH).....	73

Análise histopatológica.....	74
RESULTADOS	74
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS	84
6. CAPÍTULO III: MICROEMULSÕES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS PARA A VIA TRANSDÉRMICA: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA	90
RESUMO	92
ABSTRACT	93
INTRODUÇÃO.....	94
METODOLOGIA.....	95
RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS	101
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
REFERÊNCIAS	116
8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	116
ANEXOS	117

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
Å	Angstrom
A/O	Água em óleo
ABS	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
ATC	<i>Anatomical Therapeutic Chemical</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coefficiente de variação
DNTB	Ácido 2-nitrobenzóico
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EM50	Emulsão contendo 5% de fenobarbital
EME	Estado de mal epiléptico
EtOH	Etanol
FEN	Fenobarbital
FS	Fenobarbital solução
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GSH	Glutathiona reduzida
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LSS	Laurilsulfato de sódio
MDA	Malonaldeído
ME100	Microemulsão contendo 10% de fenobarbital
ME50	Microemulsão contendo 5% de fenobarbital
MET	Movimentos estereotipados
NaOH	Hidróxido de sódio
O/A	Óleo em água
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Cologaritmo da constante de ionização de ácidos
r ²	Coefficiente de correlação linear
SCP	Sinais colinérgicos periféricos

SLF	Sistema de Liberação de Fármacos
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
u. m. a.	Unidade de massa atômica
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do fármaco fenobarbital (5-etil-5-fenilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona) (USP, 2013).....	23
Figura 2: Barreiras para a permeação transdérmica de fármacos. Adaptado de: Wellsprings, 2013.....	29
Figura 3: Vias de penetração cutânea de fármacos. Adaptado de: Holmgaard; Nielsen, 2009.	29
Figura 4: Representação esquemática de micelas de microemulsões água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) e estruturas bicontínuas. W: água. (MEHTA; KAUR, 2010).....	32
Figura 5: Representação esquemática de um diagrama de fases ternário (KLEIN, 2007).....	33
Figura 6: Célula de difusão segundo modelo de Franz. Adaptado de: Simões, 2001.....	35
Figura 7: Ilustração da permeação transdérmica de fármacos em microemulsões. Adaptado de: Lynk Biotech, 2013.	35
Figura 8: Estrutura química do antiepiléptico FEN (USP, 2013).....	40
Figura 9: Curva de viscosidade de formulações de microemulsão (A) e emulsão convencional (B).....	50
Figura 10: Espectros de absorção de (a) FEN (12 µg/mL), (b) FEN em microemulsão (12 µg/mL), (c) placebo de microemulsão (sistema sem fármaco) e (d) solvente EtOH:NaOH (pH 13, 0,1 M) (50:50, v/v).	53
Figura 11: Teor de fenobarbital no estudo de estabilidade de uma mesma amostra analisada de 0–3,5 h na presença e na ausência de luz (n = 3). *p<0,05, em relação ao tempo 0. Teste t paramétrico.	56
Figura 12: Solubilidade do FEN em diferentes meios tampão (n = 3).....	57
Figura 13: Cinética de liberação <i>in vitro</i> de ME50 e EM50 em células de difusão de Franz..	58
Figura 14: Alterações bioquímicas nos níveis de TBARS em hipocampo de ratos após crises epiléticas induzidas por pilocarpina 400 mg/kg i.p. (n = 8).	76
Figura 15: Alterações bioquímicas nos níveis de nitrito em hipocampo de ratos após crises epiléticas induzidas por pilocarpina 400 mg/kg i.p. (n = 10)..	77
Figura 16: Alterações bioquímicas nos níveis de GSH em hipocampo de ratos após crises epiléticas induzidas por pilocarpina 400 mg/kg i.p. (n = 8)..	78
Figura 17: Análise histopatológica da região CA1 e giro dentado do hipocampo de ratos submetidos a crises epiléticas induzidas por pilocarpina.	79
Figura 18: Número de patentes depositadas por base de dados.	96

Figura 19: Distribuição das patentes depositadas por país de origem. US (Estados Unidos); CN (China); IT (Itália); KR (República da Coreia); GB (Grã-Bretanha); JP (Japão); IL (Israel).....	96
Figura 20: Evolução anual de depósitos de pedido de patente.	97
Figura 21: Classes terapêuticas dos fármacos incorporados em microemulsões para aplicação transdérmica.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais comparações entre emulsões convencionais e microemulsões (DAMASCENO et al., 2011).	31
Tabela 2: Descrição das formulações utilizadas no estudo de estabilidade preliminar.....	44
Tabela 3: Caracterização físico-química de microemulsão placebo e microemulsão contendo FEN 5% ou 10%.....	48
Tabela 4: Estabilidade preliminar das formulações testados após 30 dias à temperatura ambiente, estresse térmico e ciclo gelo-desgelo.....	52
Tabela 5: Parâmetros obtidos na validação do método analítico de determinação de FEN em microemulsão.	54
Tabela 6: Análise de Variância ANOVA (um critério) e teste de ajuste linear para a linearidade do método.	54
Tabela 7: Absorbâncias obtidas através de varreduras espectrofotométricas em 242 nm utilizando-se tampão borato e associação deste com surfactantes/co-solventes.	57
Tabela 8: Alterações comportamentais no pré-tratamento dos animais com microemulsão contendo fenobarbital sob as crises epiléticas induzidas por pilocarpina.	75
Tabela 9: Alterações comportamentais no pré-tratamento dos animais com microemulsão contendo fenobarbital sob a presença de SCP, MET e tremores nas crises epiléticas induzidas por pilocarpina.....	75
Tabela 10: Algumas patentes de microemulsões para uso transdérmico.	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros físico-químicos do fenobarbital matéria-prima (SWEETMAN, 2007; BRASIL, 2010b).....	24
Quadro 2: Protocolo de uso de fenobarbital segundo Ministério da Saúde.	25
Quadro 3: Situação atual das especialidades farmacêuticas e denominações comerciais disponíveis para fenobarbital e para sua forma sódica no Brasil (registros ativos em 21.03.2013) (ANVISA, 2013).....	27

Obtenção tecnológica e avaliação *in vivo* de uma microemulsão contendo fenobarbital para uso transdérmico. KAYO ALVES FIGUEIREDO. Orientador: Rivelilson Mendes de Freitas. 118f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2013.

RESUMO

Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo são portadores de epilepsia. É considerada a segunda causa mais frequente de distúrbio neurológico em adultos jovens, com uma incidência geral de aproximadamente 1% em crianças. O fenobarbital é um barbitúrico utilizado no tratamento de diferentes formas de epilepsia pediátrica e estado de mal epilético. A administração transdérmica de fármacos é uma importante alternativa a via oral e, recentemente, uma grande quantidade de estudos é voltada para o emprego de microemulsões como sistema de liberação de fármacos para a via transdérmica. O objetivo deste trabalho foi obter uma microemulsão contendo fenobarbital, bem como avaliar seus efeitos farmacológicos *in vivo* em modelos animais de epilepsia após administração transdérmica. No capítulo I, foi realizada a caracterização físico-química da microemulsão contendo fenobarbital. A incorporação do fenobarbital nas concentrações de 5 e 10% não alterou o pH e a resistência à centrifugação. Houve aumento do tamanho da partícula, redução da condutividade e alteração do índice de refração em relação à microemulsão placebo. A microemulsão manteve-se estável físico-quimicamente por 30 dias à temperatura ambiente e quando foi submetida ao teste de estresse térmico e teste de ciclo gelo-desgelo. Além disso, foi desenvolvido um método analítico de determinação do fármaco em microemulsão por espectrofotometria. Em estudos de cinética de liberação *in vitro* (modelo de Franz), a microemulsão obteve um perfil de liberação *in vitro* superior a emulsão tópica contendo fenobarbital. No capítulo II, foi avaliada a atividade antiepiléptica da microemulsão em um modelo de epilepsia induzida por pilocarpina, além da sua atividade antioxidante em hipocampo dos animais submetidos às crises epiléticas. Realizou-se também a análise histopatológica de áreas do hipocampo dos animais. A microemulsão foi capaz de aumentar a latência para a instalação das crises epiléticas, reduzir a sua frequência e o número de mortes. Reduziu ainda o estresse oxidativo e lesões neuronais em hipocampo de ratos por meio da avaliação dos níveis de peroxidação lipídica, nitrito, glutathiona reduzida (GSH) e análise histopatológica. A emulsão não foi capaz de reduzir significativamente o número de mortes e de reduzir o estresse oxidativo quando se avaliou os níveis de TBARS e nitrito em hipocampo de ratos submetidos à indução de crises epiléticas. No capítulo III, realizou-se uma prospecção tecnológica com o levantamento nas principais bases de patentes de sistemas de liberação de fármacos que continham microemulsões para uso transdérmico. Dessa forma, a microemulsão contendo fenobarbital demonstrou ter potencial aplicação como nanocarreador para a via transdérmica que poderá compor uma patente de invenção de um produto para tratamento da epilepsia.

Palavras-chave: Caracterização físico-química; Estudos farmacológicos; Fenobarbital; Nanotecnologia.

Technological obtention and *in vivo* evaluation of a microemulsion containing phenobarbital for transdermal use. KAYO ALVES FIGUEIREDO. Advisor: Rivelilson Mendes de Freitas. 118 l. Master's Thesis. Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2013.

ABSTRACT

Approximately 50 million people worldwide suffer from epilepsy. It is considered the second most frequent cause of neurological disorder in young adults, with an overall incidence of approximately 1% in children. Phenobarbital is a barbiturate used to treat different forms of pediatric epilepsy and status epilepticus. Transdermal administration of drugs is an important alternative to oral and recently, a lot of studies are focused on the use of microemulsions as drug delivery system for the transdermal route. The aim of this study was to obtain a microemulsion containing phenobarbital and assess its pharmacological effects *in vivo* in animal models of epilepsy after transdermal administration. In Chapter I, we performed a physicochemical characterization of the microemulsion containing phenobarbital. The incorporation of phenobarbital concentrations of 5 to 10% did not change the pH and resistance to centrifugation. There was an increase of particle size, reducing the conductivity and refractive index change compared to placebo microemulsion. The microemulsion was stable physicochemically for 30 days at room temperature and when it was subjected to thermal stress test and cycle test freeze-thaw. Furthermore, the analytical method was developed for the determination of drug in microemulsion by spectrophotometry. In studies of *in vitro* release kinetics (model of Franz), the microemulsion obtained a release profile *in vitro* better than macroscopic topical emulsion containing phenobarbital. In Chapter II, we assessed the antiepileptic activity of microemulsion in epilepsy model induced by pilocarpine, addition to its antioxidant activity in the hippocampus of animals subjected to seizures. We also conducted histopathological analysis areas of the hippocampus of animals. The microemulsion was able to increase the latency for the installation of seizures, reduce their frequency and number of deaths. Also reduced oxidative stress and neuronal damage in rat hippocampus by assessing the levels of lipid peroxidation, nitrite, reduced glutathione (GSH) and histopathological analysis. The emulsion was not able to reduce the number of deaths significantly and reduce oxidative stress when we assessed the levels of TBARS and nitrite in hippocampus of rats subjected to induction of seizures. In Chapter III, there was a technological forecasting survey with the main bases of patents for drug delivery systems containing microemulsions for transdermal use. Thus, the microemulsion containing phenobarbital demonstrated to have potential application as nanocarrier for transdermally that could compose a patent of a product for the treatment of epilepsy.

Keywords: Physicochemical characterization; Pharmacological studies; Phenobarbital; Nanotechnology.

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é um distúrbio cerebral causado por predisposição persistente do cérebro a gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição, caracterizada pela ocorrência de pelo menos uma crise epilética (GUILHOTO; MUSZKAT; YACUBIAN, 2006). Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo são portadoras de epilepsia. Segundo alguns dados da literatura, a prevalência desta condição no Brasil pode variar de 5,4 até 36,8/1000 habitantes (GOMES et al., 2002; KANASHIRO, 2006), com uma alta taxa de mortalidade em algumas regiões do país, chegando a 1,73 mortes/100.000 habitantes em Teresina, Piauí, no ano de 2007 (GOMES, 2011).

Na última década foi observado um grande avanço no tratamento das epilepsias, incluindo as novas drogas descobertas, novas formulações de fármacos já existentes, estimulação vagal, dieta cetogênica e o tratamento cirúrgico. Como estratégia geral para o tratamento de todas as epilepsias, vários especialistas sugerem o controle das crises com o uso de drogas em monoterapia (BETTING et al., 2003; DALMORA et al., 2010).

O fenobarbital é um ácido barbitúrico substituído com $pK_a = 7,3$ e que é apenas muito pouco solúvel em água (BIALER, 2012) e facilmente solúvel em etanol. É um barbitúrico que atua como um depressor do Sistema Nervoso Central não seletivo e amplamente utilizado como droga antiepilética, sendo um fármaco completo, bastante efetivo e possui vantagens como baixo custo, amplo espectro de ação e facilidade de uso (DALMORA et al., 2010).

O fenobarbital é um fármaco centenário e considerado ainda o tratamento farmacológico da epilepsia com maior relação custo-benefício, principalmente para os países em desenvolvimento (BRODIE; KWAN, 2012). É um dos fármacos de escolha no tratamento do estado epilético e das crises epiléticas febris (PASTORE; OFUCHI; NISHIYAMA, 2007).

Este barbitúrico possui boa biodisponibilidade oral, com absorção de quase 100% da dose administrada (DJABRI; GUY; DELGADO-CHARRO, 2012). A meia-vida plasmática é de aproximadamente 75 a 120 horas em adultos e é mais prolongada em recém-nascidos e mais curta (21 a 75 horas) em crianças.

Estudos têm demonstrado que a farmacocinética do fenobarbital em crianças e adultos jovens é idade-dependente (YUKAWA; HIGUCHI; AOYAMA, 1992). Em recém-nascidos, quando comparada a administração oral com a via intramuscular, há uma diferença de aproximadamente 60% em termos de biodisponibilidade (YUKAWA et al., 2011). Os recém-

nascidos apresentam absorção tardia e incompleta de fenobarbital por via oral quando comparados com a administração intramuscular (JALLING, 1975).

Na literatura, há diversos trabalhos descrevendo o estudo de formulações alternativas àquelas disponíveis no mercado para o fármaco fenobarbital. Entre as formulações encontradas na literatura, podem ser citados: supositórios (MOOLENAAR; KONING; HUIZINGA, 1979); suspensão oral (YSKA et al., 2000; MORANTES et al., 2010); solução oral (JELVEGHARI; NOKHODCHI, 2008); hidrogel e emulsão para uso transdérmico (ODRIA et al., 2005).

A utilização da via transdérmica oferece vantagens em diversas circunstâncias quando comparada às outras vias de administração, como, por exemplo, evitar as adversidades da via oral, é indolor, não invasiva e de fácil aplicação, podendo aumentar, dessa forma, a adesão do paciente à terapia (SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2010).

Por outro lado, na administração transdérmica, os fármacos encontram dificuldades para penetrar através da pele, a qual é uma importante barreira biológica que deixa penetrar apenas algumas substâncias em determinadas condições (OLIVEIRA et al., 2004). Alguns autores têm sugerido a via transdérmica como uma alternativa para a administração de fenobarbital (ODRIA et al., 2005; DJABRI; GUY; DELGADO-CHARRO, 2012).

As microemulsões podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, de dois líquidos imiscíveis (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos (com ou sem co-tensoativos), localizados na interface óleo/água (LAWRENCE, 1994). Elas diferem das emulsões convencionais por características básicas: as microemulsões possuem tensão interfacial muito baixa quando comparada à uma emulsão, podendo levar à formação espontânea daquelas e, conseqüentemente, a um tamanho nanométrico das suas gotículas (DAMASCENO et al., 2011).

Recentemente, diversos estudos relatam o emprego de microemulsões como sistema carreador de fármacos (ZHAO et al., 2006; TSAI et al., 2011; WANG et al., 2012). Medicamentos desenvolvidos no campo das microemulsões têm permitido a ampliação das possibilidades terapêuticas de fármacos potencialmente tóxicos, como a doxorrubicina e a ciclosporina (OLIVEIRA et al., 2004). Vários ensaios farmacológicos vêm sendo desenvolvidos para avaliar o efeito sistêmico de drogas administradas de forma transdérmica veiculadas em microemulsões (HE et al., 2003; ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011; WANG et al., 2012).

Tendo em vista as inúmeras vantagens no emprego das microemulsões para veiculação transdérmica e a necessidade de uma via alternativa para a administração de fenobarbital, este

trabalho, vem de forma inovadora, obter um sistema microemulsionado contendo fenobarbital, o qual, no futuro, servirá de base para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica para aplicação transdérmica.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Obter uma microemulsão contendo o fármaco fenobarbital, bem como avaliar seus efeitos farmacológicos *in vivo* em modelos animais de epilepsia após administração transdérmica.

2.2 Específicos

- Obter e realizar a caracterização físico-química de uma microemulsão contendo fenobarbital;
- Realizar estudo de estabilidade preliminar;
- Validar um método analítico de determinação de fenobarbital em microemulsão;
- Realizar estudo de cinética de liberação *in vitro* segundo modelo de Franz;
- Examinar o efeito antiepiléptico da microemulsão contendo fenobarbital em modelo animal de epilepsia induzida por pilocarpina em roedores;
- Avaliar o estresse oxidativo quanto aos níveis de glutathiona reduzida (GSH), peroxidação lipídica e nitrito, bem como lesões neuronais em hipocampo de roedores submetidos ao ensaio farmacológico após administração de microemulsão contendo fenobarbital.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. EPILEPSIA

3.1.1 Definição

A epilepsia é um distúrbio cerebral causado por predisposição persistente do cérebro a gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição, caracterizada pela ocorrência de pelo menos uma crise epilética (GUILHOTO; MUSZKAT; YACUBIAN, 2006). Pode ainda ser caracterizada por crises epiléticas recorrentes além de um período de 24 h, sem que haja um fator desencadeante agudo ou imediato, como condições tóxico-metabólicas e febris, podendo acometer várias pessoas e em diferentes idades (KANASHIRO, 2006).

3.1.2 Epidemiologia

Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo são portadoras de epilepsia. Segundo alguns dados da literatura, a prevalência desta condição no Brasil pode variar de 5,4 até 36,8/1000 habitantes (GOMES et al., 2002; KANASHIRO, 2006). A epilepsia é considerada a segunda causa mais frequente de distúrbio neurológico em adultos jovens (BETTING et al., 2003), com uma incidência geral de aproximadamente 1% em crianças (YACUBIAN, 2002).

A epilepsia é um dos distúrbios neurológicos mais comuns, apresentando uma taxa de prevalência de 5%, com aproximadamente 30 a 50% dos pacientes sintomáticos (FREITAS, 2006). Está associada à ocorrência de óbitos durante as crises, ocorrendo mais frequentemente dos 20 a 40 anos, e com uma taxa de mortalidade, em 2007, consideravelmente alta em Teresina (1,73 mortes/100.000 habitantes) em relação a outras capitais, como Belém (1,38), Recife (0,25), Rio de Janeiro (0,86), Porto Alegre (1,05) e Goiânia (0,38) (GOMES, 2011). Apesar disso, nos últimos anos, houve uma redução de 20,35% na taxa de mortalidade de epilepsia no Brasil, de 1,13/100.000 em 1980 para 0,9/100.000 em 2003) (GOMES, 2010).

3.1.3 Características clínicas

De forma semelhante ao câncer, a epilepsia tem muitas diferentes causas. Esta patologia neurológica pode estar associada a mudanças bioquímicas nos tecidos neuronais, afetando neurotransmissores, o metabolismo de carboidratos, as cascatas de sinalização de

segundo mensageiro e até mesmo a expressão gênica (FREITAS, 2006). Podem ser ainda de etiologia traumática e infecciosa, como os traumatismos crânioencefálicos e a neurocisticercose (LINEHAN et al., 2011).

Estudos epidemiológicos demonstram que pacientes epiléticos podem apresentar outras desordens de cunho neurológico, como déficit em vários domínios cognitivos (LINEHAN et al., 2011). Crises mal controladas da doença podem resultar em ferimentos e constrangimento, ansiedade, imprevisibilidade e, ocasionalmente, induzir ao óbito (DALMORA et al., 2010).

3.1.4 Tratamento das crises epiléticas

Na última década foi observado um grande avanço no tratamento das epilepsias incluindo as novas drogas descobertas, novas formulações de fármacos já existentes, estimulação vagal, dieta cetogênica e o tratamento cirúrgico. Como estratégia geral para o tratamento de todas as epilepsias, vários especialistas sugerem o controle das crises com o uso de drogas em monoterapia (BETTING et al., 2003; DALMORA et al., 2010).

A determinação do tipo específico de crise e da síndrome epilética do paciente é importante, uma vez que os mecanismos de geração e propagação de crise diferem para cada situação, e os fármacos anticonvulsivantes agem por diferentes mecanismos que podem ou não ser favoráveis ao tratamento. Os fármacos anticonvulsivantes atuam por meio de um ou de vários dos seguintes mecanismos: bloqueio de canais de sódio, aumento da inibição GABAérgica, bloqueio de canais de cálcio ou ligação à proteína SV2A da vesícula sináptica (BRASIL, 2010a).

Aproximadamente 60% dos pacientes com epilepsia conseguem o controle completo de suas crises com drogas antiepiléticas (BROWN; SHEERAN; REUBER, 2009). A não adesão à terapia farmacológica é considerada um dos mais graves problemas na prática médica atual, tendo consequências clínicas e econômicas (CARVALHO et al., 2012).

É bem estabelecida que há uma não adesão à terapia antiepilética, a qual pode levar a um descontrole das crises epiléticas (HOVINGA et al., 2008) e inclusive ao óbito (GOMES, 2010). Estudos têm demonstrado que de uma parte da população de aproximadamente 10000 indivíduos com epilepsia, aproximadamente 39% tomava menos de 80% do medicamento necessário, dificultando o tratamento das crises (BROWN; SHEERAN; REUBER, 2009). Mesmo com a ingestão de medicamentos em doses únicas diárias, como ocorre com alguns antiepiléticos, dentre eles o fenobarbital, alguns estudos mostram que há um significativo

percentual de não adesão à terapia oral, influenciando diretamente na recorrência da sua condição patológica (CARVALHO et al., 2012).

3.1.5 Avaliação pré-clínica de fármacos antiepilépticos

Diversos modelos animais de epilepsia são utilizados para estudar a fisiopatologia do processo convulsivo e a atividade antiepiléptica de fármacos em avaliação pré-clínica (FREITAS, 2006), uma vez que esses modelos reproduzem as alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal de humanos (BEN-ARI, 1981).

A administração de pilocarpina em roedores é um ótimo modelo animal de indução de crises epiléticas, com grandes semelhanças em impacto funcional e alterações morfológicas à epilepsia do lobo temporal em humanos (CAVALHEIRO et al., 1987). Este modelo tem sido utilizado com sucesso para avaliar a ação antiepiléptica de novas drogas (SCORZA et al., 2009), bem como novos sistemas de liberação de fármacos (MORENO et al., 2011).

3.2 FENOBARBITAL

3.2.1 Características físico-químicas

O fenobarbital (Figura 1) é um ácido barbitúrico substituído com $pK_a = 7,3$, com solubilidade moderada em água (BIALER, 2012) e pH-dependente (JELVEGHARI; NOKHODCHI, 2008).

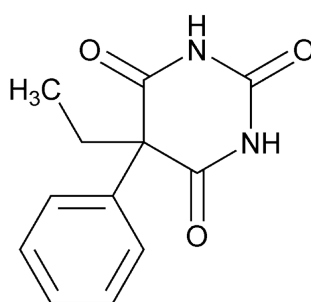


Figura 1: Estrutura química do fármaco fenobarbital (5-etil-5-fenilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona) (USP, 2013).

As principais características farmacopéicas do fenobarbital matéria-prima estão descritas descritas no Quadro 1.

Quadro 1: Parâmetros físico-químicos do fenobarbital matéria-prima (SWEETMAN, 2007; BRASIL, 2010b).

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	VALOR
Descrição	Pó cristalino branco ou cristais incolores inodoros.
pKa	Ácido fraco (pKa= 7,3)
Coef. Partição O/A	logP = 1,47
Nome químico	5-etil-5-fenil-1,3-diazinano-2,4,6-triona ou ácido 5-etil-5-fenilbarbitúrico
Classe química	Primidinatriona 5,5-dissubstituída
CAS	50-06-6
Classificação ATC	N03AA02 - Antiepiléticos/Barbituratos e derivados
Fórmula molecular	$C_{12}H_{12}N_2O_3$
pH	Próximo a 5 (solução saturada)
Peso molecular	232,24 u.m.a.
Faixa de fusão	174 - 178 °C
Solubilidade	Muito pouco solúvel em água, facilmente solúvel em etanol, ligeiramente solúvel em éter etílico. Solúvel em carbonatos e hidróxidos diluídos.

3.2.2 Uso clínico

O fenobarbital é um barbitúrico que atua como um depressor do Sistema Nervoso Central não seletivo, e é amplamente utilizado como droga antiepiléptica, sendo um fármaco completo e bastante efetivo e possui vantagens como baixo custo, amplo espectro de ação e facilidade de uso (DALMORA et al., 2010). É um fármaco centenário e é ainda o tratamento farmacológico da epilepsia com maior relação custo-benefício, principalmente para os países em desenvolvimento (BRODIE; KWAN, 2012).

É utilizado no tratamento de diferentes formas de epilepsia pediátrica e estado de mal epiléptico, sendo uma droga de primeira linha para o controle de crises epiléticas neonatais (ROCHA; BATISTA, NUNES, 2004; DJABRI; GUY; DELGADO-CHARRO, 2012). Possui máximo uso no controle das crises tônico-clônicas generalizadas e crises parciais simples

(VARONA; ESCRIBANO; MARTÍN-CALDERÓN, 2001), com eficácia comparável à fenitoína e à carbamazepina (BRODIE; KWAN, 2012). É um dos fármacos de escolha no tratamento do estado epiléptico e das crises epiléticas febris (PASTORE; OFUCHI; NISHIYAMA et al., 2007).

Apesar de sua incontestável eficácia no tratamento de crises epiléticas, a sua utilização no período neonatal e da infância requer a avaliação de informações sobre a influência de diversos fatores, como diferentes vias de administração e a disposição do fármaco nos líquidos corporais (YUKAWA et al., 2011).

3.2.2.1 Recomendações do Ministério da Saúde no uso do fenobarbital

No Quadro 2, podem ser encontradas as principais informações sobre o protocolo de uso do fenobarbital no tratamento de crises epiléticas, segundo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Epilepsia do Ministério da Saúde publicado em 2010 (BRASIL, 2010a) e Formulário Terapêutico Nacional/RENAME 2010 (BRASIL, 2010c).

Quadro 2: Protocolo de uso de fenobarbital segundo Ministério da Saúde.

Condição de uso	Recomendação/Informação	FONTE
<i>Monoterapia</i>	É largamente utilizado na prática clínica, por apresentar eficácia equivalente à da fenitoína no tratamento em monoterapia tanto de crises focais como nas generalizadas.	BRASIL, 2010a
<i>População</i>	Tratamento de crises focais e generalizadas de pacientes de qualquer idade, inclusive recém-nascidos.	BRASIL, 2010c
<i>Indicações</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Recomendação principal para o tratamento de crises focais. - Controle de crises epiléticas parciais, complexas e tônico-clônicas (segunda escolha). - Estado de mal epiléptico (para controle após diazepam). - Crises epiléticas em neonatos e febris na infância. 	BRASIL, 2010a; BRASIL, 2010c
<i>Desvantagem</i>	Efeitos colaterais, principalmente na área cognitiva, o que pode limitar seu uso tanto em crianças quanto em idosos.	BRASIL, 2010a
<i>Contra-indicações</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Porfíria. - Crises de ausência. - Hipersensibilidade a fenobarbital e a outros barbitúricos. - Insuficiência hepática grave. 	BRASIL, 2010c

	- Insuficiência respiratória.	
<i>Reações adversas</i>	Tontura, sedação, depressão, transtornos comportamentais, prejuízo cognitivo e da concentração, hiperatividade em crianças	BRASIL, 2010a
<i>Apresentações</i>	- Fenobarbital 100 mg/mL solução injetável, - Fenobarbital 100 mg comprimido - Fenobarbital 40 mg/mL solução oral	BRASIL, 2010c
<i>Posologia</i>	- Dose inicial: 50 mg/dia - Escalonamento: 50 mg/dia/semana - Dose máxima: 300 mg/dia - Intervalo de dose: dose única diária	BRASIL, 2010a

3.2.3 Farmacocinética

O fármaco fenobarbital pode ser encontrado aproximadamente 45 a 60% ligado às proteínas plasmáticas e é apenas parcialmente metabolizado pelo fígado. Aproximadamente 25% da dose é excretada inalterada na urina, com pH urinário normal. A meia-vida plasmática é de aproximadamente 75 a 120 horas em adultos, é mais prolongada em recém-nascidos e mais curta (21 a 75 horas) em crianças. A concentração sérica efetiva de fenobarbital para tratamento de crises epilépticas em neonatos encontra-se entre 10 e 30 mg/l (TOUW et al., 2000). Concentrações máximas são alcançadas em aproximadamente 2 horas após a administração de doses orais e em 4 horas após via intramuscular (SWEETMAN, 2007).

Possui boa biodisponibilidade oral, entretanto, a farmacocinética do fenobarbital é idade dependente, sendo altamente variável na infância (SWEETMAN, 2007; YUKAWA; HIGUCHI; AOYAMA, 1992; VISWANATHAN; BOOKER; WELLING, 1978). Uma mesma dose desse fármaco administrada por via oral nas mesmas condições pode produzir níveis plasmáticos bastante diferentes na população pediátrica (DJABRI; GUY; DELGADO-CHARRO, 2012). Há, nesse caso, redução da biodisponibilidade, podendo apresentar uma diferença de até 60% quando comparado a uma via de administração parenteral (TOUW et al., 2000; YUKAWA et al., 2011). Além disso, a estreita margem terapêutica desse antiepiléptico é um dos fatores agravantes para o tratamento das crises, já que uma dose habitual pode elevar suas concentrações plasmáticas em níveis tóxicos.

Em recém-nascidos, poderá haver uma absorção tardia e incompleta de fenobarbital por via oral quando comparados com a administração intramuscular (JALLING, 1975). Em

estudos recentes, mostrou-se que a biodisponibilidade relativa da administração oral comparada à via retal foi de 48,3% (YUKAWA et al., 2011).

3.2.4 Especialidades farmacêuticas disponíveis

No Brasil, vários laboratórios farmacêuticos fabricam o fenobarbital em três únicas formas farmacêuticas disponíveis no mercado: comprimido (50 e 100 mg), solução oral (40 mg/mL) e solução injetável (100 mg/mL). Na Inglaterra, comprimidos de liberação imediata de fenobarbital estão disponíveis nas dosagens de 30 e 60 mg (MEDICINES, 2013). O Quadro 3 demonstra a situação atual de registro de especialidades farmacêuticas e denominações comerciais segundo a ANVISA.

Quadro 3: Situação atual das especialidades farmacêuticas e denominações comerciais disponíveis para fenobarbital e para sua forma sódica no Brasil (registros ativos em 21.03.2013) (ANVISA, 2013).

Especialidade farmacêutica (registro ativo)	Fenobarbital	Fenobarbital sódico
Comprimido simples 100 mg	76	-
Comprimido simples 50 mg	13	-
Solução oral 40 mg/mL	33	-
Solução injetável 100 mg/mL c/ 2 mL	-	23
Solução injetável 100 mg/mL c/ 1 mL	-	1
Total de especialidades farmacêuticas com registro ativo	122	24
Número de denominações registradas	31	9
Genéricos	16	3
Similares	14	6
Referência	1	-
Laboratórios produtores	12	8
Privados	6	6
Laboratórios Farmacêuticos Oficiais/Públicos	6	2

3.2.5 Formulações em desenvolvimento

Na literatura, há diversos trabalhos descrevendo o estudo de formulações alternativas àquelas disponíveis no mercado para o fármaco fenobarbital. As preparações orais na forma de solução oral contém, muitas vezes, um teor de etanol que pode por em risco pacientes pediátricos, podendo provocar danos e efeitos no Sistema Nervoso Central. Muitas destas

soluções orais informaram em suas bulas que a utilização em recém-nascidos é contraindicada. Recentemente, estudos foram conduzidos na tentativa de melhorar a biodisponibilidade oral do fenobarbital com o uso de uma microemulsão. No entanto, algumas das formulações ainda continham etanol em concentrações de até 35% (MONTEAGUDO et al., 2013).

Entre as formulações encontradas na literatura, podem ser citados: supositórios com 200 mg de fenobarbital (MOOLENAAR; KONING; HUIZINGA, 1979); suspensão oral extemporânea obtida a partir de comprimidos (MORANTES et al., 2010); suspensão oral 20 mg/mL em veículo contendo monoglicerídeos acetilados (YSKA et al., 2000); solução oral 4 mg/mL álcool-*free* a partir de propilenoglicol, glicerina e xarope simples (JELVEGHARI; NOKHODCHI, 2008); filmes mucoadesivos (YELLANKI; JAGTAP; MASAREDDY, 2011); formulação baseada na combinação de um supositório e uma cápsula gelatinosa contendo 40 mg do fármaco (LAKI et. al, 2005); hidrogel e emulsão para uso transdérmico (ODRIA et al., 2005). Há ainda estudos com novos sistemas de liberação de fármacos, como a permeação transdérmica de fenobarbital com o uso da iontoforese (DJABRI; GUY; DELGADO-CHARRO, 2012).

3.3. VIA DE ADMINISTRAÇÃO TRANSDÉRMICA

3.3.1 Importância

A utilização da via transdérmica oferece vantagens em diversas circunstâncias quando comparada às outras vias de administração: evita as adversidades da via oral, como o metabolismo de primeira passagem e a absorção errática no trato gastrointestinal; oferece vantagem sobre a via intravenosa e intramuscular por ser indolor e não invasiva e a facilidade de aplicação, aumentando a adesão do paciente à terapia (SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2010).

A pele é composta pelas camadas epiderme, derme e hipoderme (tecido conjuntivo frouxo ou adiposo), que funcionam como barreiras para a permeação transdérmica de fármacos (Figura 2). A epiderme possui camadas de estrato córneo (composto por células mortas queratinizadas - os corneócitos) e compõe, muitas vezes, o fator limitante para a permeação transdérmica de diversos fármacos. Estes podem penetrar a epiderme através de três vias principais (Figura 3): via intercelular - o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica; via transcelular: o fármaco passa diretamente através da camada córnea e da matriz lipídica intercelular

intermediária; via apêndices: podem ser absorvidos pelo folículo piloso, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

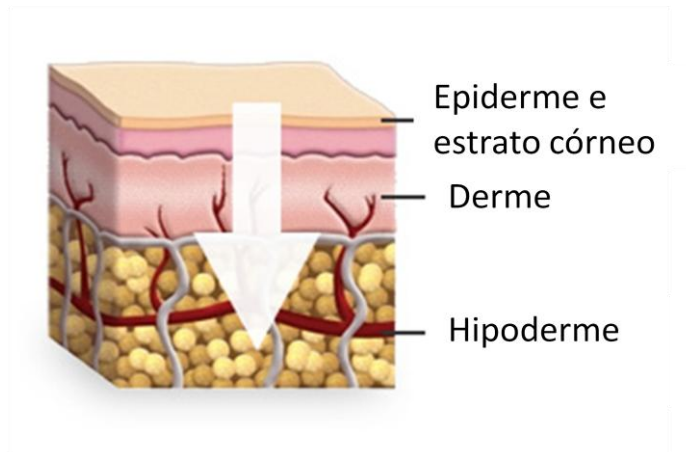


Figura 2: Barreiras para a permeação transdérmica de fármacos. Adaptado de: Wellsprings, 2013.

De modo geral, na administração transdérmica, a penetração cutânea de fármacos é limitada, tendo em vista a pele ser importante barreira biológica que deixa penetrar apenas algumas substâncias em determinadas condições (OLIVEIRA et al., 2004). O desenvolvimento de formulações que garantam uma penetração eficiente através do estrato córneo e que possibilitem a utilização da via transdérmica é fundamental (SILVA et al., 2010), tendo em vista a potencial utilização do antiepiléptico fenobarbital para uso transdérmico, especialmente na pediatria (DJABRI; GUY; DELGADO-CHARRO, 2012).

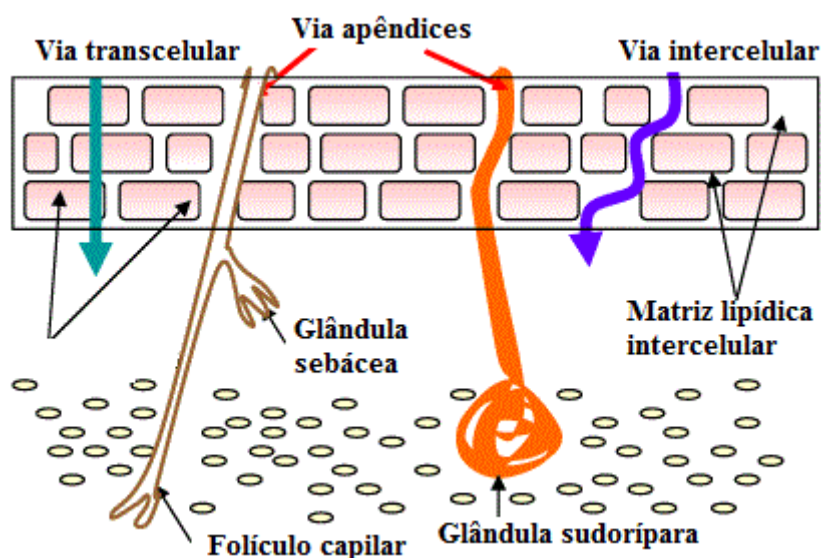


Figura 3: Vias de penetração cutânea de fármacos. Adaptado de: Holmgaard; Nielsen, 2009.

Considerando a importância da manutenção dos níveis plasmáticos do fenobarbital dentro de uma faixa segura e o fato de que há evidências científicas das quais ele é capaz de permear através das camadas da pele de humanos e animais (BONINA et al., 1993; ODRIA et al., 2005), há a necessidade da pesquisa de uma nova formulação que servirá de base para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica para aplicação transdérmica.

3.3.2 Estudos de fármacos para a via transdérmica

Fármacos psicoativos vêm sendo estudados para a administração via transdérmica, como o fentanil transdérmico, que se mostra como uma alternativa terapêutica tão eficaz quanto a morfina oral (LECUE et al., 2001). Além disso, a via transdérmica é eficaz na terapia de reposição hormonal, como o gel transdérmico de estradiol (CALLEJON et al., 2009) e gel e adesivos para reposição de testosterona (GEBARA et al., 2002). Outras preparações vêm sendo estudadas para outras condições, como: preparações transdérmicas de fentanil, clonidina e cetamina isoladamente ou em associação para o alívio da dor lombar crônica (LAURETTI et al., 2009); nitroglicerina transdérmica na inibição do parto prematuro (AMORIM et al., 2009); nicotina transdérmica para tratamento antitabagismo (WANNMACHER, 2007). Apesar de um grande número de formulações que vêm sendo estudadas, muitas dessas preparações estão em fase pré-clínica/clínica e/ou não estão ainda disponíveis no Brasil para comercialização.

3.4. MICROEMULSÕES

3.4.1 Características especiais

As microemulsões são sistemas reservatórios, nos quais a fase interna constitui um microambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades (OLIVEIRA et al., 2004). São geralmente caracterizadas como agregados esféricos e com diâmetros menores que 1400 Å, tipicamente da ordem de 100 Å (YACUBIAN, 2002). Podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, de dois líquidos imiscíveis, (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos (com ou sem cotensoativos), localizados na interface óleo/água (LAWRENCE, 1994).

As microemulsões diferem das emulsões convencionais por características básicas, as quais estão presentes na Tabela 1. As microemulsões possuem tensão interfacial muito baixa quando comparada à uma emulsão, podendo levar à formação espontânea daquelas e,

consequentemente, a um tamanho nanométrico das suas gotículas (DAMASCENO et al., 2011).

Além disso, a emulsão é termodinamicamente instável e pode eventualmente separar fases. Outra importante diferença está na aparência; emulsões são turvas enquanto microemulsões são transparentes ou translúcidas. Além do mais, quanto ao método de preparação, enquanto emulsões requerem grandes depósitos de energia, microemulsões podem ser preparadas a frio e com leve agitação. Isto pode ser de grande importância levando em consideração o custo de produção desses dois tipos de sistemas (LAWRENCE; REES, 2000; KLEIN, 2007).

Tabela 1: Principais comparações entre emulsões convencionais e microemulsões (DAMASCENO et al., 2011).

Parâmetros	Emulsão	Microemulsão
Tamanho das gotículas dispersas	1 – 10 μm	10 – 300 nm
Aparência	Turva e leitosa	Transparente e translúcida
Estabilidade	Termodinamicamente instável	Termodinamicamente estável
Tensão interfacial	Alta	Muito baixa
Quantidade de tensoativo	Baixa	Alta

Os tensoativos têm importante papel na formação das microemulsões: diminuem a tensão interfacial para valores mais baixos do que nas emulsões convencionais; além disso, a posição geométrica dos tensoativos na interface pode ser outro fator de influência a ser considerado em termos de seus efeitos na formação das micelas; a adição de um cotensoativo é capaz de reduzir a energia livre na interface e a tensão através da penetração na interface do tensoativo; os cotensoativos atuam ainda modificando o valor do EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) do sistema de tensoativo para um valor ótimo e adequado para a formulação dos sistemas microemulsionados (HO; HSIAU; SHEU, 1996).

As microemulsões podem ser classificadas em óleo em água (O/A), em que a fase contínua ou externa é constituída por água e as gotículas de óleo constituem a fase interna, ou água em óleo (A/O), com fase externa oleosa e fase interna composta por gotículas de água e podem ser formadas ainda formar as estruturas bicontínuas, quando as concentrações de fase aquosa e fase oleosa são similares (Figura 4) (ARAÚJO, 2009).

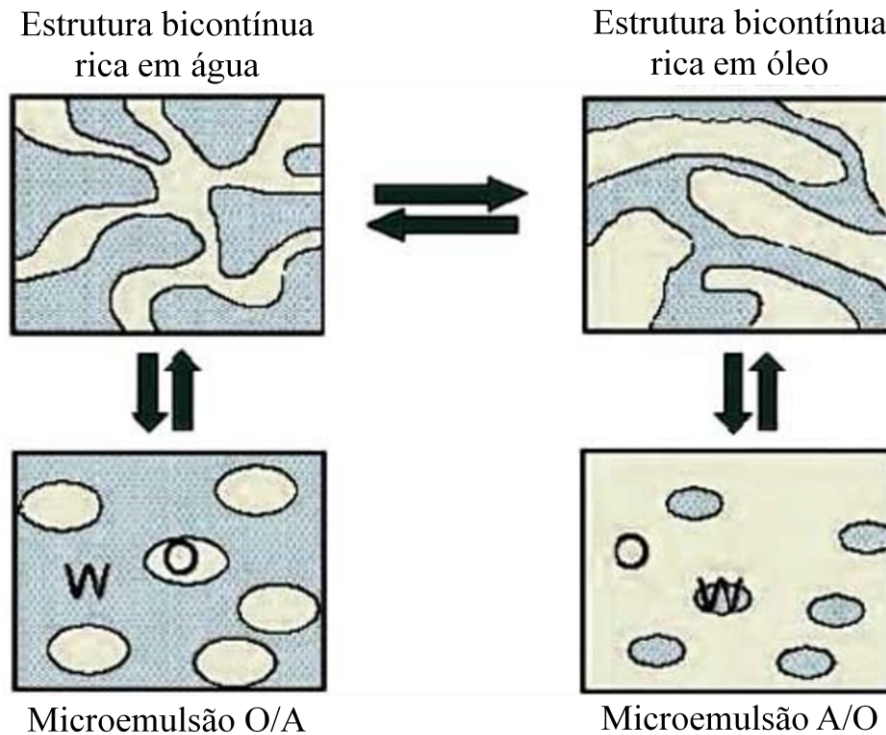


Figura 4: Representação esquemática de micelas de microemulsões água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) e estruturas bicontínuas. W: água. (MEHTA; KAUR, 2010).

O desenvolvimento e composição de um sistema microemulsionado, constituído de óleo, água e tensoativo, pode ser representado por um diagrama de fase ternário em que, em cada vértice do diagrama representa 100% de um dos seus componentes (Figura 5). Com a adição de um cotensoativo, pode ser construído um diagrama de fase pseudoternário, com um dos vértices representando uma mistura binária de dois destes componentes. O diagrama é construído através da preparação de uma série de misturas binárias e a titulação com um terceiro componente, obtendo as regiões de microemulsão (LAWRENCE; REES, 2000; KLEIN, 2007). Na Figura 5, o ponto destacado no diagrama é de uma preparação com composição de 40% de fase aquosa, 30% de fase oleosa e 30% de tensoativo.

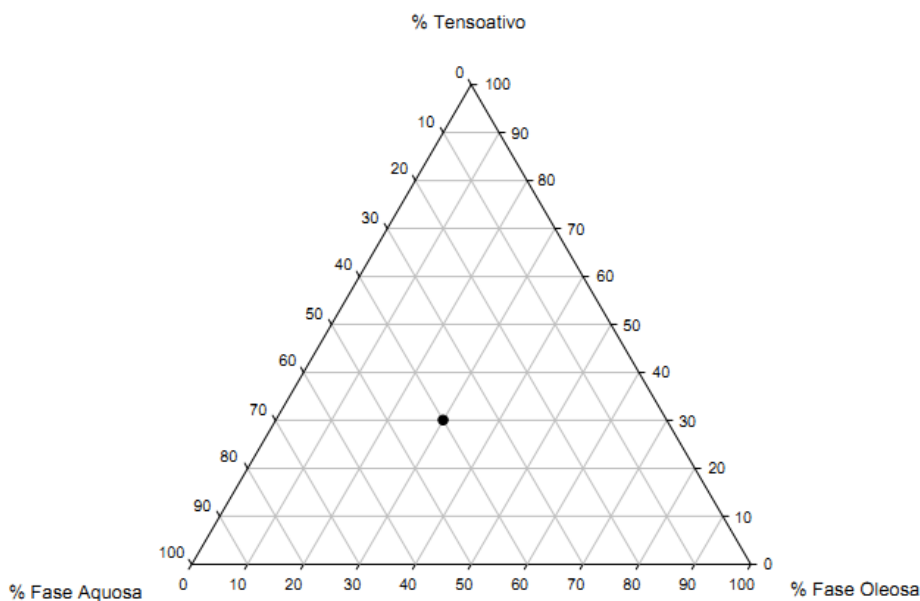


Figura 5: Representação esquemática de um diagrama de fases ternário (KLEIN, 2007).

O estudo de novos sistemas de liberação de fármacos como as microemulsões tem sido muito relevante na área farmacêutica, já que podem proporcionar alternativas terapêuticas modernas, farmacologicamente mais eficientes e com redução de efeitos adversos, permitindo a incorporação de fármacos já existentes, muitas vezes pouco utilizados em razão de sua potencial toxicidade (OLIVEIRA et al., 2004).

3.4.2 Estudos farmacológicos de fármacos em microemulsões

Recentemente, uma grande atenção tem sido dada para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos utilizando microemulsões lipídicas como agentes carreadores de fármacos com baixa solubilidade aquosa, como o fenobarbital (ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011). A taxa de penetração de uma droga na pele pode ser aumentada pela utilização de promotores de permeação (WILLIAMS; BARRY, 2004) e as microemulsões são conhecidas por aumentarem a disponibilização de certos fármacos para as camadas mais profundas da pele. Há exemplos na literatura do desenvolvimento de microemulsões contendo psicofármacos, como o lorazepam, clonazepam e buspirona, que apresentaram boas características para aplicação transdérmica (PUGLIA et al., 2001; ZHAO, 2006).

Medicamentos desenvolvidos no campo das microemulsões têm permitido a ampliação das possibilidades terapêuticas de fármacos potencialmente tóxicos, como a doxorrubicina e a ciclosporina (OLIVEIRA et al., 2004). Vários ensaios farmacológicos vêm sendo desenvolvidos para avaliar o efeito sistêmico de drogas administradas de forma

transdérmica veiculadas em microemulsões (WANG et al., 2012; ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011; HE; WANG; ZANG, 2003) em diversos modelos experimentais *in vivo*, como coelhos, ratos e humanos (KREILGAARD, 2002). Fármacos antiepilépticos em microemulsão vêm sendo estudados, como as microemulsões orais de fenitoína (SAVIO et al., 1994) e carbamazepina (KOGAN; ASERIN; GARTI, 2007).

3.4.3 Permeação transdérmica de microemulsões

Como um agente promotor de permeação transdérmica para muitos fármacos, as microemulsões desempenham um importante papel nessa via, além de possuírem vantagens como a facilidade de incorporação de fármacos tanto hidrossolúveis como lipossolúveis, a boa estabilidade e a possibilidade de ser um ótimo promotor de permeação, seja ela transdérmica ou intestinal. Elas são capazes de proteger fármacos contra hidrólise enzimática, controlar a liberação, aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos e reduzir variações de absorção entre pacientes, bem como aumentar o potencial de absorção devido a mudanças na permeabilidade (em diferentes membranas biológicas, como a intestinal e pele) induzidas pelo tensoativo (KLEIN, 2007).

Como um fator importante para a permeação transdérmica, o fármaco necessita ser liberado da formulação. A liberação de fármacos a partir de sistemas microemulsionados pode ser avaliada através do modelo de Franz (Figura 6), a partir de células de difusão contendo um compartimento doador, no qual a amostra é colocada, e a cinética de liberação do fármaco através de uma membrana sintética é avaliada. A amostragem em tempos determinados é realizada através de um braço lateral e realiza-se, dessa forma, a determinação do fármaco disponibilizado no compartimento receptor, o qual contém a solução receptora que satisfaz as condições *sink* (condição que estabelece uma concentração máxima de 10% da solubilidade do fármaco no meio receptor) (SILVA et al., 2010; KLOSE; DELPLACE; SIEPMANN, 2011). A quantidade liberada de fármaco é correlacionada com o tempo, estabelecendo o fluxo em $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$.

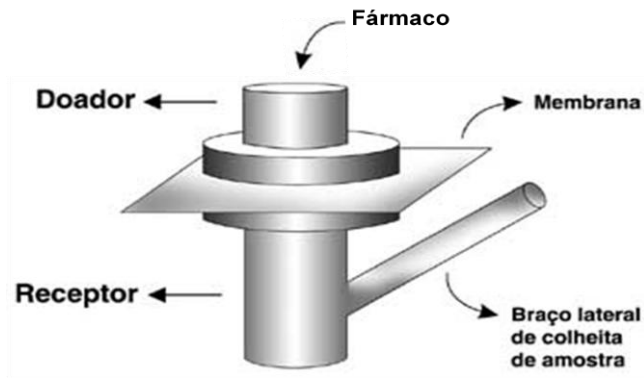


Figura 6: Célula de difusão segundo modelo de Franz. Adaptado de: Simões, 2001.

As microemulsões atuam como promotores de permeação de vários fármacos devido a seu reduzido tamanho das gotículas formadas, bem como ao seu alto conteúdo de tensoativo que promove a desorganização dos lipídeos da pele (SILVA et al., 2010). Esses tensoativos permitem a interação com o estrato córneo através da desestruturação da bicamada lipídica e a permeabilidade dos fármacos é, dessa forma, facilitada (Figura 7) (DAMASCENO et al., 2011).

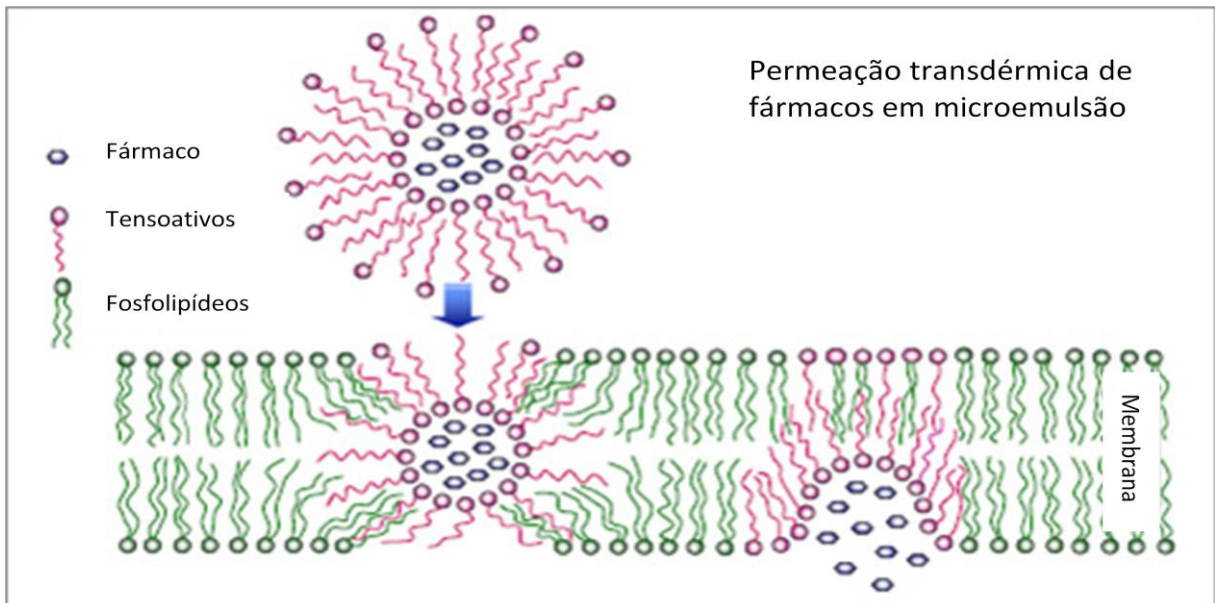


Figura 7: Ilustração da permeação transdérmica de fármacos em microemulsões. Adaptado de: Lynk Biotech, 2013.

Na administração transdérmica, a escolha de um veículo apropriado é de grande importância para maximizar a permeação de fármacos através da pele para a circulação sistêmica (ZHAO et al., 2006). A aplicação de microemulsões como sistemas capazes de modular a liberação transdérmica de fármacos e o potencial dessa utilização tem sido discutida por vários autores (YUAN et al., 2006; TSAI et al., 2011).

4. CAPÍTULO I

OBTENÇÃO, DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMETRICA UV/VIS E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE FENOBARBITAL EM MICROEMULSÃO

(Artigo a ser submetido ao periódico *AAPS PharmSciTech* - Qualis B2, Fator de Impacto

JCR 2011 = 1,432)

**OBTENÇÃO, DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMETRICA UV E CINÉTICA DE
LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE FENOBARBITAL EM MICROEMULSÃO**

Kayo Alves Figueiredo*, Rivelilson Mendes de Freitas, André Luis Menezes Carvalho

Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Campus
Universitário Ministro Petrônio Portela, 64049-550, Teresina-PI, Brasil

Jamilly Kelly Oliveira Neves, José Aleksandro da Silva

Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Rua Juvêncio Arruda, s/n,
58109-790, Campina Grande – PB, Brasil

***E-mail:** kayo.figueiredo@hotmail.com

RESUMO

Diversas estratégias tecnológicas têm sido desenvolvidas para otimizar a terapêutica de diversos fármacos antiepiléticos. As microemulsões são sistemas coloidais que podem ser utilizados como alternativas pela via transdérmica e evitar as adversidades da via oral. O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar uma microemulsão contendo fenobarbital (FEN). O FEN foi incorporado na proporção de 5% e 10% em um sistema microemulsionado composto por labrasol[®], etanol, miristato de isopropila e água purificada. Foi realizada a caracterização físico-química e avaliada a estabilidade preliminar da microemulsão. Desenvolveu-se um método analítico com leituras espectrofotométricas na região do UV $\lambda = 242$ nm. Foi avaliada a cinética de liberação *in vitro* (em modelo de Franz) da microemulsão e, de forma comparativa, da emulsão contendo fenobarbital. A incorporação do fenobarbital no sistema microemulsionado nas concentrações de 5 e 10% não alterou o pH e a resistência à centrifugação. Houve aumento do tamanho da partícula, redução da condutividade e alteração do índice de refração em relação à microemulsão placebo. A microemulsão manteve-se estável físico-quimicamente por 30 dias à temperatura ambiente e quando foi submetida ao teste de estresse térmico e teste de ciclo gelo-desgelo. O método analítico demonstrou ser específico, linear, preciso quanto a repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, exato e robusto. No estudo de cinética de liberação *in vitro*, a microemulsão obteve um perfil de liberação *in vitro* superior a emulsão contendo fenobarbital. Desta forma, a microemulsão obtida tem potencial para uma futura aplicação transdérmica, podendo compor um sistema de liberação de fármacos para tratamento da epilepsia.

Palavras-chave: Caracterização físico-química; Liberação *in vitro*; Fenobarbital; Nanotecnologia.

ABSTRACT

Several technological strategies have been developed to optimize the treatment of various antiepileptic drugs. Microemulsions are colloidal systems that may be used as an alternative transdermal administration and to avoid adversities of the oral route. The aim of this study was to obtain and characterize a microemulsion containing phenobarbital (FEN). FEN was incorporated in the proportion of 5% e 10% in microemulsion system, which consists in labrasol ®, ethanol, isopropyl myristate and purified water. Was performed physicochemical characterization and evaluated the preliminary stability of the microemulsion. Developed an analytical method with spectrophotometric readings in the UV region $\lambda = 242$ nm. We evaluated the *in vitro* release kinetics (model of Franz) of the microemulsion and, comparatively, of the emulsion containing phenobarbital. The incorporation of phenobarbital in microemulsion system with concentrations of 5 to 10% did not change the pH, and resistance to centrifugation. There was an increase of particle size, reducing the conductivity and refractive index change compared to placebo microemulsion. The microemulsion was stable physicochemically for 30 days at room temperature and when it was subjected to thermal stress test and cycle test freeze-thaw. The analytical method proved to be specific, linear, precision as repeatability, intermediate precision and reproducibility, accurate and robust. In studies of the *in vitro* release kinetics, microemulsion obtained a release profile *in vitro* better than emulsion containing phenobarbital. Thus, the microemulsion obtained has potential for future transdermal application, being able to compose a system for drug delivery for treatment of epilepsy.

Keywords: Physico-chemical characterization; *In vitro* release; Phenobarbital; Nanotechnology.

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo são portadoras de epilepsia (GOMES et al., 2002), podendo afetar aproximadamente 1,5% da população (MAJORES et al., 2004). É um dos distúrbios neurológicos graves mais comuns em todo o mundo, o qual pode ser controlado com sucesso com um único antiepiléptico. Crises epiléticas não controladas podem resultar em ferimentos, constrangimento, ansiedade, imprevisibilidade e ocasionalmente induzir ao óbito (DALMORA et al., 2010).

O fenobarbital (FEN) é um barbitúrico que atua como um depressor do Sistema Nervoso Central não seletivo, e é amplamente utilizado como droga antiepiléptica, sendo um fármaco completo e bastante efetivo e possui vantagens como baixo custo, amplo espectro de ação e facilidade de uso (DALMORA et al., 2010). É um fármaco centenário e é ainda o tratamento farmacológico da epilepsia com maior relação custo-benefício, principalmente para os países em desenvolvimento (BRODIE; KWAN, 2012).

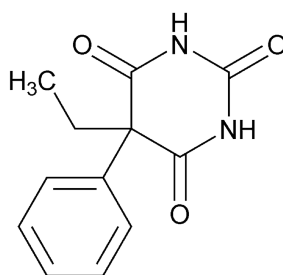


Figura 8: Estrutura química do antiepiléptico FEN (USP, 2013).

Estudos têm demonstrado que a farmacocinética do FEN em crianças e adultos jovens é idade-dependente, podendo apresentar uma biodisponibilidade absoluta de 48,9% na população pediátrica (MARSOT et al., 2013; YUKAWA; HIGUCHI; AOYAMA, 1992). Além disso, em recém-nascidos, comparando-se a administração oral com a via intramuscular, há uma diferença de cerca de 60% em termos de biodisponibilidade (YUKAWA et al., 2011). Os recém-nascidos apresentam absorção tardia e incompleta de FEN por via oral quando comparados com a administração intramuscular (JALLING, 1975). Além disso, a estreita margem terapêutica desse anticonvulsivante é um dos fatores agravantes para o tratamento de crises epiléticas, uma vez que doses habituais podem levar suas concentrações plasmáticas em níveis tóxicos.

Recentemente, uma grande atenção tem sido dada para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos utilizando microemulsões lipídicas como agentes carreadores de fármacos com baixa solubilidade aquosa, como o fenobarbital (ÜSTÜNDAĞ OKUR et al.,

2011). A taxa de penetração de uma droga na pele pode ser aumentada pela utilização de promotores de permeação (WILLIAMS; BARRY, 2004) e as microemulsões são conhecidas por aumentarem a disponibilização de certos fármacos para as camadas mais profundas da pele.

As microemulsões são sistemas nos quais a fase interna constitui um microambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades (OLIVEIRA et al., 2004). São geralmente caracterizadas como agregados esféricos e com diâmetros menores que 1400 Å, tipicamente da ordem de 100 Å (YACUBIAN, 2002). Podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, de dois líquidos imiscíveis, (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos (com ou sem co-tensoativos), localizados na interface óleo/água (LAWRENCE, 1994; ÜSTÜNDAĞ OKUR et. al, 2011).

Na literatura são descritos diversos métodos de quantificação de FEN, como a titulometria (BRASIL, 2010), a espectrofotometria (BOERIS; LUCO; OLSINA, 2000), a cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (DALMORA et al., 2010; BRASIL, 2010), os imunoenaios (SPIEHLER et al., 1976; PASTORE; OFUCHI; NISHIYAMA, 2007) e em formulações farmacêuticas diversas, como solução oral (YSKA et al., 2000) e comprimidos (GOICOECHEA; OLIVIERI, 1998). Faz-se necessário, assim, o desenvolvimento de um método analítico de determinação de fenobarbital em microemulsão.

A maioria das publicações de quantificação de FEN utiliza amostras biológicas e, geralmente, são quantificações simultâneas com fármacos estruturalmente similares (BOERIS; LUCO; OLSINA, 2000) e/ou metabólitos (ROMER; DONARUMA; ZUMAN, 1977) em sangue. A Farmacopéia Brasileira descreve um método analítico por espectrofotometria de determinação do fármaco em solução, o qual preconiza a solubilização do fármaco em tampão borato pH 9,6 (BRASIL, 2010).

Sabendo-se que as microemulsões são conhecidas por aumentarem a disponibilização de certos fármacos para as camadas mais profundas da pele e que o FEN é um fármaco candidato para permeação transdérmica, o objetivo do trabalho foi obter uma microemulsão contendo FEN para uso transdérmico como uma estratégia para o tratamento da epilepsia. Além disso, analisou-se sua estabilidade preliminar, a caracterização físico-química, foi desenvolvido um método analítico de determinação de FEN em microemulsão e foi realizada a cinética de liberação *in vitro* do FEN em microemulsão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Reagentes e amostras

Foi utilizado FEN matéria-prima como padrão de trabalho (PharmaNostra, lote nº 10083132B, teor 100,18%, Brasil). O labrasol[®] (caprilcaproil macrogol-8 glicérido) foi adquirido na Gattefosse (França). O etanol (EtOH) 99,8 % foi adquirido da Dinâmica (Brasil) e da Vetec (Brasil). O NaOH foi adquirido na Vetec (Brasil). O miristato de isopropila foi adquirido da Synth (Brasil). Obteve-se água purificada através de sistema osmose reversa (Milipore, Alemanha). Foi utilizada uma cera autoemulsionante não iônica (PharmaNostra, Brasil), metilparabeno, propilparabeno e propilenoglicol (Vetec, Brasil).

Equipamentos e condições de análise

Para a determinação do FEN em microemulsão, foi utilizada a técnica de espectrofotometria, utilizando os espectrofotômetros Bioscience (Inglaterra) e Varian (EUA). Todas as análises foram realizadas a 25 °C na faixa de 200 a 400 nm, com cubeta de quartzo de 1 cm. A balança analítica utilizada (Bioprecisa, Brasil), a vidraria e micropipetas utilizadas permitiram a observação de erro de 1%. Utilizou-se agitador magnético para o preparo da microemulsão.

Métodos

Preparo da microemulsão e incorporação do FEN

A microemulsão foi preparada através da mistura a frio de labrasol[®], etanol, miristato de isopropila e água purificada. O fenobarbital foi incorporado a frio nas concentrações de 50 mg/g (ME50) e 100 mg/g (ME100). No preparo da emulsão a 50 mg/g (EM50) e 100 mg/g (EM100), foi utilizada cera autoemulsionante não iônica, metilparabeno, propilparabeno, propilenoglicol e água purificada.

Caracterização físico-química

Em todos os ensaios de caracterização realizados, foi utilizada a média±desvio padrão das amostras em triplicata, nas microemulsões placebo e com 5 e 10% do fármaco incorporado.

Capacidade de solubilização

De modo a avaliar a capacidade máxima de solubilização do FEN em microemulsão, procedeu-se ao ensaio de solubilidade, conforme metodologia adaptada de Üstündağ Okur et al (2011). Adicionou-se um excesso de FEN em tubo de ensaio contendo 3 mL de microemulsão (n=3). Cada tubo foi agitado a 100 rpm durante 72 h a 37 ± 2 °C. Posteriormente, centrifugou-se por 30 min a 3000 rpm. Filtrou-se a amostra, transferindo-se, em seguida, alíquotas do filtrado para balão volumétrico, completando-se com uma mistura de EtOH:NaOH (pH 13, 0,1 M) (50:50, v/v) (BOERIS; LUCO; OLSINA, 2000). As leituras foram realizadas em UV $\lambda=242$ nm.

Resistência à centrifugação

Amostras de cada formulação foram submetidas à centrifugação durante 30 min a 3000 rpm. Na sequência, foi observada a ocorrência ou não de separação de fases ou de qualquer indício de instabilidade.

pH, condutividade e índice de refração

O pH da microemulsão foi avaliado utilizando-se um potenciômetro digital (Bel Engineering, Itália) com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. O eletrodo de vidro foi introduzido diretamente no interior da formulação. A condutividade foi determinada em aparelho condutivímetro (Marte, Brasil). O índice de refração foi determinado utilizando-se um aparelho refratômetro (Quimis, Brasil), aferido com água purificada. As leituras foram realizadas à temperatura de 25 ± 2 °C.

Viscosidade

A viscosidade das formulações foi avaliada em viscosímetro digital rotativo (Quimis, Brasil). A curva de viscosidade foi construída através de variações na velocidade de rotação entre 6 e 60 rpm, com o uso dos spindles nº 4 (microemulsão) e nº 1 (emulsão convencional).

Tamanho de partícula e índice de polispersão (IPD)

A análise do tamanho das gotículas nanométricas foi determinada através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, também denominada espectroscopia de correlação de fótons (PCS), cuja técnica fornece o raio hidrodinâmico das partículas coloidais (Malvern, Inglaterra). A temperatura do sistema foi mantida a 25 °C e foram calculados o diâmetro das gotículas (nm) e o IPD (n = 3).

Estabilidade preliminar

O estudo de estabilidade preliminar foi realizado por meio da análise dos seguintes parâmetros: teor, características organolépticas, pH e condutividade elétrica. Na análise organoléptica das formulações, foram observados o seu aspecto, cor, homogeneidade e processos de instabilidade como cremeação e separação de fase. Os parâmetros foram analisados no início dos estudos e logo em seguida aos testes de estresse térmico, ciclo gelo-degelo e aos 30 dias em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

As amostras para o estresse térmico foram submetidas às temperaturas no intervalo entre $40\text{-}80^\circ\text{C}$, com progressão de elevação de $10^\circ\text{C}/30\text{minutos}$ em banho-maria termostaticado (Nova ética, Brasil). As formulações foram avaliadas ao término de 80°C , após as preparações retornarem à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (BABY et al., 2008).

As preparações para o ciclo gelo-degelo foram submetidas a $-5^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ em refrigerador (Electrolux, Brasil), por 24h, e $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por 24h, em estufa (Icamo, Brasil), completando um ciclo. Ao final de 12 dias (6 ciclos) as formulações foram analisadas após retornarem à temperatura ambiente (25°C) (BRASIL, 2004).

Foram avaliadas as formulações de microemulsão sem e com fenobarbital a 5 e 10%, além do estudo comparativo com a emulsão convencional, segundo descrição das formulações na Tabela 2.

Tabela 2: Descrição das formulações utilizadas no estudo de estabilidade preliminar.

Componentes	Formulação (% p/p)					
	ME	ME50	ME100	EM	EM50	EM100
Labrasol[®]	66,64	66,64	66,64	-	-	-
Etanol	16,56	16,56	16,56	-	-	-
Miristato de isopropila	9,3	9,3	9,3	-	-	-
Cera autoemulsionante não-iônica	-	-	-	12	12	12
Metilparabeno	-	-	-	0,1	0,1	0,1
Propilparabeno	-	-	-	0,01	0,01	0,01
Propilenoglicol	-	-	-	2	2	2
Água purificada qsp.	100	100	100	100	100	100
Fenobarbital	-	5	10	-	5	10

Legenda: ME – microemulsão; ME50 e ME100 – microemulsão com 5 e 10% de FEN, respectivamente; EM – emulsão; EM50 e EM100 – emulsão com 5 e 10% de FEN, respectivamente.

Validação de método analítico para determinação de FEN em microemulsão

A determinação de FEN em microemulsão seguiu os critérios descritos para a validação de métodos analíticos para fármacos e medicamentos estabelecidos pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH, 1996) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003).

Preparo da solução padrão e das amostras

Para a construção da curva de calibração de FEN, uma solução estoque de FEN foi preparada em balão volumétrico de 50 mL na concentração de 1 mg/mL, utilizando-se como solvente EtOH:NaOH (pH 13, 0,1 M) (50:50, v/v). Na construção da curva, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. No preparo de amostras para análise, pesou-se uma quantidade de microemulsão contendo aproximadamente 5 mg de FEN em balão volumétrico de 10 mL. A amostra foi diluída com solução de EtOH:NaOH, agitando-se manualmente por cerca de 60 s. Em seguida, uma alíquota desta solução foi transferida para outro balão volumétrico de 10 mL, contendo o mesmo solvente.

Realizou-se uma varredura em UV na faixa de 200 – 400 nm com o objetivo de encontrar o comprimento de onda de maior pico de absorção do fármaco em estudo. Todas as leituras realizadas em espectrofotometria na região do UV em 242 nm, utilizando-se solução EtOH:NaOH como branco.

Especificidade e seletividade

Na avaliação da especificidade e seletividade do método para quantificar o FEN em sistema microemulsionado, foram preparadas as seguintes soluções: solução padrão de FEN 12 µg/mL (a); solução de FEN incorporado em microemulsão (b); solução de microemulsão com a mesma concentração da amostra (placebo) (c); sistema solvente EtOH:NaOH (d). Realizou-se uma varredura na faixa de 200–400 nm e os espectros de absorção apresentados pelas curvas a, b, c e d foram comparados.

Linearidade e intervalo do método

A partir da solução estoque de FEN 1 mg/mL, diferentes alíquotas foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e, em seguida, a absorbância foi medida em 242 nm. A linearidade foi avaliada através da construção de três curvas de calibração na faixa de concentração de 1 – 24 µg/mL, sendo utilizadas sete concentrações diferentes. O coeficiente

de correlação foi obtido por meio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Foram calculados os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), conforme RE n° 899/2003 (BRASIL, 2003).

Precisão

Todas as soluções de amostra foram preparadas conforme metodologia descrita anteriormente. A repetibilidade foi avaliada através da média de seis determinações da amostra na concentração de 12 µg/mL. No ensaio de precisão intermediária, foi avaliada a precisão intercorridas através da média de seis determinações da amostra de mesma concentração com um intervalo de 48 horas da repetibilidade e realizada por analista diferente. A precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) foi realizada no mesmo dia e nas mesmas condições de análise em um laboratório B.

Exatidão

A exatidão foi avaliada através da adição de FEN na microemulsão e seu percentual de recuperação em três níveis de concentração distintos e em triplicata: 9,6, 12 e 14,4 µg/mL. Tais concentrações correspondem respectivamente a 80, 100 e 120% do teor da microemulsão com FEN incorporado em relação à amostra utilizada nos demais ensaios. O preparo da amostra foi realizado conforme procedimento descritor anteriormente. A exatidão do método (% de recuperação) foi calculada através da relação entre concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica da amostra, conforme Equação 1:

$$\text{Exatidão} = (\text{concentração média experimental} / \text{concentração teórica}) \times 100 \quad (1)$$

Robustez

A robustez deste método analítico foi avaliada através da mudança nas condições de preparo da amostra quanto ao método de agitação durante seu preparo. A agitação manual foi comparada à agitação magnética, com amostras de mesma concentração e agitadas durante 60 s. A mudança do fabricante do solvente etanol utilizado no preparo do sistema solvente também foi utilizada como outro parâmetro para avaliar a capacidade do método de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos.

De forma a avaliar a estabilidade do analito, amostras de microemulsão foram preparadas para determinação espectrofotométrica conforme procedimento anterior e realizada a leitura em 242 nm nos tempos 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 h. As amostras preparadas foram

divididas em dois grupos: três amostras na presença e outras três na ausência de luz. Foi avaliada a significância da perda de estabilidade da amostra em relação ao tempo 0 h.

Cinética de liberação in vitro de FEN em microemulsão

Determinação da solubilidade de FEN em diferentes meios tampão para definição das condições sink e avaliação de interferência espectrofotométrica

Colocou-se um excesso de FEN em tubo de ensaio contendo 3 mL dos meios tampão (n = 3): tampão fosfato pH 6,8 e 7,4 e tampão borato pH 9,6 e associação destes com etanol - EtOH, laurilsulfato de sódio - LSS ou polissorbatos 80. Procedeu-se conforme metodologia de solubilidade descrita anteriormente. Foram realizadas ainda varreduras espectrofotométricas em UV entre 400 e 200 nm de forma a detectar possíveis interferências espectrofotométricas no comprimento de onda utilizado.

Cinética de liberação in vitro

A cinética de liberação *in vitro* da microemulsão contendo FEN a 5% foi avaliada e comparada a uma emulsão convencional com FEN a 5% (emulsão). O estudo foi conduzido utilizando-se membranas de diálise em células de difusão tipo Franz com área difusional de 1,15 cm² e volume de ± 14mL. O compartimento receptor foi preenchido com tampão borato pH 9,6 associado a 10% de EtOH num sistema composto de quatro células individuais conectado a um banho termostático à 37 ± 0,5 °C sob agitação constante a 100 rpm em agitador magnético por um período de 24 h. As membranas foram colocadas na parte superior da célula receptora e a quantidade de microemulsão ou emulsão contendo 20 mg de FEN foi aplicada no compartimento receptor diretamente sobre a membrana e, posteriormente, o sistema foi fechado. As amostras da solução receptora foram coletadas nos seguintes tempos para o perfil de liberação: 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h. As leituras das alíquotas coletadas foram realizadas em UV $\lambda=242$ nm. O volume total da fase receptora foi substituído a cada amostragem para reposição do meio e manutenção das condições *sink* (CARVALHO et al., 2012).

Análise estatística

Os resultados obtidos na validação do método analítico e estudo de estabilidade foram submetidos ao teste *t* de Student para avaliar possíveis diferenças estatísticas. Para a análise dos dados, foram utilizados os softwares Microsoft Office Excel[®], OriginLab[®] e Graphpad

Prism[®]. A linearidade do método foi submetida à análise de variância (ANOVA). Os resultados do estudo de solubilidade de FEN foram analisados por ANOVA, seguido do Teste de Bonferroni, com significância estatística de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção da microemulsão e caracterização físico-química

Na investigação da solubilidade máxima do FEN em microemulsão, obteve-se o valor de $137,8 \pm 13,7$ mg/mL, resultado bastante superior a resultados publicados recentemente com uma microemulsão oral contendo FEN (MONTEAGUDO et al., 2013). A solubilidade deste fármaco em água é de aproximadamente 1,0 a 1,2 mg/mL. A microemulsão foi tão eficiente em solubilizar o FEN quanto soluções aquosas com alta quantidade de co-solventes, como propilenoglicol a 50% (SHAYANFAR; ACREE JR; JOUYBAN, 2009) e etanol a 80% (ATTWOOD; FLORENCE; ROTHSCHILD, 2003). Dessa forma, foi possível incorporar facilmente o FEN com utilização de agitação branda nas concentrações de 5% e 10%, com a obtenção das formulações ME50 e ME100 avalidas neste trabalho.

Na caracterização físico-química da microemulsão placebo (ME) e das formulações contendo FEN (ME50 e ME100), foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização físico-química de microemulsão placebo e microemulsão contendo FEN 5% ou 10%.

Parâmetro físico-químico	MP	ME50	ME100
Resistência à centrifugação	Sem separação de fases	Sem separação de fases	Sem separação de fases
pH	5,07±0,09	5,14±0,19	5,11±0,05
Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	33,65±1,66	29,7±1,30*	22,35±2,17**
Índice de refração	1,432±0,001	1,380±0,005***	1,442±0,001**
Tamanho de partícula (nm)	15,85±1,67	55,05±1,79***	68,36±3,107***
IPD	0,763±0,20	0,292±0,05*	0,396±0,16

Legenda: ME – microemulsão; ME50 e ME100 – microemulsão com 5 e 10% de FEN, respectivamente; IPD – índice de polidispersão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação à ME. Teste *t* Student.

Ainda na Tabela 3, foi observado que as formulações testadas não apresentaram separação de fases. A aprovação neste teste é um indicativo de estabilidade das preparações avaliadas. A formação de precipitados ou a separação de fases indica a necessidade de reformulação (BRASIL, 2004). Dessa forma, através do teste de resistência à centrifugação,

realizou-se uma análise preliminar da presença de uma possível instabilidade física quando se incorporou o FEN em microemulsão.

As formulações obtidas apresentaram pH compatível com a pele e sem alterações significativas após adição do fármaco (Tabela 3). É recomendado que produtos de permanência prolongada sobre a pele devem apresentar um pH entre 4,0 e 7,0 (REBELLO, 2005), isto é, o pH deve estar próximo à faixa de pH cutâneo, que varia de 4,6 a 5,8 (CAMPOS; FRASSON, 2011; LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

A medida de condutividade é utilizada na tentativa de se classificar o tipo de formulação baseado na distribuição das fases, permitindo a determinação da condutividade dos domínios polares ou apolares (URBAN, 2004). O tensoativo utilizado, labrasol[®], tende a formar microemulsões do tipo O/A devido ao seu valor de EHL ser 14 (ASH; ASH, 2004; LAWRENCE; RESS, 2000), favorecendo a formação de micelas com fase interna oleosa.

Foi observada uma pequena diminuição da condutividade da microemulsão quando se incorporou o fármaco ao sistema. Isto pode caracterizar mudanças estruturais na microemulsão pela incorporação de uma molécula hidrofóbica, tendo em vista que a condutividade de uma microemulsão é muito sensível a mudanças no arranjo das fases de um sistema microemulsionado (MEHTA; KAUR, 2011; MO; ZHONG; ZHONG, 2000). Halle (1990) mostra que um aumento do tamanho das gotículas em uma microemulsão O/A pode influenciar na flutuação das suas cargas e reduzir, dessa forma, a condutividade. Como se observa, há uma relação entre o aumento do tamanho das gotículas e a redução da condutividade do sistema (Tabela 3).

O índice de refração pode ser usado para determinar a pureza de soluções ou as proporções em que certos líquidos são misturados. É a relação da velocidade de propagação da luz no ar e sua velocidade na substância (LONGO, 2006). O índice de refração da formulação ME50 obteve uma redução significativa, ficando mais próximo ao valor da água purificada (1,333) e mais distante do valor do labrasol[®] (1,450 – 1,470) (ASH; ASH, 2004). Já a formulação ME100, obteve um pequeno, porém significativo, aumento no seu valor, podendo já indicar os primeiros sinais de instabilidade quando se aumenta o teor do fármaco na formulação.

O tamanho nanométrico das gotículas de microemulsão foi afetado com a incorporação do fármaco, porém ainda dentro do intervalo de microemulsões, que podem estar entre 10 e 150 nm (SILVA et al., 2009) ou, segundo Damasceno et al. (2011), entre 10 a 300 nm (Tabela 3). O aumento do diâmetro das gotículas pode sugerir a localização do fármaco na camada interfacial de tensoativos, o qual pode diminuir a curvatura da micela e,

dessa forma, alterar o tamanho das gotículas (GOMES, 2010). Já o valor de IPD menor que 0,5 indica homogeneidade do tamanho das gotículas (ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011), o que não ocorreu com a microemulsão placebo. A incorporação do fármaco pode ter auxiliado na uniformização do tamanho das gotículas formadas, podendo, dessa forma, estabilizar a formulação.

Na avaliação da viscosidade com velocidade de rotações entre 6 e 60 rpm, obteve-se a curva de viscosidade para ME, ME50, ME100, EM, EM50 e EM100, conforme Figura 8. A incorporação do FEN não interferiu significativamente nos valores de viscosidade para quaisquer das concentrações testadas. As formulações testadas apresentaram viscosidade com perfil característico de fluidos não-newtonianos, com redução da viscosidade aparente com o aumento da velocidade de rotação (CORRÊA et al., 2005). A viscosidade da microemulsão demonstrou ser aproximadamente 200 vezes inferior à viscosidade da emulsão convencional. Tal parâmetro pode influenciar diretamente no perfil de liberação de fármacos a partir de suas formulações (CHORILLI et al., 2007).

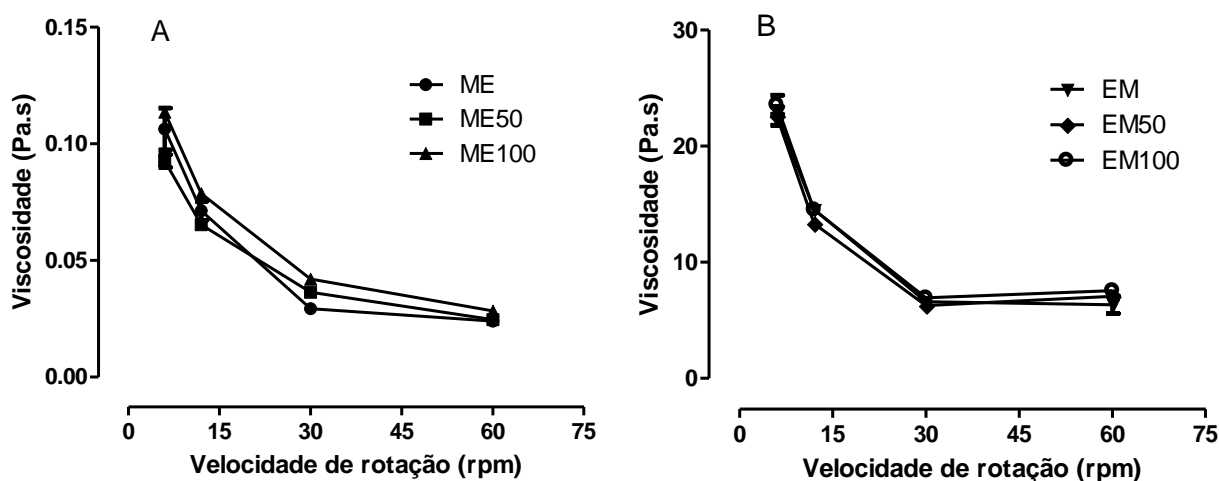


Figura 9: Curva de viscosidade de formulações de microemulsão (A) e emulsão convencional (B). Legenda: ME – microemulsão; ME50 e ME100 – microemulsão com 5 e 10% de FEN, respectivamente; EM – emulsão; EM50 e EM100 – emulsão com 5 e 10% de FEN, respectivamente.

Estabilidade preliminar

Na avaliação da estabilidade preliminar da microemulsão e, comparativamente, da emulsão convencional, foram obtidos os resultados de acordo com a Tabela 4. Em um estudo de estabilidade, importantes informações podem ser obtidas. Sistemas emulsionados, quando armazenados e submetidos a diversos fatores externos, estão sujeitos ao surgimento de sinais

de desestabilização como: cremeação, sedimentação, floculação, coalescência, assim como separação das fases e perda do teor dos princípios ativos da formulação (BABY et al., 2008).

Quando foram armazenadas sob temperatura ambiente durante 30 dias, as formulações com microemulsão não apresentaram alterações significativas nos parâmetros avaliados. Entretanto, as emulsões convencionais apresentaram significativa perda de estabilidade química, com redução do teor do fármaco.

Nos testes de estresse térmico e ciclo gelo-desgelo, algumas discretas alterações nos valores de pH e condutividade foram observadas para a microemulsão, o que pode ser aceitável, considerando as condições extremas de temperatura utilizadas, chegando de -5 a 80°C (BABY et al., 2007). O aumento da condutividade pode estar relacionado com a coalescência; enquanto sua diminuição, com a agregação (BRASIL, 2004). Como se observa ainda, a microemulsão demonstrou estabilidade química perante estes testes, o que não foi o caso das emulsões contendo fenobarbital, com redução do teor do fármaco em até 80% para o estresse térmico e cerca de 10% para T30. Quando submetida ao teste de ciclo gelo-desgelo, as emulsões mantiveram o teor do fármaco, com alterações apenas nos valores de pH e condutividade em EM e EM100 em relação à T0. Além disso, alterações na condutividade, pH e a apresentação de sinais típicos de instabilidade, como separação de fases e cremeação, foram observados para tais formulações no teste de estresse térmico.

Tabela 4: Estabilidade preliminar das formulações testados após 30 dias à temperatura ambiente, estresse térmico e ciclo gelo-desgelo.

Formulação	T0	T30	ESTRESSE TÉRMICO	CICLO GELO- DEGELO
<i>Caracter. organolépticas</i>				
ME	-	Normal	Normal	Normal
ME50	-	Normal	Normal	Normal
ME100	-	Normal	Normal	Normal
EM	-	Normal	Separ. fases e cremeação	Normal
EM50	-	Normal	Separ. fases e cremeação	Normal
EM100	-	Normal	Separ. fases e cremeação	Normal
<i>pH</i>				
ME	5,07±0,09	5,05±0,07	5,3±0,08*	5,14±0,05
ME50	5,14±0,19	5,03±0,03	5,04±0,03	5,06±0,02
ME100	5,11±0,05	4,93±0,10	4,99±0,01*	5,13±0,02
EM	5,64±0,27	5,28±0,17	5,13±0,07*	5,04±0,03*
EM50	5,06±0,04	4,93±0,1	5,14±0,05	4,97±0,08
EM100	4,91±0,18	4,63±0,04	5,21±0,10***	4,57±0,08*
<i>Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)</i>				
ME	33,65±1,66	35,46±0,37	30,44±1,03*	38,54±2,2*
ME50	29,7±1,30	32,13±1,64	27,82±0,67	34,21±0,24**
ME100	22,35±2,17	26,77±2,84	24,48±1,28	28,21±0,8*
EM	35,24±3,71	33,99±2,45	43,61±3,13*	40,17±2,17
EM50	43,87±1,58	42,45±3,83	101,12±6,0***	45,6±3,51
EM100	47,5±2,44	43,06±1,71	140,56±6,7***	54,55±2,91*
<i>Teor (%)</i>				
ME	-	-	-	-
ME50	96,96±1,32	96,21±1,37	95,53±5,45	97,46±1,7
ME100	98,5±2,57	103,9±5,11	98,22±2,08	101,9±4,01
EM	-	-	-	-
EM50	93,5±4,36	83,48±2,33*	32,7±3,43***	87,80±4,87
EM100	103,3±5,53	93,17±1,54*	17,54±3,50***	97,54±4,70

Legenda: T0 - tempo 0; T30 - tempo de 30 dias; ME – microemulsão; ME50 e ME100 – microemulsão com 5 e 10% de FEN, respectivamente; EM – emulsão; EM50 e EM100 – emulsão com 5 e 10% de FEN, respectivamente. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em relação à T0. Teste *t* de Student.

Validação de método analítico para determinação de FEN em microemulsão

Com o objetivo de verificar a especificidade e seletividade do método, foram realizadas varreduras espectrofotométricas na região de UV 200 – 400 nm. Estes parâmetros analisados são importantes na validação de métodos analíticos para descartar interferências de impurezas, excipientes e produtos de degradação na determinação do fármaco na formulação em estudo (STRECK et al., 2011). De acordo com a Figura 10, o método foi capaz de realizar a determinação do fármaco sem interferência significativa dos constituintes da microemulsão na região de UV $\lambda = 242$ nm. Não houve absorvância significativa da amostra placebo (c) em comparação ao solvente utilizado (d).

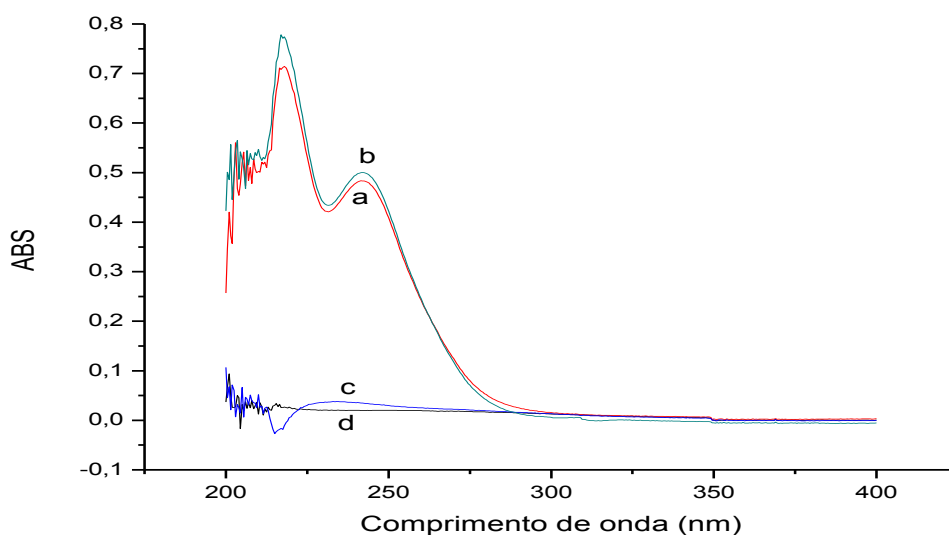


Figura 10: Espectros de absorção de (a) FEN (12 µg/mL), (b) FEN em microemulsão (12 µg/mL), (c) placebo de microemulsão (sistema sem fármaco) e (d) solvente EtOH:NaOH (pH 13, 0,1 M) (50:50, v/v).

Na Tabela 5, observam-se os resultados do estudo da linearidade, precisão, exatidão e robustez do método analítico desenvolvido. Os dados da linearidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a qual demonstrou que a regressão linear foi estatisticamente significativa e sem falta de ajustes ($p < 0,05$) (Tabela 6). Os valores de LD e LQ estão representados na Tabela 5, demonstrando a boa sensibilidade do método.

Tabela 5: Parâmetros obtidos na validação do método analítico de determinação de FEN em microemulsão.

Parâmetros	Resultados experimentais	CV (%)	Valor de p*
Linearidade	1 – 24 µg/mL		
Equação da reta	$y=0,037x - 0,007$		
Coefficiente correlação linear	$r = 0,9996$		
LD	0,409 µg/mL		
LQ	0,619 µg/mL		
Precisão			
Repetibilidade	12,10±0,48 µg/mL	3,94	0,88261
Precisão intermediária	12,05±0,54 µg/mL	4,47	
Reprodutibilidade	Laborat. A: 11,96±0,16 µg/mL	1,32	0,13525
	Laborat. B: 12,11±0,16 µg/mL	1,30	
Exatidão (% Recuperação)			
9,6 µg/mL	100,87±2,12 µg/mL	2,10	
12,0 µg/mL	100,29±0,9 µg/mL	0,9	
14,4 µg/mL	101,18±0,83 µg/mL	0,82	
Robustez			
Método de agitação	Manual: 11,85±0,23 µg/mL	1,97	0,9601
	Magnético: 11,84±0,17 µg/mL	1,45	
Fabricante do solvente	Marca A: 11,89±0,19	1,58	0,28184
	Marca B: 12,07±0,16	1,34	

Legenda: LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação; CV – coeficiente de variação. *Significância estatística quando $p < 0,05$, teste t de Student.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A Tabela 5 demonstra o resultado de seis determinações a 100% da concentração do teste da precisão intracorrída (repetibilidade) e intercorrída (precisão intermediária), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as médias dessas determinações. Além disso, os coeficientes de variação (CV) foram menores do que 5%, conforme exigido pelas normas de validação (ICH, 1996).

Tabela 6: Análise de Variância ANOVA (um critério) e teste de ajuste linear para a linearidade do método.

ANOVA					
Fonte	SQ	GL	MQ	F	F_{crítico}
Modelo	1,789024773	1	1,789024773	9003,14	4,3807
Residual	0,003775513	19	0,000198711	Curva Linear	
Falta de ajuste	0,000766846	5	0,000153369	0,71366	2,9582
Erro puro	0,003008667	14	0,000214905	Não há falta de ajuste	
Total	1,792800286	20	0,089640014		

Legenda: SQ – soma dos quadrados; GL – grau de liberdade; MQ – média dos quadrados.

Quanto à avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade), o método também demonstrou concordância entre os resultados obtidos em diferentes laboratórios, quando comparado às determinações em equipamentos diferentes e com mesmo analista, com $p > 0,05$ (Tabela 5).

A exatidão do método foi avaliada através da média de três determinações a 80% (9,6 µg/mL), 100% (12 µg/mL) e 120% (14,4 µg/mL) da concentração de FEN (Tabela 5). A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação, sendo desejáveis porcentagens próximas a 100% (BRASIL, 2003). Nas três concentrações avaliadas (baixa, média e alta), o método desenvolvido demonstrou uma % de recuperação bem próxima a 100 e com CV menor do que 5%.

Para a validação de um método analítico de determinação de um fármaco em forma farmacêutica, deverá ser avaliada a capacidade deste método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Podem ser avaliados diferentes valores de pH, temperatura e diferentes fabricantes do solvente utilizado, bem como mudanças no preparo da amostra (BRASIL, 2003). O método desenvolvido foi considerado robusto frente a variação dos parâmetros avaliados, com a comparação da agitação manual com a agitação magnética e o uso de etanol de diferentes fabricantes. Não se observou diferenças significativas durante o preparo das amostras, com valores de p de 0,9601 e 0,28184, respectivamente (Tabela 5).

Ainda como parâmetro para a avaliação da robustez do método, demonstrou-se a estabilidade da amostra de FEN em microemulsão a 100% da concentração teste (12 µg/mL) até 2,5 h (Figura 11). Observou-se uma perda significativa de aproximadamente 3,11% de teor de fármaco na presença ($p=0,02858$) e de 3,08% na ausência de luz ($p=0,0260$) quando foram comparados os tempos 0 e 3,5h. Não houve influência da luz na perda de estabilidade da amostra ($p = 0,9189$), comparando-se os tempos 3,5 h nos dois grupos. Dessa forma, recomenda-se a utilização de amostras preparadas até 2 h, tendo em vista que, apesar de não

ser superior a 10%, a perda é significativa. Além disso, a solução de EtOH:NaOH utilizada tende a interferir no método após mais de 2 h de preparo (dados não mostrados).

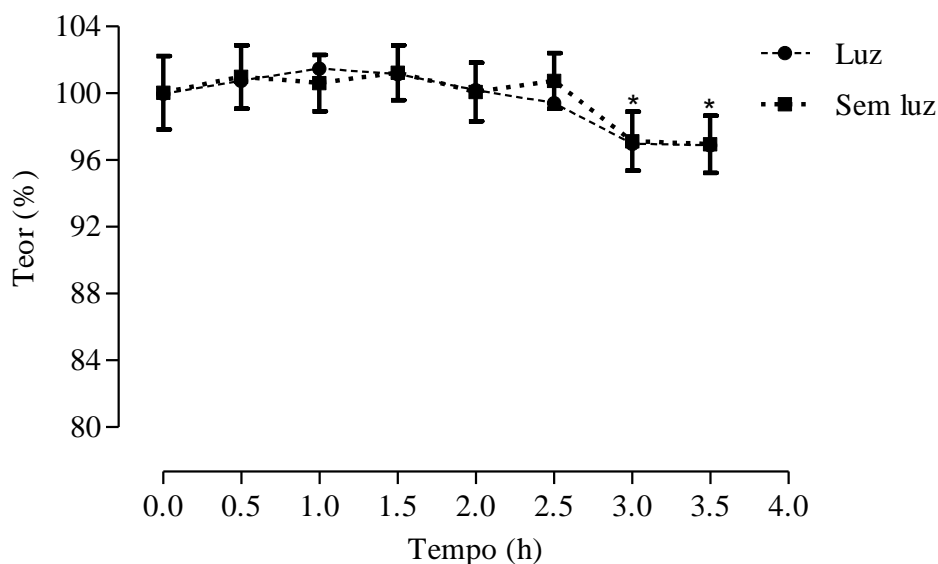


Figura 11: Teor de fenobarbital no estudo de estabilidade de uma mesma amostra analisada de 0–3,5 h na presença e na ausência de luz (n = 3). * $p < 0,05$, em relação ao tempo 0. Teste t paramétrico.

Na literatura são relatados vários métodos de determinação espectrofotométrica de fármacos em microemulsões, como benzinidazol (STRECK et al., 2011), nortriptilina (MORENO et al., 2000), diazepam (DASTIDAR; SA, 2009) e nifedipino (CASTRO; MORENO; ALASTRES, 2001), sendo tão eficazes em determinar fármacos em microemulsões quanto os métodos por CLAE (MORENO et al., 2000). A partir dos resultados obtidos, pode ser demonstrado que o referido método analítico foi desenvolvido e validado, demonstrando ser de fácil execução, de baixo custo, utiliza solventes poucos tóxicos e é aplicável a laboratórios que não dispõem de métodos cromatográficos.

Cinética de liberação *in vitro* de FEN em microemulsão

Determinação da solubilidade de FEN em diferentes meios tampão

Com o objetivo de determinar condição de solubilidade para estabelecimento das condições *sink* (KLOSE; DELPLACE; SIEPMANN, 2011) para o experimento de cinética de liberação *in vitro* de FEN em microemulsão, realizou-se um estudo de solubilidade deste fármaco em diferentes meios tampão e com diferentes valores de pH (Figura 12). A solubilidade do fármaco foi semelhante em todos os meios utilizando o Tampão borato pH 9,6

e bem menor no Tampão fosfato pH 6,8 e 7,4. Os pH básicos facilitam a solubilidade do FEN ($pK_a = 7,3$) devido a sua conversão a uma forma tautomérica ionizada, além de aumentar sua absorvidade molar em relação a pHs mais ácidos (ROMER; DONARUMA; ZUMAN, 1977; JELVEGHARI; NOKHODCHI, 2008). Dessa forma, o tampão borato é adequado para a realização dos estudos de cinética de liberação *in vitro*. Os grupos que apresentaram maior solubilidade em mg/mL foram: tampão borato com 1% de polissorbato 80 ($11,19 \pm 0,12$), tampão borato com 1% de LSS ($11,12 \pm 0,39$), tampão borato com 10% de EtOH e 1% de polissorbato 80 ($11,61 \pm 0,21$).

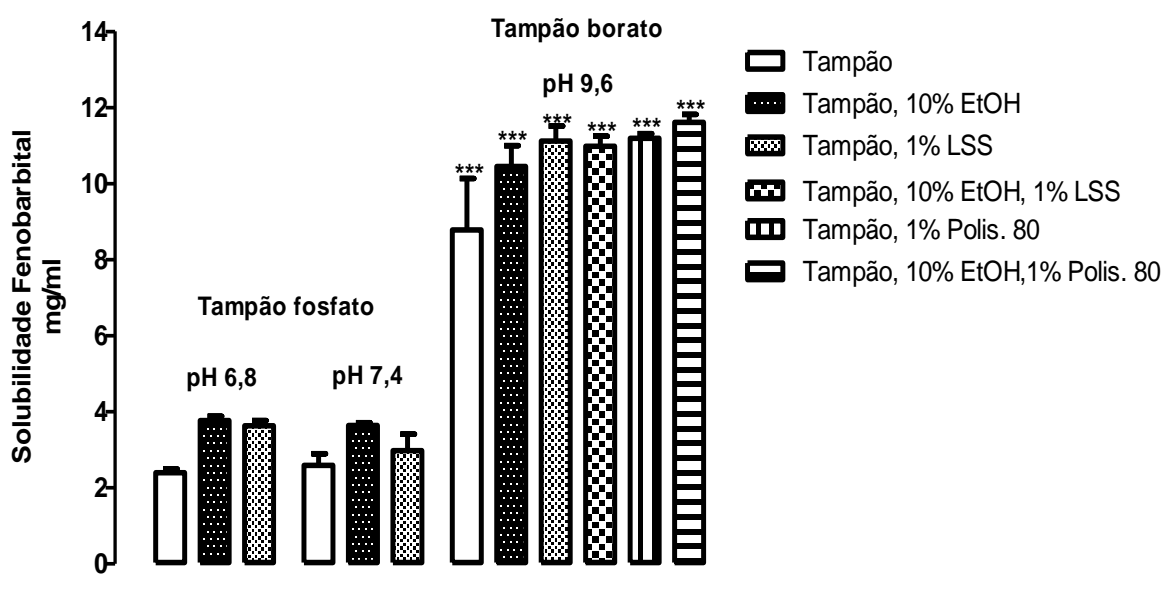


Figura 12: Solubilidade do FEN em diferentes meios tampão (n = 3). *** $p < 0,001$ em relação aos grupos com Tampão fosfato. ANOVA one-way, seguido do teste de Bonferroni.

Adicionalmente, foram realizadas varreduras espectrofotométricas com o objetivo de verificar se, no comprimento de onda utilizado, existem interferências espectrofotométricas significativas causadas pelos componentes do meio tampão. Na varredura espectrofotométrica das soluções tampão borato, foi observada interferência significativa dos tensoativos utilizados em 242 nm (Tabela 7). Tal interferência não foi significativa quando se utilizou 10% EtOH como co-solvente. Como tampão que apresentou melhor solubilidade e não apresentou interferência significativa, o tampão borato associado a 10% EtOH foi o meio receptor de escolha para os experimentos de cinética de liberação *in vitro* de FEN em microemulsão.

Tabela 7: Absorbâncias obtidas através de varreduras espectrofotométricas em 242 nm utilizando-se tampão borato e associação deste com surfactantes/co-solventes.

Surfactante/co-solvente	-	LSS	Polissorbato 80	EtOH
Tampão borato	0,002	1,542	4,0	0,024
Tampão borato + FEN	0,562	1,942	-	0,602

Legenda: LSS – lauril sulfato de sódio; EtOH – etanol.

Cinética de liberação *in vitro*

Na avaliação do perfil de liberação *in vitro* do fenobarbital, a microemulsão obteve uma quantidade 4,8 vezes maior de FEN liberado em 24h ($17,39 \pm 3,13 \text{ mg.cm}^{-1}$) quando comparado à emulsão ($3,84 \pm 1,12 \text{ mg.cm}^{-1}$), com $p=0,0003$ para o ponto 24 h (Figura 13). Este resultado foi de acordo com a literatura, tendo em vista que microemulsões tem grande capacidade de aumentar a liberação de fármacos do sistema (HASHIM et al., 2011; KREILGAARD, 2002). Desta forma, as microemulsões oferecem benefícios que incluem o aumento da solubilidade e da absorção de fármacos, além da possibilidade de alterar parâmetros farmacocinéticos, diminuir a toxicidade e aumentar sua eficácia clínica (FORMARIZ et al., 2005; KLEIN, 2007).

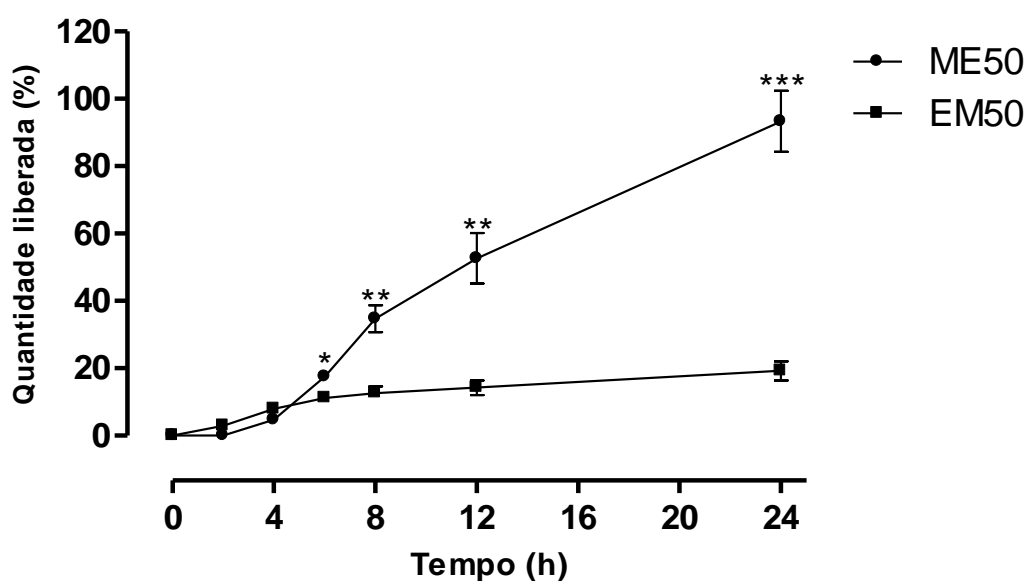


Figura 13: Cinética de liberação *in vitro* de ME50 e EM50 em células de difusão de Franz. Legenda: ME50 – microemulsão com 5% de FEN; EM50 – emulsão com 5% de FEN. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ quando comparado à EM50. Teste *t* Student.

Além da influência do tamanho das gotículas, a presença do co-surfactante utilizado (etanol) pode ter contribuído para as diferenças observadas na liberação do fenobarbital dos dois sistemas comparados. Na microemulsão obtida, o etanol é capaz de reduzir ainda mais a tensão superficial do surfactante, tornando mais flexível e dinâmica a superfície das gotículas.

A energia deste sistema facilita o fluxo de fármacos através da interface entre as fases interna e externa e, dessa forma, facilita a sua liberação e difusão através de membranas (YI-HUNG et al., 2011). Dessa forma, o estudo de cinética de liberação *in vitro* apresentou resultados promissores para a microemulsão, o que pode subsidiar, no futuro, um produto com aplicação transdérmica para o tratamento da epilepsia.

CONCLUSÃO

As microemulsões são importantes sistemas de liberação de fármacos utilizados para administração transdérmica de fármacos. O sistema microemulsionado contendo FEN desenvolvido neste trabalho tem excelente potencial para liberação transdérmica deste fármaco. A incorporação do fármaco foi realizada facilmente através de agitação branda, além de proporcionar grande capacidade de solubilização do mesmo e com poucas alterações em suas características físico-químicas com a incorporação do FEN. A microemulsão demonstrou ter estabilidade físico-química superior a emulsão. O método analítico de determinação de FEN em microemulsão pode ser utilizado como método de controle de qualidade e demonstrou ser de fácil execução, de baixo custo, utiliza solventes poucos tóxicos e aplicável a laboratórios que não dispõem de métodos cromatográficos. Além disso, a microemulsão obteve um perfil de liberação *in vitro* significativamente superior a emulsão contendo fenobarbital. Desta forma, a microemulsão obtida tem potencial para uma futura aplicação transdérmica, podendo compor um sistema de liberação de fármacos para o tratamento da epilepsia.

REFERÊNCIAS

ASH, M.; ASH, I. **Handbook of Green Chemicals**. 2. ed. USA: Synapse Information Resource Inc., 2004.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T.; ROTHSCHILD, Z. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. São Paulo: EdUSP, 2003. p. 249. v. 4.

BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; SARRUF, F. D.; TAVANTE-JÚNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S. O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E. P. G.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008.

BABY, A. R.; LACERDA, A. C. L.; KAWANO, Y.; VELASCO, M. V. R.; KANEKO, T. M. PAS-FTIR and FT-Raman qualitative characterization of sodium dodecyl sulfate interaction with an alternative stratum corneum model membrane. **Pharmazie**, v. 62, n.10, p.727-731, 2007.

BOERIS, M. S., LUCO, J. M.; OLSINA, R. A. Simultaneous spectrophotometric determination of phenobarbital, phenytoin and methylphenobarbital in pharmaceutical preparations by using partial least-squares and principal component regression multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 2, p. 259-271, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2010. v. 2.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: Anvisa, 2003.

BRODIE, M. J.; KWAN, P. Current position of phenobarbital in epilepsy and its future. **Epilepsia**, v. 53, n. 8, p. 40-46, 2012.

CAMPOS, J. S.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 3, p. 363-368, 2011.

CARVALHO, A. L. M.; CUNHA, C. P.; CRUZ, E. T. L.; SILVA, J. A.; LIRA, A. A. M.; SANTANA, D. P. Spectrophotometric Determination of Zidovudine-Loaded Microemulsion and Application in Assay of *In Vitro* Release Kinetics. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, 7, p. 1052-1056, 2012.

CASTRO, D.; MORENO, M. A.; LASTRES, J. L. First-derivative spectrophotometric and LC determination of nifedipine in Brij[®] 96 based oil/water/oil multiple microemulsions on stability studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 4, p. 563-572, 2001.

CHORILLI, M.; ZAGUE, V.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.. Influência da viscosidade do veículo na liberação *in vitro* da cafeína. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, p. 52-60, 2007.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JÚNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73-78, 2005.

DALMORA, S. L.; MAXIMILIANO, S. S.; DANIELE, R. N.; FELIPE, B. D.; RONÍLSON, A. M.; CARLOS EDUARDO, S.; ROGÉRIO ANTONIO, O.; NEY, C. B. Determination of phenobarbital in human plasma by a specific liquid chromatography method: application to a bioequivalence study. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 124-129, 2010.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DASTIDAR, D. G.; SA, B. A Comparative Study of UV-Spectrophotometry and First-Order Derivative UV-Spectrophotometry Methods for the Estimation of Diazepam in Presence of Tween-20 and Propylene Glycol. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1396-1400, 2009.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JUNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

GOICOECHEA, H. C.; OLIVIERI, A. C. Simultaneous determination of phenobarbital and phenytoin in tablet preparations by multivariate spectrophotometric calibration. **Talanta**, v. 47, n. 1, p. 103-108, 1998.

GOMES, F. E. S. **Obtenção de sistemas microemulsionados e estudo de simulação por dinâmica molecular de sistemas micelares objetivando a veiculação de produtos naturais bioativos**. 174 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2010.

GOMES, M. D. M.; ZEITOUNE, R. G.; KROPF, L. A. L.; VAN BEECK, E. S. A house-to-house survey of epileptic seizures in an urban community of Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, p. 708-711, 2002.

HALLE, B. Charge fluctuations and microemulsion conductivity. **Progress in Colloid & Polymer Science**, v. 82, p. 211-217, 1990.

HASHEM, F. M.; SHAKER, D. S.; GHORAB, M. K. G.; NASR, M.; ISMAIL, A.. Formulation, Characterization, and Clinical Evaluation of Microemulsion Containing Clotrimazole for Topical Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 3, p. 879 – 886, 2011.

ICH - International Conference on Harmonisation. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996.

JALLING, B. Plasma concentrations of phenobarbital in the treatment of seizures in newborns. **Acta Paediatrica**, v. 64, n. 3, p. 514-524, 1975.

JELVEGHARI, M.; NOKHODCHI, A. Development and Chemical Stability Studies of Alcohol-Free Phenobarbital Solution for Use in Pediatrics: a Technical Note. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 3, p. 939-943, 2008.

KLEIN, T. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose**. 114. f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, 2007.

KLOSE, D.; DELPLACE, C.; SIEPMANN, J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1–2, p. 75–82, 2011.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. S77-S98, 2002.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 1, p. 89-121, 2000.

LAWRENCE, M. J. Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. **European Journal of Drug Metabolism Pharmacokinetics**, v. 19, n. 3, p. 257 - 269, 1994.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de

ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p.563-569, 2002

LONGO, D. P. **Obtenção, caracterização e estudos de liberação *in vitro* e permeação *in vivo* de sistemas microestruturados contendo cafeína**. 2006. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2006.

MAJORES, M.; EILS, J.; WIESTLER, O. D.; BECKER, A. J. Molecular profiling of temporal lobe epilepsy: comparison of data from human tissue samples and animal models. **Epilepsy Research**, v. 60, n. 2, p. 173-178, 2004.

MARSOT, A.; BREVAUT-MALATY, V.; VIALET, R.; BOULAMERY, A.; BRUGUEROLLE, B.; SIMON, N. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of phenobarbital in neonates and young infants, a population pharmacokinetic modelling approach. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 2013. doi: 10.1111/fcp.12042.

MEHTA, S. K.; KAUR, G. Microemulsions: Thermodynamic and Dynamic Properties. In: TADASHI, M. (Ed.). **Thermodynamics**. Croatia: In Tech., 2011.

MO, C.; ZHONG, M.; ZHONG, Q. Investigation of structure and structural transition in microemulsion systems of sodium dodecyl sulfonate + n-heptane + n-butanol + water by cyclic voltammetric and electrical conductivity measurements. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 493, n. 1-2, p.100-107, 2000.

MONTEAGUDO, E.; LANGENHEIM, M.; SALERNO, C.; BUONTEMPO, F.; BREGNI, C.; CARLUCCI, A. Pharmaceutical optimization of lipid-based dosage forms for the improvement of taste-masking, chemical stability and solubilizing capacity of phenobarbital. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2013. doi:10.3109/03639045.2013.787536.

MORENO, M. A.; BALLESTEROS, M. P.; FRUTOS, P.; LASTRES, J. L.; CASTRO, D. Comparison of UV spectrophotometric and LC methods for the determination of nortriptyline hydrochloride in polysorbate 80 based oil/water (o/w) microemulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, n. 2, p. 287-294, 2000.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

PASTORE, M. E.; OFUCHI, A. S.; NISHIYAMA, P. Monitorização terapêutica de FEN. **Acta Sci. Health Sci.**, v. 29, n. 2, p. 125-131, 2007.

REBELLO, T. **Guia de produtos cosméticos**. 6^a. ed. São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2005.

ROMER, M.; DONARUMA, L. G.; ZUMAN, P. Spectrophotometric and polarographic analysis for Phenobarbital, N-methylphenobarbital and N-methoxymethylphenobarbital in a mixture. **Analytica Chimica Acta**, v. 88, p. 261-273, 1977.

SHAYANFAR, A.; ACREE JR, W. E.; JOUYBAN, A. Solubility of lamotrigine, diazepam, clonazepam, and phenobarbital in propylene glycol+ water mixtures at 298.15 K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 54, n. 3, p. 1153-1157, 2009.

SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. M. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.

SPIEHLER, V.; SUN, L.; MIYADA, D. S.; SARANDIS, S. G.; WALWICK, E. R.; KLEIN, M. W.; JORDAN, D. B.; JESSEN, B. Radioimmunoassay, enzyme immunoassay, spectrophotometry, and gas-liquid chromatography compared for determination of phenobarbital and diphenylhydantoin. **Clinical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 749 – 753, 1976.

STRECK, L.; SANTOS, K. S. C. R.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; OLIVEIRA, A. G. Validação de método analítico por espectrofotometria UV para sistema emulsionado lipídico contendo benznidazol." **Química Nova**, v. 34, n. 8, p. 1459-463, 2011.

URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nano estruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona**. 2004. 136 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2004.

USP - **United States Pharmacopeia**. Disponível em: <http://www.uspbpep.com/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_alpha-19-1560.html>. Acesso em: 04 jun. 2013.

ÜSTÜNDAĞ OKUR, N.; APAYDIN, S.; YAVAŞOĞLU, N. U. K.; YAVAŞOĞLU, A.; KARASULU, H. Y. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic

effects of new naproxen microemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 1, p. 136-144, 2011.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, 603–618, 2004.

YACUBIAN, E. M. T. Tratamento da epilepsia na infância. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 1, p. 19-27, 2002.

YI-HUNG, T.; JUNG, T. C.; JUI-SHENG, C.; CHI-TE, H.; YAW-BIN, H.; PAO-CHU, W. The Effect of Component of Microemulsions on Transdermal Delivery of Buspirone Hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2358-2365, 2011.

YSKA, J. P.; ESSINK, G. W. G.; BOSCH, F. H.; LANKHAAR, G.; VAN SORGE, A. A. Oral bioavailability of phenobarbital: a comparison of a solution in myvacet 9-08,a suspension, and a tablet. **Pharmacy World & Science**, v. 22, n. 2, p. 67-71, 2000.

YUKAWA, E.; HIGUCHI, S.; AOYAMA, T. Phenobarbitone population pharmacokinetics from routine clinical data: role of patient characteristics for estimating dosing regimens. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, n. 9, p. 755-760, 1992.

YUKAWA, M.; YUKAWA, E.; SUEMATSU, F.; TAKIGUCHI, T.; IKEDA, H.; AKI, H.; MIMEMOTO, M. Population pharmacokinetics of phenobarbital by mixed effect modelling using routine clinical pharmacokinetic data in Japanese neonates and infants: an update. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 704-710, 2011.

5. CAPÍTULO II

**AVALIAÇÃO ANTIEPILÉPTICA E ANTIOXIDANTE *IN VIVO* DE UMA
MICROEMULSÃO PARA ADMINISTRAÇÃO TRANSDÉRMICA DE
FENOBARBITAL**

(Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Pharmacy and Pharmacology* - Qualis B1,

Fator de Impacto JCR 2011 = 2,175)

**AVALIAÇÃO ANTIEPILÉPTICA E ANTIOXIDANTE *IN VIVO* DE UMA
MICROEMULSÃO PARA ADMINISTRAÇÃO TRANSDÉRMICA DE
FENOBARBITAL**

Kayo Alves Figueiredo*, **Shirlene Cesário Medeiros**, **André Luis Menezes Carvalho**,
Rivelilson Mendes de Freitas

Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Campus
Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, 64049-550, Teresina-PI, Brasil

Adriana da Rocha Tomé

Laboratório de Fisiologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará,
Campus Itaperi, Av. Paranjana s/n, 60740-000, Fortaleza-CE, Brasil

Jamilly Kelly Oliveira Neves, **José Alessandro da Silva**

Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Rua Juvêncio Arruda, s/n,
58109-790, Campina Grande – PB, Brasil

***E-mail:** *kayo.figueiredo@hotmail.com

RESUMO

Esse trabalho objetivou avaliar um sistema microemulsionado contendo fenobarbital no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em ratos. A microemulsão foi aplicada no dorso depilado de ratos Wistar. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo controle;

ME50 40 mg/Kg, via tópica - t.p.; ME100, 40 mg/kg, t.p.; EM50, 40 mg/Kg, t.p.; fenobarbital solução 40 mg/Kg (FS), via oral – v.o. Após 60 min, os grupos foram tratados com pilocarpina (400 mg/Kg, i.p.) e observados durante 1 h e o número de mortes registrados durante 24 h após a administração. Foram avaliadas também a presença de sinais colinérgicos periféricos, movimentos estereotipados e tremores. Os animais apresentaram piloereção, cromodacriorréia, tremores, diarreia, diurese, salivação e movimentos estereotipados de coçar, *rearing* (levantar), mastigar, entre outros. O fenobarbital em microemulsão foi capaz de aumentar a latência para o estado de mal epilético - EME ($p < 0,05$), diminuir o número de animais que apresentaram crises epiléticas (ME50: $p < 0,001$; ME100: $p < 0,01$) e diminuir a taxa de mortalidade em 80% em relação ao grupo P400. Nos outros grupos, as mortes foram diminuídas em 53,3% e 100% dos animais, para EM50 e FS. Os grupos ME50 e ME100 foram capazes de reduzir o estresse oxidativo em animais experimentais quando comparado ao grupo controle, evidenciado pela diminuição dos níveis de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), nitrito e glutatona reduzida (GSH). A microemulsão foi capaz ainda de reduzir lesões neuronais em áreas do hipocampo de ratos submetidos ao teste. Os resultados desse estudo vêm de forma inovadora demonstrar a capacidade da administração transdérmica de microemulsão contendo fenobarbital em reduzir as crises epiléticas induzidas por pilocarpina e o estresse oxidativo, assim como lesões neuronais consequentes as crises em animais experimentais.

Palavras-chave: Epilepsia. Fenobarbital. Sistema Microemulsionado. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate a microemulsion system containing the antiepileptic phenobarbital against epilepsy model induced by pilocarpine in rats. The microemulsion was applied to the shaved backs of rats. The animals were divided into control group (P400), microemulsion containing phenobarbital 50 mg/g (ME50) and 100 mg/g (ME100), 40 mg/Kg

(transdermal, t.p.), phenobarbital 50 mg/g in emulsion (EM50) 40 mg/Kg (topic, t.p.) and phenobarbital solution 40 mg/Kg (FS), route oral - v.o. (FS). After 60 min, the groups were treated with pilocarpine (400 mg/Kg, i.p.) and observed for 1 h and the number of deaths accounted for 24 h after administration. We also evaluated the presence of peripheral cholinergic signs, stereotyped movements and tremors. The animals showed piloerection, cromodacriorreia, tremors, diarrhea, diuresis, salivation and stereotyped movements of scratching, rearing (lift), chew, among others. Phenobarbital microemulsion was able to increase the latency to status epilepticus ($p < 0.05$), decrease the frequency of seizures (ME50: $p < 0.001$; ME100: $p < 0.01$) and avoid 80 % of deaths compared to P400. In the other groups, deaths were avoided by 53.3% and 100% of the animals to EM50 and FS. Groups ME50 and ME100 were able to reduce oxidative stress in experimental animals when compared to the control group, as evidenced by decreased levels of TBARS, nitrite and consumption of GSH. The microemulsion was also able to reduce neuronal injury in areas of the hippocampus of rats submitted to the test. The results of this study comes from innovative way to demonstrate the ability of transdermal microemulsion containing phenobarbital in reducing seizures induced by pilocarpine and oxidative stress, as well as neuronal injury resulting seizures in experimental animals.

Keywords: Epilepsy. Phenobarbital. Microemulsioned system. Oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A epilepsia é um distúrbio cerebral causado por predisposição persistente do cérebro a gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição, caracterizada pela ocorrência de pelo menos uma crise epilética (GUILHOTO; MUSZKAT; YACUBIAN, 2006). Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo são portadoras de epilepsia. Segundo alguns dados da literatura, a prevalência desta condição no Brasil pode variar de 5,4 até 36,8/1000 habitantes (GOMES et al., 2002; KANASHIRO, 2006). Epilepsia é considerada a segunda causa mais frequente de distúrbio neurológico em adultos jovens (BETTING et al., 2003), com uma incidência geral de aproximadamente 1% em crianças (YACUBIAN, 2002).

Diversos modelos animais de epilepsia são utilizados para estudar a fisiopatologia do processo convulsivo e a atividade antiepilética de fármacos em avaliação pré-clínica (FREITAS, 2006). A administração de pilocarpina em roedores é um ótimo modelo animal de indução de crises epiléticas, com grandes semelhanças em impacto funcional e alterações morfológicas à epilepsia do lobo temporal em humanos (CAVALHEIRO et al., 1987). Um aumento na peroxidação lipídica e nos níveis de nitrito, assim como diminuição dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e produção excessiva de radicais livres tem sido observados durante as crises epiléticas induzidas por pilocarpina (FREITAS et al., 2005). Este modelo tem sido utilizado com sucesso para avaliar a ação antiepilética de novas drogas (SCORZA et al., 2009), bem como novos sistemas de liberação de fármacos (MORENO et al., 2011).

Na última década foi observado um grande avanço no tratamento das epilepsias incluindo novos fármacos descobertos, novas formulações de antigas drogas, estimulação vagal, dieta cetogênica, bem como tratamento cirúrgico (BETTING et al., 2003). Como estratégia geral para o tratamento de todas as epilepsias, vários especialistas sugerem o controle das crises com o uso de medicamentos em monoterapia (DALMORA et al., 2010).

Dentre esses fármacos, o fenobarbital é um barbitúrico utilizado no tratamento de diferentes formas de epilepsia pediátrica e estado de mal epilético, sendo considerado de primeira linha para o controle de crises epiléticas neonatais (DJABRI; GUY; DELGADO-CHARRO, 2012). Apresenta como vantagens o baixo custo, o amplo espectro de ação e a facilidade de uso (DALMORA et al., 2010). O fenobarbital é um fármaco centenário e considerado ainda o tratamento farmacológico da epilepsia com maior relação custo-benefício, principalmente para os países em desenvolvimento (BRODIE; KWAN, 2012).

É um dos fármacos de escolha no tratamento do estado epilético e das crises epiléticas febris (PASTORE; OFUCHI; NISHIYAMA, 2007). A Fenitoína e/ou os

benzodiazepínicos são geralmente recomendados como tratamento inicial das crises epiléticas em geral, mas quando estas drogas não conseguem controlar as crises, fenobarbital é frequentemente usado (WALTON; TREIMAN, 1989). Possui boa biodisponibilidade oral, entretanto pode apresentar flutuações nos níveis plasmáticos em pacientes pediátricos, além de reduzida biodisponibilidade, podendo apresentar uma diferença de até 60% quando comparado a uma via de administração parenteral (YUKAWA et al., 2011; TOUW et al., 2000). Além disso, a estreita margem terapêutica desse antiepilético é um dos fatores agravantes para o tratamento das crises, já que uma dose habitual pode levar suas concentrações plasmáticas a níveis tóxicos.

Na literatura, há diversos trabalhos descrevendo o estudo de formulações alternativas àquelas disponíveis no mercado para o fármaco fenobarbital. Entre as formulações encontradas na literatura, pode-se citar: supositórios (MOOLENAAR; KONING; HUIZINGA, 1979); suspensão oral (MORANTES et al., 2010; YSKA et al., 2000); solução oral (JELVEGHARI; NOKHODCHI, 2008); hidrogel e emulsão para uso transdérmico (ODRIA et al., 2005). Há ainda estudos com novos sistemas de liberação de fármacos, como a penetração cutânea de fenobarbital com o uso da iontoforese (DJABRI; GUY; DELGADO-CHARRO, 2012). Uma grande quantidade de estudos vem se direcionando para o emprego de formulações inovadoras, como as microemulsões, como sistema carreador para diversos fármacos (DAMASCENO et al., 2011).

As microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis e com gotículas nanométricas de dois líquidos imiscíveis (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água (OLIVEIRA et al., 2004). Os sistemas microemulsionados podem promover a penetração cutânea de diversos fármacos. De modo geral, na administração transdérmica, a penetração cutânea de fármacos é limitada, tendo em vista a pele ser importante barreira biológica que deixa penetrar apenas algumas substâncias em determinadas condições. A utilização da via transdérmica oferece vantagens em diversas circunstâncias quando comparada às outras vias de administração: evitar as adversidades da via oral, é indolor, não invasiva e de fácil aplicação, podendo aumentar, dessa forma, a adesão do paciente à terapia (SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2010).

Tendo em vista as inúmeras vantagens da administração transdérmica de fenobarbital incorporado em microemulsão, o objetivo deste trabalho foi avaliar um sistema microemulsionado contendo este antiepilético frente ao modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em ratos, assim como avaliar o estresse oxidativo por meio de marcadores bioquímicos e lesões histológicas em áreas cerebrais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Ratos Wistar fêmeas (n=8-15/grupo), com peso entre 180-240 g, foram adquiridos no Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da UFPI. Esses foram alojados em uma sala mantida a 25 ± 1 °C, com uma alternância de 12 h de ciclo claro-escuro. Os pelos da região dorsal dos animais foram removidos em uma região de 4 cm² por meio de depilador elétrico. Todos os experimentos propostos foram previamente submetidos à apreciação pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (nº 0102/12).

Preparo das amostras para tratamento

O cloridrato de pilocarpina (Vegeflora, Brasil) foi dissolvido em água purificada para a obtenção de uma concentração final de 4 mg/mL. O fenobarbital (PharmaNostra, Brasil, Lot. nº 10083132B) foi dissolvido em água purificada com 1% de polissorbato 80 v/v (Vetec, Brasil).

A microemulsão foi preparada através da mistura a frio de caprilo caproil macrogol-8 glicérido - labrasol[®] (Gattefosse, França), etanol (Dinâmica, Brasil), miristato de isopropila (Synth, Brasil) e água purificada (Milipore, Alemanha) sob agitação magnética. O fenobarbital foi incorporado a frio nas concentrações de 50 mg/g (ME50) e 100 mg/g (ME100). No preparo da emulsão a 50 mg/g (EM50), foi utilizada cera autoemulsionante não iônica (PharmaNostra, Brasil), metilparabeno (Vetec, Brasil), propilparabeno (Vetec, Brasil), propilenoglicol (Vetec, Brasil) e água purificada (Milipore, Alemanha).

Modelo de epilepsia induzida por pilocarpina

Foi aplicado no dorso depilado de ratos Wistar uma quantidade de microemulsão correspondente a 40 mg/kg de fenobarbital. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo controle; ME50 40 mg/kg, via tópica - t.p.; ME100, 40 mg/kg, t.p.; EM50, 40 mg/kg, t.p.; fenobarbital solução 40 mg/kg (FS), via oral – v.o., utilizado como grupo referência. Após 60 min, os grupos foram tratados com pilocarpina 400 mg/kg, intraperitoneal – i.p. (P400) e observados durante 1 h e o número de mortes foi contabilizado em 24 h após a administração (TURSKI et al., 1989).

Após os tratamentos, os grupos foram colocados em gaiolas 30 cm x 30 cm para observação dos seguintes parâmetros: sinais colinérgicos periféricos (SCP), tremores, movimentos estereotipados (MET), crises epiléticas, estado de mal epilético (EME) e

número de sobreviventes, a latência de instalação da primeira crise epiléptica e a latência de desenvolvimento de estado de mal epiléptico. As doses das drogas utilizadas foram previamente padronizadas para a realização deste protocolo experimental.

Avaliação do estresse oxidativo em hipocampo de ratos

No final das observações, os animais foram mortos por decapitação e os cérebros foram dissecados em gelo com remoção do hipocampo para as determinações dos níveis de peroxidação lipídica, nitrito e glutathiona reduzida (GSH). Foram avaliados também os níveis destes marcadores em animais que receberam apenas veículo.

Determinação da peroxidação lipídica e do conteúdo de nitrito

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como descrito previamente por Draper e Hadley (1990). Foram preparados homogenatos a 10% (p/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 da área cerebral investigada dos animais (n = 8) dos seguintes grupos: controle, ME50, ME100, EM50 e FS (n=8-10/grupo). As amostras foram incubadas com ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico 0,67% durante 60 min em banho maria a 37 °C. Após centrifugação, as absorbâncias das amostras foram determinadas em 535 nm. Os resultados foram expressos em mmol de malonaldeído (MDA).g de tecido⁻¹ (FREITAS et al., 2005).

O conteúdo de nitrito em todos os grupos (n=10) foi determinado com base na reação de Griess (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981). Homogenatos do hipocampo a 10% foram incubados com reagente de Griess em temperatura ambiente durante 10 min. As absorbâncias foram determinadas logo em seguida em 550 nm. A concentração de nitrito foi determinada através de uma curva padrão de nitrito construída com NaNO₂. Os resultados foram expressos em milimolar - mM (FREITAS et. al, 2005).

Determinação de glutathiona reduzida (GSH)

O conteúdo de GSH foi determinado com algumas alterações da técnica descrita por Sedlak e Lindsay (1968). Homogenatos a 10% de todos os grupos (n = 8) foram preparados em EDTA 0,02 M. A medida do produto de reação formado com o 5,5'tiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DNTB) é feita por leitura da absorbância em 412 nm. A concentração de GSH foi expressa em nanograma de GSH.g de tecido⁻¹ (FREITAS et al., 2005).

Análise histopatológica

Após submetidos à crises epiléticas induzidas por pilocarpina, os animais foram sacrificados para retirada do cérebro, sendo conservado em fomaldeído 10% para confecção de cortes histológicos. Os tecidos foram incluídos em parafina e feitos cortes de 5 µm, com montagem em lâminas para microscopia. Lesões no tecido cerebral nas regiões CA1 e giro dentado do hipocampo foram avaliadas através de microscopia óptica e as imagens foram registradas em aumento de 100x.

RESULTADOS

Após administração intraperitoneal de pilocarpina 400 mg/kg os animais apresentaram mudanças comportamentais semelhante ao aumento da estimulação colinérgica, como piloereção, cromodacrioreia, tremores, diurese, salivação e MET de coçar, rearing (levantar), mastigar, entre outros, que persistiram de 10 a 15 min. Estas alterações comportamentais progridem para crises epiléticas motoras (TURSKY, 1983), sendo observadas por 30 a 50 min e progredindo ao EME.

Após a aplicação tópica do fenobarbital incorporado em microemulsão, foi possível observar que houve alterações nos parâmetros analisados quanto às crises epiléticas induzidas por pilocarpina em relação ao grupo controle - P400 (Tabela 8). O fenobarbital incorporado a 50 mg/g em microemulsão (ME50), bem como a 100 mg/g (ME100), foi capaz de aumentar a latência para a instalação da primeira crise epilética em relação ao grupo P400 ($p < 0,05$). Não houve alteração na latência para o EME e para a morte do animal. Quando foi incorporado em emulsão, o fenobarbital não apresentou aumento de latência em nenhum dos parâmetros analisados. Já na administração por vial oral, o grupo FS inibiu totalmente a instalação de crises epiléticas, com tempo de latência 0 min para todos os parâmetros.

Após administração transdérmica na dose de 40 mg/kg, o sistema microemulsionado contendo fenobarbital foi capaz de evitar o desenvolvimento das crises epiléticas em 86,7% e 73,4% dos animais nos grupos que receberam microemulsão, ME50 e ME100, respectivamente, com 80% de sobreviventes em ambos os grupos (Tabela 8). Quando utilizou-se EM50, o fenobarbital diminuiu em 60% o desenvolvimento dessas crises, com uma diferença de 26,7% e 13,4% em relação aos grupos ME50 e ME100, respectivamente. Apresentou ainda uma taxa de sobreviventes de 53,3%, sendo 33,3% inferior em relação aos grupos que receberam microemulsão. No grupo utilizado como referência para os testes, FS, não foi verificada nenhuma morte entre os animais.

Tabela 8: Alterações comportamentais no pré-tratamento dos animais com microemulsão contendo fenobarbital sob as crises epiléticas induzidas por pilocarpina.

Grupos	Lat. crises epiléticas (min)	% Crises epiléticas	Latência do EME (min)	Latência de morte (min)	% Sobreviventes
P400	17,77±0,96	86,6	23,18±2,4	27,0±2,7	20,0
ME50 + P400	25,0±3,5 ^a	13,3 ^{***}	26,0±3,0	26,5±3,5	80,0 ^{**}
ME100 + P400	24,5±4,03 ^a	26,6 ^{**}	28,25±3,3	28,3±0,33	80,0 ^{**}
EM50 + P400	23,17±4,3	40,0 [*]	26,2±5,6	29,0±5,7	53,3
FS + P400	0	0 ^{***}	0	0	100,0 ^{***}

Legenda: P400=Pilocarpina 400 mg/kg, i.p., n = 15; ME50=Microemulsão de fenobarbital 50 mg/g, 40 mg/kg, t.p., n = 15; ME100=Microemulsão de fenobarbital 100 mg/g, 40 mg/kg, t.p., n = 15; EM100=emulsão de fenobarbital 50 mg/g, 40 mg/kg, t.p., n = 15; FS=Fenobarbital 40 mg/kg, v.o., n = 15. ^ap<0,05 em relação ao grupo P400 (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste). * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao grupo P400. Teste exato de Fisher. Os resultados foram expressos como porcentagem (%) e a média±erro padrão da média (EPM).

Os animais que receberam fenobarbital nos grupos testados apresentaram redução de MET em relação ao grupo P400, com 66,7%, 66,7%, 80% e 66,7%, para os grupos ME 50 e ME100, EM50 e FS, respectivamente (Tabela 9). No entanto, esse resultado não foi estatisticamente significativo para todos os grupos que receberam fenobarbital em relação ao grupo P400 para o teste de Fisher. Não foi observada redução de SCP e de tremores em relação ao grupo P400.

Tabela 9: Alterações comportamentais no pré-tratamento dos animais com microemulsão contendo fenobarbital sob a presença de SCP, MET e tremores nas crises epiléticas induzidas por pilocarpina.

Grupos	% SCP	% MET	% Tremores
P400	100	86,6	100
ME50 + P400	100	66,7	100
ME100 + P400	100	66,7	100
EM50 + P400	100	80,0	100
FS + P400	100	66,7	100

Legenda: P400=Pilocarpina 400 mg/kg, i.p., n = 15; ME50=Microemulsão de fenobarbital 50 mg/g, 40 mg/kg, t.p., n = 15; ME100=Microemulsão de fenobarbital 100 mg/g, 40 mg/Kg, t.p., n = 15; EM50=emulsão de fenobarbital 50 mg/g, 40 mg/kg, t.p., n = 15; FS=Fenobarbital 40 mg/kg, v.o., n = 15. p>0,05 (Teste exato de Fisher). Os resultados foram expressos como porcentagem (%) e a média±erro padrão da média (EPM). SCP: sinais colinérgicos periféricos; MET: movimentos estereotipados.

Na avaliação do estresse oxidativo em hipocampo de ratos submetidos ao modelo de epilepsia induzida por pilocarpina, foram determinados os níveis de TBARS, nitrito e GSH utilizando métodos de determinação *in vitro*.

Os grupos ME50, ME100 e FS foram capazes de reduzir em 45%, 27,2% e 43,3% os níveis de TBARS por grama de tecido em relação a P400, respectivamente, e com significância estatística de $p < 0,001$ a $p < 0,05$ (Figura 14). Os grupos ME50 e FS reduziram os níveis deste marcador de forma semelhante ao veículo. O grupo EM50 reduziu em apenas 10,1% os níveis de TBARS, com $p > 0,05$.

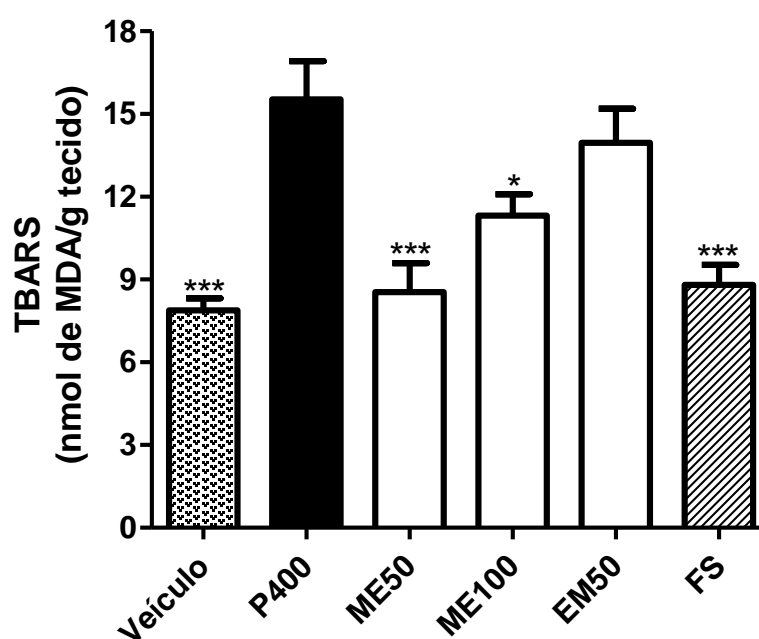


Figura 14: Alterações bioquímicas nos níveis de TBARS em hipocampo de ratos após crises epiléticas induzidas por pilocarpina 400 mg/kg i.p. ($n = 8$). Os animais foram divididos em grupo: P400 (pilocarpina 400 mg/kg, i.p.); ME 50 (Microemulsão de fenobarbital 50 mg/g, 40 mg/kg, t.p.) + P400; ME100 (Microemulsão de fenobarbital 100 mg/g, 40 mg/kg, t.p.) + P400; EM50 (emulsão de fenobarbital 50 mg/g, 40 mg/kg, t.p.) + P400; FS (Fenobarbital 40 mg/kg, v.o.) + P400. Foi analisado o nível de TBARS de animais normais (veículo). *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ em relação ao grupo P400 (ANOVA one-way, seguido do teste de *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). Os resultados foram expressos como nmol de MDA/g de tecido.

Os níveis de nitrito nos grupos com microemulsão diferiram estatisticamente quando comparados ao grupo P400, com redução de 29,8% e 31,9%, respectivamente para ME50 e ME100, com $p < 0,05$ (Figura 15). O mesmo foi evidenciado no grupo FS, com redução de 33,5%. Para EM50, houve redução de 16,6% nos níveis de nitrito em relação ao grupo controle, porém esse resultado não foi significativo, com $p > 0,05$. O grupo veículo apresentou os menores níveis de nitrito.

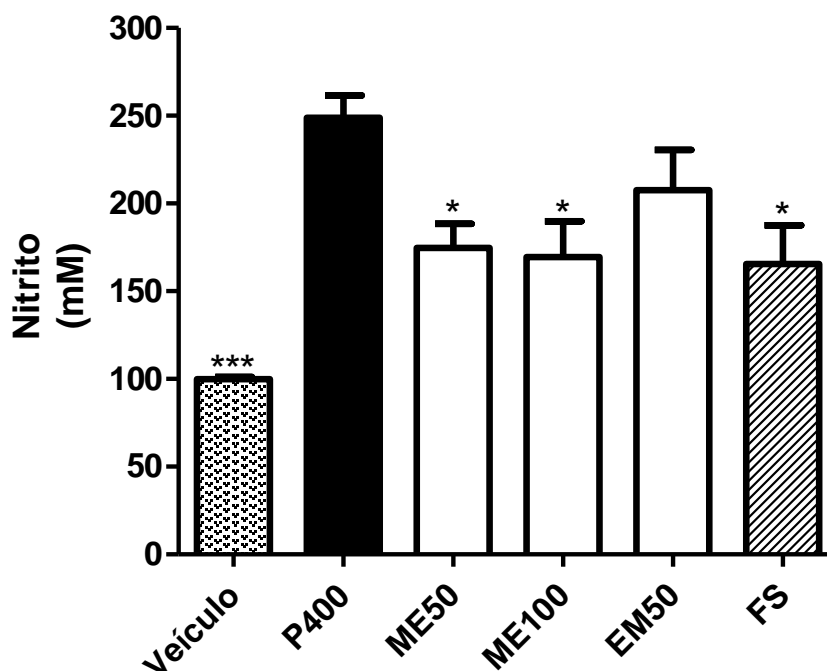


Figura 15: Alterações bioquímicas nos níveis de nitrito em hipocampo de ratos após crises epiléticas induzidas por pilocarpina 400 mg/kg i.p. (n = 10). Os animais foram divididos em grupo: P400 (pilocarpina 400 mg/kg, i.p.); ME 50 (Microemulsão de fenobarbital 50 mg/g, 40 mg/Kg, t.p.) + P400; ME100 (Microemulsão de fenobarbital 100 mg/g, 40 mg/kg, t.p.) + P400; EM50 (Emulsão de fenobarbital 50 mg/g, 40 mg/Kg, t.p.) + P400; FS (Fenobarbital 40 mg/kg, v.o.) + P400. Foi analisado o nível de nitrito de animais normais (veículo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo P400 (ANOVA one-way, seguido do teste de *t*-Sudent-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). Os resultados foram expressos como mM.

Para os níveis de GSH, houve aumento significativo para todos os grupos ME50, ME100, EM50 e FS, com aumento de 51,1% ($p < 0,01$), 51,7% ($p < 0,01$), 38,4% ($p < 0,05$) e 54,5% ($p < 0,01$), respectivamente, em relação ao grupo P400 (Figura 16). Os grupos teste apresentaram níveis semelhantes de manutenção dos estoques de GSH com relação a P400, porém menores em relação ao veículo. Houve um consumo mais pronunciado de GSH no grupo EM50, o qual apresentou uma diferença de 20,5% e 21,5% nos níveis dessa molécula antioxidante em relação aos grupos ME50 e M100, respectivamente.

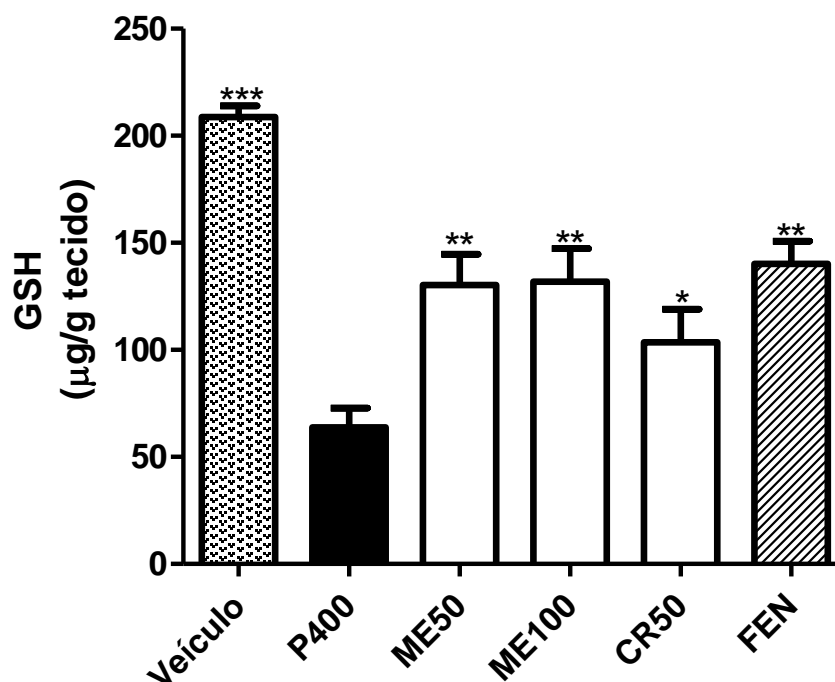
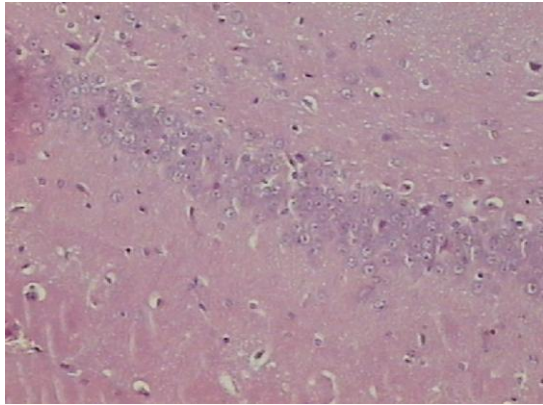
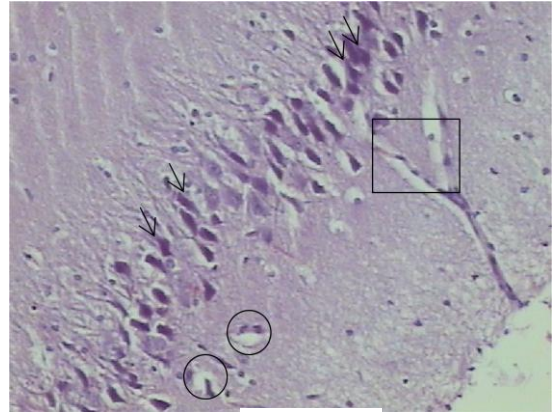


Figura 16: Alterações bioquímicas nos níveis de GSH em hipocampo de ratos após crises epiléticas induzidas por pilocarpina 400 mg/kg i.p. (n = 8). Os animais foram divididos em grupo: P400 (pilocarpina 400 mg/kg, i.p.); ME 50 (Microemulsão de fenobarbital 50 mg/g, 40 mg/kg, t.p.) + P400; ME100 (Microemulsão de fenobarbital 100 mg/g, 40 mg/kg, t.p.) + P400; EM50 (Emulsão de fenobarbital 50 mg/g, 40 mg/kg, t.p.) + P400; FS (Fenobarbital 40 mg/kg, v.o.) + P400. Foi analisado o nível de GSH de animais normais. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo P400 (ANOVA one-way, seguido do teste de t-Sudent-Neuman-Keuls como post hoc teste). Os resultados foram expressos como µg/g tecido.

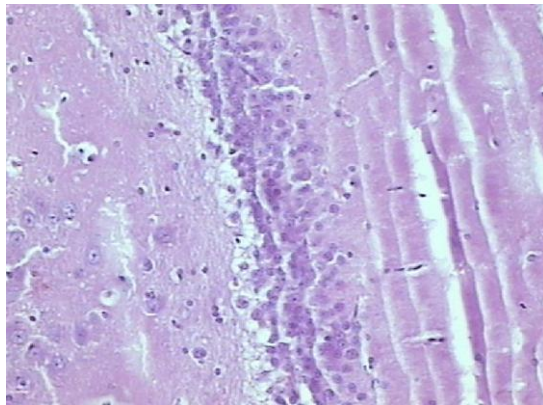
Na Figura 17, pode ser observada a análise histopatológica do hipocampo de animais submetidos às crises epiléticas induzidas por pilocarpina. Nota-se claramente que os grupos ME50, ME100 e FS reduziram de modo semelhante as lesões neuronais em relação aos animais do grupo P400, com preservação das células em suas características histofuncionais (núcleo central, nucléolo evidente e células coesas). O grupo EM50 apresentou comprometimento de células do hipocampo, com morte celular, porém de forma menos intensa do que P400, o qual apresentou várias células picnóticas, gliose, vacuolizações, além de remoção do tecido de sustentação.



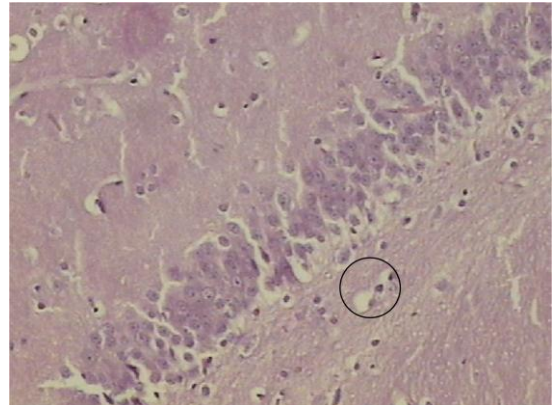
Veículo



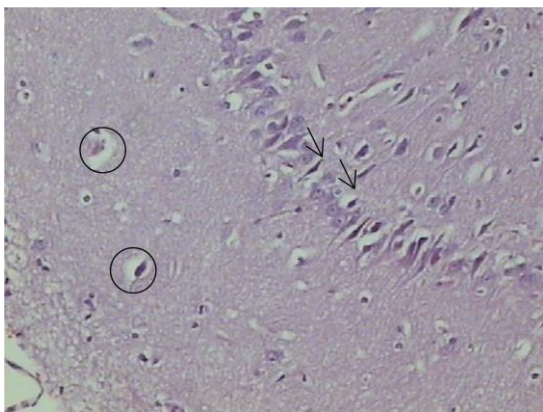
P400



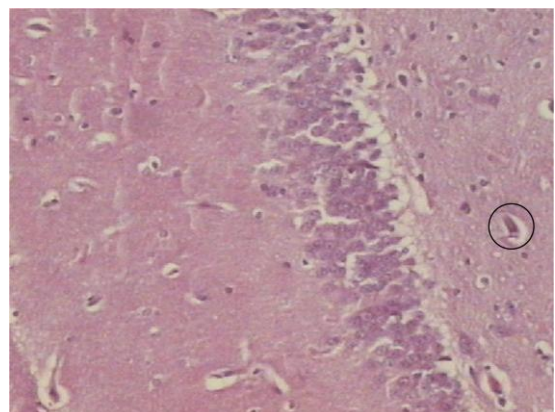
ME50



ME100



EM50



FS

Figura 17: Análise histopatológica da região CA1 e giro dentado do hipocampo de ratos submetidos a crises epilépticas induzidas por pilocarpina. A primeira figura representa o hipocampo de um animal tratado com veículo. Note a diferença entre o tecido de animais normais e o tecido dos animais com maior número de lesões (P400). ↓: presença de núcleos picnóticos e gliose. ○: vacuolizações; □: remoção de tecido de sustentação. Aumento de 100X.

DISCUSSÃO

Quando administrada por via sistêmica em ratos adultos em doses superiores a 350 mg/kg, a pilocarpina induz uma gama de alterações comportamentais persistentes. Acinesia, automatismos gustativos e tremores de cabeça dominam a atividade motora dos animais em aproximadamente de 5-10 min após injeção deste fármaco. Após 10-15 min, esse comportamento progride para crises epiléticas motoras, com a presença ainda de *rearing* (movimentos de levantar), movimentos de coçar, salivação intensa e movimentos mastigatórios. Crises epiléticas motoras límbicas iniciam em 20-30 min e se repetem a cada 2-5 min, levando, em seguida, ao EME (CAVALHEIRO et al., 1987). Conforme Freitas e colaboradores (2006), os dados obtidos de alterações comportamentais no modelo de crises epiléticas induzidas por pilocarpina foram semelhantes aos descritos na literatura.

A dose de pilocarpina capaz de induzir crises epiléticas em ratos foi padronizada segundo estudos de Freitas e colaboradores (2006). A dose de fenobarbital foi testada e padronizada segundo dados de estudos prévios. A dose utilizada de fenobarbital pelas três vias utilizadas (i.p., v.o. e t.p.) capazes de evitar o aparecimento de crises epiléticas neste trabalho foi menor àquela que evitou crises epiléticas motoras induzidas por homocisteína tiolactona em um estudo americano, com um ED₅₀ de 47 mg/kg (WALTON; TREIMAN, 1989).

Fármacos antiepiléticos são capazes de aumentar a latência para a instalação das primeiras crises epiléticas (COSTA et al., 2012). Neste estudo, quando incorporado em microemulsão, o fenobarbital foi capaz de aumentar o tempo para a instalação da primeira crise epilética quando comparado com o grupo controle para os grupos ME50, ME100 e FS (Tabela 8). O grupo P400 apresentou um número de mortes semelhante ao trabalho de Clifford, Podolsky e Zorumski (1985), com 20% de sobreviventes no período de 24 h após administração de pilocarpina. Houve redução significativa do número de mortes nos grupos ME50 e ME100, ambos com uma diferença de 60% de inibição de mortes em relação a P400. Já no grupo FS, essa diferença foi de 80%. A EM50 obteve uma diferença de 33,3% de inibição do número de mortes em relação à P400, porém esse resultado não foi significativo.

Fármacos capazes de causar inibição mediada por GABA, como os barbitúricos, em certas sinapses neuronais reduzem ou até mesmo cessam as crises epiléticas induzidas por agonistas colinérgicos, como a pilocarpina. Essas drogas antiepiléticas agem através de canais de sódio voltagem-dependentes, com consequente redução do número de animais que desenvolvem crises epiléticas, EME e da taxa de mortalidade (FREITAS et al., 2006). A ativação do sistema GABAérgico não interfere nos efeitos periféricos mediados pela

pilocarpina, de forma semelhante a outras drogas que tem mediação GABAérgica, como o diazepam e clonazepam (FREITAS et al., 2006; FREITAS, 2011). O fenobarbital reduziu as crises epilépticas, mas não foi capaz de alterar de forma significativa os parâmetros comportamentais induzidos pela pilocarpina referentes à presença de SCP, MET e tremores (Tabela 9).

O estresse oxidativo pode ser definido como o aumento da produção de radicais livres nos tecidos e é capaz de alterar drasticamente a função neuronal durante as crises epilépticas (DYMOND; CRANDALL, 1976). O fenobarbital, quando administrado na forma de microemulsão, foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e as lesões neuronais em animais experimentais quando comparado ao grupo controle, evidenciado pela diminuição dos níveis de TBARS, nitrito, da manutenção dos níveis de GSH e das lesões em hipocampo de ratos (Figuras 14 - 17).

A peroxidação lipídica pode ser induzida por muitos agentes químicos e está presente nas lesões neuronais, como na epilepsia (FLOHE; OTTING, 1984). Como agente antiepiléptico, o fármaco em estudo pode ser capaz de reduzir as descargas neuronais em áreas cerebrais, como o hipocampo, fato este evidenciado indiretamente pela redução dos níveis de marcadores de estresse oxidativo, como o TBARS e a produção de derivados do óxido nítrico (NO). Níveis elevados de TBARS estão presentes em condições de estresse oxidativo e são avaliados através da determinação de MDA (DRAPER; HADLEY, 1990). Em condições normais, há um equilíbrio entre a produção de NO e seus metabólitos (nitrito e nitrato) e sua eliminação pelo sistema de defesa antioxidante. Estudos tem mostrado que no modelo de crises epilépticas induzidas por pilocarpina há aumento da formação de nitrito, sugerindo um possível aumento no estresse oxidativo e consequente lesão neuronal (KUDIN et al., 2005).

A GSH é responsável pela eliminação de espécies reativas derivadas do oxigênio (ROS) (HALLIWELL, 1993). Em situações de estresse oxidativo em que os níveis de ROS superam a capacidade da GSH em sequestrar radicais livres, há um aumento do consumo dessa molécula antioxidante e, conseqüentemente, redução dos seus níveis (FREITAS et al., 2005). A manutenção dos seus estoques em animais experimentais pode ser avaliada experimentalmente e a redução dos níveis de GSH foi evidenciada de acordo com os resultados da Figura 16 para o grupo P400. A administração de fenobarbital em todas as formulações administradas foi capaz de manter os estoques elevados de GSH em relação ao grupo controle. Entretanto, o grupo EM50 apresentou uma menor manutenção dos estoques

de GSH, com uma diferença de 20% em relação aos outros grupos que receberam fenobarbital.

Na análise histopatológica de hipocampos de ratos, o grupo P400 apresentou achados histológicos típicos de lesões neuronais induzidas por pilocarpina: presença de apoptose, núcleos picnóticos, gliose, vacuolização citoplasmática e hipercromasia celular, além de remoção do tecido de sustentação (NASCIMENTO, 2004). O fenobarbital administrado na forma de microemulsão foi capaz de reduzir as lesões celulares em hipocampo de ratos submetidos à crises epiléticas induzidas por pilocarpina (Figura 17). Tal resultado corrobora os achados de redução do número de crises, número de mortes e regulação dos marcadores de estresse oxidativos em animais submetidos ao teste, com resultados semelhantes ao trabalho de Liu e colaboradores (2012) para a baicalina. Os grupos ME50, ME100 e FS apresentam resultados superiores à EM50 na redução das lesões em hipocampo de ratos, demonstrando uma neuroproteção possivelmente através da redução das descargas neuronais oriundas de crises epiléticas (PITKANEN, 2002), assim como pela redução do estresse oxidativo na área cerebral avaliada (TOMÉ; FEITOSA; FREITAS, 2010).

A via transdérmica tem potencial aplicação na terapia farmacológica crônica, como no caso do tratamento da epilepsia. Alguns autores têm sugerido a via transdérmica como uma alternativa para a administração de fenobarbital (DJABRI; GUY; DELGADO-CHARRO, 2012), de forma semelhante a outros psicofármacos, como o lorazepam, o clonazepam e a bupropiona (PUGLIA et al., 2001; TSAI et al., 2011). BONINA e colaboradores (1993) evidenciaram a capacidade deste antiepilético de permear através das camadas da pele de humanos e animais. Dessa forma, o fenobarbital é um fármaco promissor para a incorporação em sistemas de liberação que facilitem sua penetração cutânea, como as microemulsões.

As microemulsões oferecem vantagens sobre formulações tradicionais como, cremes, géis e soluções. A principal desvantagem de tais formulações, como os géis, é a baixa capacidade de solubilização de fármacos lipofílicos. Em relação às emulsões convencionais, como os cremes, as microemulsões podem promover hidratação do estrato córneo e, assim, facilitar a permeação de fármacos pela via transdérmica (SABALE; VORA, et al., 2012). Além disso, atuam como promotores de permeação através das camadas da pele devido ao reduzido tamanho das gotículas formadas, bem como ao seu alto conteúdo de tensoativo que contribui para a desorganização dos lipídeos da pele (SILVA et al., 2010). Tais tensoativos permitem a interação com o estrato córneo através da desestruturação da bicamada lipídica e a permeabilidade dos fármacos é facilitada (DAMASCENO et al., 2011). Além do mais, o

tamanho nanométrico das gotículas apresentadas por esta microemulsão pode ter um papel fundamental na penetração cutânea do FEN (dados não mostrados).

O labrasol[®] é um tensoativo derivado do polietilenoglicol com baixa irritabilidade dérmica e que vem sendo utilizado na composição de várias microemulsões com boa permeação transdérmica (ZHAO et al., 2006; ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011; FOUAD et al., 2013). Além disso, a fase oleosa, nesse caso o miristato de isopropila, possui características de promotor de permeação transdérmica (NOKHODCHI et al. 2003). Quando administrado na forma de microemulsão, o fenobarbital foi capaz de reduzir de forma significativa as crises epiléticas induzidas por pilocarpina em animais experimentais. De forma semelhante, o grupo EM50 foi também capaz de reduzir essas crises, porém de forma não tão eficaz quando comparado à microemulsão.

O EM50 não foi capaz ainda de reduzir significativamente o número de mortes, de reduzir o estresse oxidativo quando foram avaliados os níveis de TBARS e nitrito e reduziu menos intensamente as lesões neuronais em hipocampo de ratos submetidos à indução das crises epiléticas. Emulsões convencionais possuem tamanho de partículas relativamente grandes e, muitas vezes, as características de liberação e permeação transdérmica de fármacos quando incorporados nestas formulações diferem significativamente em relação aos sistemas microemulsionados, conforme demonstrado por Teichmann e colaboradores (2007).

A diminuição proporcional da quantidade de microemulsão administrada no grupo ME100 (tendo em vista ser a mesma dose para todos os grupos) e a consequente redução da área da superfície da pele que recebeu a microemulsão pode ter contribuído para as discretas diferenças observadas na porcentagem de crises epiléticas e nos níveis de TBARS em relação ao grupo ME50 (Tabela 8 e Figura 14).

Os resultados desse estudo vêm de forma inovadora demonstrar a capacidade da administração transdérmica de microemulsão contendo fenobarbital em reduzir as crises epiléticas induzidas por pilocarpina e o estresse oxidativo, assim como lesões neuronais consequentes as crises em animais experimentais. Desta forma, a utilização de tal microemulsão pode ter potencial aplicação como um sistema de liberação transdérmico na terapia antiepilética, podendo minimizar a variação interindividual na farmacocinética do fenobarbital na pediatria quando administrado por via oral (SWEETMAN, 2007), bem como facilitar a adesão terapêutica na sua utilização crônica. No entanto, estudos adicionais são necessários de forma a melhor avaliar as diferenças observadas em relação à via oral em termos de biodisponibilidade em roedores e a capacidade da microemulsão de permear tecidos epidérmicos semelhantes à pele humana.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados desse estudo, foi observado que o fenobarbital incorporado em microemulsão foi capaz de aumentar a latência para a instalação das crises epiléticas, reduzir o seu percentual e o número de mortes, bem como reduziu o estresse oxidativo e as lesões neuronais em hipocampo de ratos. Esses achados reforçam a hipótese do uso da microemulsão contendo fenobarbital como nanocarreador com potencial aplicação para utilização transdérmica no tratamento da epilepsia.

REFERÊNCIAS

BETTING, L. E.; KOBAYASHI, E.; MONTENEGRO, M. A.; MIN, L. L.; CENDES, F.; GUERREIRO, M. M.; GUERREIRO, C. A. M. Tratamento de epilepsia: consenso dos especialistas brasileiros. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, p. 1045-1070, 2003.

BONINA, F. P.; MONTENEGRO, L.; MICALI, G.; WEST, D. P.; PALICHARLA, P.; KOCH, R. L. In vitro percutaneous absorption evaluation of phenobarbital through hairless mouse, adult and premature human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 98, n. 1-3, p. 93-99, 1993.

BRODIE, M. J.; KWAN, P. Current position of phenobarbital in epilepsy and its future. **Epilepsia**, v. 53, n. 8, p. 40-46, 2012.

CAVALHEIRO, E. A.; SILVA, D. F.; TURSKI, W. A.; CALDERAZZO-FILHO, L. S.; BORTOLOTTI, Z. A.; TURSKI, L. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. **Developmental Brain Research**, v. 37, p. 43-58, 1987.

CLIFFORD, D. B.; PODOLSKY, A.; ZORUMSKI, C. F. Acute effects of lithium on hippocampal kindled seizures. **Epilepsia**, v. 26, n. 6, p. 689-92, 1985.

COSTA, J. P.; FERREIRA, P. B.; SOUSA, D. P.; JORDAN, J.; FREITAS, R. M. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience Letters**. v. 523, n. 2, p. 115-118, 2012

DALMORA, S. L.; SANGOI, M. S.; NOGUEIRA, D. R.; D'AVILA, F. B.; MORENO, R. A.; SVERDLOFF, C. E.; OLIVEIRA, R. A.; BORGES, N. C. Determination of phenobarbital in human plasma by a specific liquid chromatography method: application to a bioequivalence study. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 124-129, 2010.

DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011

DJABRI, A.; GUY, R.H.; DELGADO-CHARRO, M.B. Passive and iontophoretic transdermal delivery of phenobarbital: Implications in paediatric therapy. **International Journal Pharmaceutics**, v. 435, n. 1, p. 76-82, 2012.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DYMOND, A. M.; CRANDALL, P. H. Oxygen availability and blood flow in the temporal lobes during spontaneous epileptic seizures in men. **Brain Research**, v. 102, n. 1, p. 191-196, 1976.

FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods of Enzymology**, v. 105, p. 93-104, 1984.

FOUAD, S. A.; BASALIOUS, E. B.; EL-NABARAWI, M. A.; TAYEL, S. A. Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: In vitro/in vivo evaluation. **Pharmaceutical Nanotechnology**, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.009>

FREITAS, R.M. Sistemas de Neurotransmissão Envolvidos no Modelo de Epilepsia: Uma Revisão de Literatura. **Revista de Neurociências**, v. 19, n. 1, p. 128-138, 2011.

FREITAS, R.M.; SOUSA, F.C.; VIANA, G. S.; FONTELES, M. M. Effect of gabaergic, glutamatergic, antipsychotic and antidepressant drugs on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. **Neuroscience Letters**, v. 408, n. 2, p. 79-83, 2006.

FREITAS, R.M., VASCONCELOS, S.M.M.; SOUZA, F.C.F.; VIANA, G.S.B., FONTELES M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. **The Febs Journal**, v. 272, n. 6, p. 1307-1312, 2005.

GOMES, M. D. M.; ZEITOUNE, R. G.; KROPF, L. A. L.; VAN BEECK, E. S. A house-to-house survey of epileptic seizures in an urban community of Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, p. 708-711, 2002.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. "Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science (New York, NY)**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, 1981.

GUILHOTO, L. M. F. F.; MUSZKAT, R. S.; YACUBIAN, E. M. T. Consenso terminológico da associação brasileira de epilepsia. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, p. 175-177, 2006.

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Homeostasis**, v. 23, n. 1, p. 118-126, 1993.

JELVEGHARI, M.; NOKHODCHI, A. Development and Chemical Stability Studies of Alcohol-Free Phenobarbital Solution for Use in Pediatrics: a Technical Note. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 3, p. 939-943, 2008.

KANASHIRO, A. L. A. N. **Epilepsia: prevalencia, características epidemiológicas e lacuna de tratamento farmacológico**. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

KUDIN, A. P.; BIMPONG-BUTA, N. Y.; VIELHABER, S.; ELGER, C. E.; KUNZ, W. S. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. **The Journal Biological Chemistry**, v. 279, n. 6, p. 4127–4135, 2004.

LIU, Y-F.; GAO, F.; LI, X-W.; JIA, R-H.; MENG, X-D.; ZHAO, R.; JING, Y-Y.; WANG, Y.; JIANG, W. The Anticonvulsant and Neuroprotective Effects of Baicalin on Pilocarpine-Induced Epileptic Model in Rats. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 8, p. 1670–1680, 2012.

MOOLENAAR, F.; KONING, B.; HUIZINGA, T. Biopharmaceutics of rectal administration of drugs in man 7. Absorption rate and bioavailability of phenobarbital and its sodium salt from rectal dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 4, n. 2, p. 99-109, 1979.

MORANTES, M.; VARGAS, M.; FIGUEROA, F. S.; SIERRA, N.; BARBOSA, H. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de fenobarbital en una suspensión extemporánea. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 39, n.1, p. 68-78, 2010.

MORENO, L. C. G. A. I.; FREITAS, R. M.; MAGALHÃES, N. S. S.; SANTOS, H. M. L. R. Evaluation of anticonvulsant effect of LCN on pilocarpine-induced seizures. In: **Committee**

of the **International Congress of Pharmaceutical Sciences**, 2011, Ribeirão Preto. Committee of the International Congress of Pharmaceutical Sciences. Ribeirão Preto: CIPHARP, 2011.

NASCIMENTO, A. L. **Avaliação temporal de neurônios Fluoro-Jade B positivos na formação hipocampal de camundongos após indução do status epilepticus por pilocarpina**. 89 f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

NOKHODCHI A, SHOKRI J, DASHBOLAGHI A, HASSAN-ZADEH D, GHAFOURIAN T, BARZEGAR-JALALI M. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 2, p. 359-369, 2003.

ODRIA, S.; STUPARB, M.; J. KRISTLC, I. KLEBOVICH, I. ANTALA. *In vitro – in vivo* correlation study of transdermal gel preparations containing phenobarbital sodium. **Posters/European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 163-164, 2005.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

PASTORE, M. E.; OFUCHI, A. S.; NISHIYAMA, P. Monitorização terapêutica de fenobarbital. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 29, n. 2, p. 125-131, 2007.

PITKANEN, A. Efficacy of current antiepileptics to prevent neurodegeneration in epilepsy models. **Epilepsy Research**, v. 50, n. 1-2, p. 141–160, 2002.

PUGLIA, C.; BONINA, F.; TRAPANI, G.; FRANCO, M.; RICCI, M. Evaluation of in vitro percutaneous absorption of lorazepam and clonazepam from hydro-alcoholic gel formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 79-87, 2001.

SABALE, V.; VORA, S. Formulation and evaluation of microemulsion-based hydrogel for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 3, p. 140–149, 2012.

SCORZA, F.A., ARIDA, R.M.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; SCERNI, D. A.; CALDERAZZO, L.; CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 345-365, 2009.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R., DAMASCENO, B. P. G. L., MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. M. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.

SWEETMAN, S. **Martindale: The Complete Drug Reference**. 35 ed. Pharmaceutical Press, Londres, 2007.

TEICHMANN, A.; HEUSCHKEL, S.; JACOBI, U.; PRESSE, G; NEUBERT, R. H. H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 3, p. 699–706, 2007.

TOMÉ, A. R.; FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M. Neuronal damage and memory deficits after seizures are reversed by ascorbic acid?. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 68, n. 4, p. 579 – 585, 2010.

TOUW, D. J.; GRAAFLAND, O.; CRANENDONK, A.; VERMEULEN, R.J., VAN WEISSENBRUCH, M. M. Clinical pharmacokinetics of phenobarbital in neonates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 111-116, 2000.

TSAI, Y. H.; CHANG, J. T.; CHANG, J. S.; HUANG, C. T.; HUANG, Y. B., WU, P. C. The effect of component of microemulsions on transdermal delivery of buspirone hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2358-2365, 2011.

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W. A.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by

pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v. 3, n. 2, p. 154-171, 1989.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINRONK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavior Brain Research**, v. 9, n. 3, p. 315–336, 1983.

ÜSTÜNDAĞ OKUR, N.; APAYDIN, S.; YAVAŞOĞLU, N. U. K.; YAVAŞOĞLU, A.; KARASULU, H. Y. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 1, p. 136-144, 2011.

WALTON, N. Y.; TREIMAN, D. M. Phenobarbital treatment of status epilepticus in a rodent model. **Epilepsy Research**, v. 4, n. 3, p. 216-222, 1989.

YACUBIAN, E. M. T. Tratamento da epilepsia na infância. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 1, p. 19-27, 2002.

YSKA, J. P.; ESSINK, G. W. G.; BOSCH, F. H.; LANKHAAR, G.; VAN SORGE, A. A. Oral bioavailability of phenobarbital: a comparison of a solution in myvacet 9-08,a suspension, and a tablet. **Pharmacy World & Science**, v. 22, n. 2, p. 67-71, 2000.

YUKAWA, M.; YUKAWA, E.; SUEMATSU, F.; TAKIGUCHI, T.; IKEDA, H.; AKI, H.; MIMEMOTO, M. Population pharmacokinetics of phenobarbital by mixed effect modelling using routine clinical pharmacokinetic data in Japanese neonates and infants: an update. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 704-710, 2011.

ZHAO, X.; LIU, J. P., ZHANG, X.; LI, Y. Enhancement of transdermal delivery of theophylline using microemulsion vehicle. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 327, n. 1–2, p. 58-64, 2006.

6. CAPÍTULO III

MICROEMULSÕES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS PARA A VIA TRANSDÉRMICA: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

(Artigo submetido ao periódico *Revista Geintec Gestão Inovação e Tecnologias* - Qualis B5)

**MICROEMULSÕES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS PARA A
VIA TRANSDÉRMICA: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA**

**Kayo Alves Figueiredo^{*}, Rosana Mírian Barros Mendes, André Luis Menezes Carvalho,
Rivelilson Mendes de Freitas**

Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Campus

Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, 64049-550, Teresina-PI, Brasil

RESUMO

Nos últimos anos, inúmeras estratégias vêm sendo utilizadas para promover a penetração cutânea de fármacos e estas vêm sendo protegidas por patentes. Sistemas de liberação de fármacos (SLF), como as microemulsões, possuem inúmeras vantagens, como aumento da solubilização e do transporte extravascular e transdérmico de princípios ativos. Esta prospecção tecnológica objetivou realizar um levantamento nas principais bases de patentes de SLF que continham microemulsões para uso transdérmico. Os principais documentos de patentes encontrados foram oriundos de pesquisas nos Estados Unidos e na China. Não foi encontrada nenhuma patente de origem brasileira. Fármacos de diversas classes terapêuticas foram encontrados na busca nas bases de dados, com predomínio dos AINES. Os novos SLF, como as microemulsões, são um campo de pesquisa em potencial para as Universidades e Centros de Pesquisa do país, tendo em vista que o Brasil vem incentivando e financiando a busca de novas tecnologias, principalmente na área de nanotecnologia farmacêutica.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Patentes. Microemulsão. Transdérmico.

ABSTRACT

In recent years, numerous strategies have been used to promote skin penetration of drugs, and this has been protected by patents. Drug delivery systems (DDS), as microemulsions, have many advantages such as increased solubility and extravascular transport and transdermal of drugs. This prospection technology aims to conduct a survey in major patent databases DDS containing microemulsions for transdermal use. The main patent documents were found arising from research in the United States and China. We found no patent Brazilian origin. Several therapeutic classes of drugs were found in the search in databases, with a prevalence of NSAIDs. New DDS as microemulsions is a potential field of research for Universities and Research Centers in our country, considering that Brazil is encouraging and funding the search for new technologies, especially in the area of pharmaceutical nanotechnology.

Key-words: Nanotechnology. Patents. Microemulsion. Transdermal.

INTRODUÇÃO

Inovações na área de sistemas de liberação de fármacos (SLF) estão surgindo a um ritmo muito mais rápido em relação às duas últimas décadas. A melhoria da adesão terapêutica e da eficácia do tratamento são benefícios importantes com a busca por formulações inovadoras no campo da terapia farmacológica (SVIRSKIS et al., 2013; TIRNAKSIZ et al., 2012; TIWARY; SAPRA; JAIN, 2007). A via de administração transdérmica tem sido reconhecida como uma via altamente potencial para a administração de fármacos (ELSHAFEEY et al. 2012). Os SLF para administração transdérmica oferecem vantagens em relação a outras vias de administração, como a via oral: ausência de metabolismo de primeira passagem, ser não invasiva, mais cômodo ao paciente e possibilidade de liberação controlada do fármaco (SUBEDI et al. 2010; GALLO, 1989).

A principal limitação da via transdérmica é a penetração cutânea, tendo em vista que as camadas da pele fornecem uma grande resistência às moléculas penetrantes, com a principal barreira exercida pelo estrato córneo. Para atingir e manter a concentração sérica do fármaco em níveis terapêuticos, esta barreira necessita ser superada, demonstrando ser um grande desafio para o desenvolvimento de formulações transdérmicas (SAPRA; JAIN; TIWARY, 2008).

Nos últimos anos, inúmeras estratégias vêm sendo utilizadas para promover a penetração através da pele e mucosas de fármacos e estas vêm sendo protegidas por patentes: através de métodos físicos, como a iontoforese (ROY, 2012), sonoforese (RIZWAN et al. 2009) e microagulhas (BADRAN; KUNTSCHE; FAHR, 2009); e métodos químicos, como o uso de filmes adesivos (YELLANKI; JAGTAP; MASAREDDY, 2011), promotores de permeação (BURNETT; KURTZ, 2012), géis (SITRUK-WARE; CARRARA; GRENIER, 2011), emulsões (CHOW; YING; GAO, 2010) e microemulsões (DELGADO; FERNANDEZ; VILADOT, 2012; MEHTA; KAUR, 2010).

As microemulsões são conhecidas por serem sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, composta por mistura de água e óleo e estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água (ZHU et al. 2008; LAWRENCE, 1994). SLF coloidais, como as microemulsões, possuem inúmeras vantagens, como: aumento da solubilização e das taxas de dissolução de fármacos; protegem moléculas instáveis da degradação; promovem liberação controlada e sustentada; possuem elevada superfície de contato, facilitando, assim, o transporte extravascular e transdérmico de princípios ativos (DAMASCENO et al., 2011; WESTESEN et al., 2001).

O estudo de SLF como as microemulsões tem sido muito relevante na área farmacêutica, já que podem proporcionar alternativas terapêuticas modernas, farmacologicamente mais eficientes e com redução de efeitos adversos, a partir de fármacos já existentes, muitas vezes pouco utilizados em razão de sua potencial toxicidade (OLIVEIRA et al., 2004).

Considerando que os sistemas microemulsionados vêm sendo objeto de várias patentes em todo o mundo (MEHTA; KAUR, 2010; RIZWAN et al. 2009; BALI et al. 2008), esta prospecção tecnológica objetiva realizar um levantamento nas principais bases de patentes de SLF que contenham microemulsões para uso transdérmico.

METODOLOGIA

A prospecção tecnológica foi realizada com base nos pedidos de patentes depositados nas seguintes bases: European Patent Office (EPO); World Intellectual Property Organization (WIPO); United States Patent and Trademark Office (USPTO); Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. A pesquisa foi realizada em 24 de junho de 2013. Foram utilizados os seguintes descritores no campo busca de patentes: *Microemulsão/Microemulsion AND Transdérmico/ Transdermal*. Foi realizada a leitura exploratória dos títulos e dos resumos e foram selecionados os pedidos de patentes até o presente momento que contemplassem resultados de desenvolvimento tecnológico de microemulsões contendo fármacos para uso transdérmico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na busca realizada nas bases de patentes, na base do INPI foi depositada apenas 1 patente, enquanto no EPO foram depositadas 15 patentes. Na WIPO e USPTO, foram encontradas um número de 3 (Figura 18).

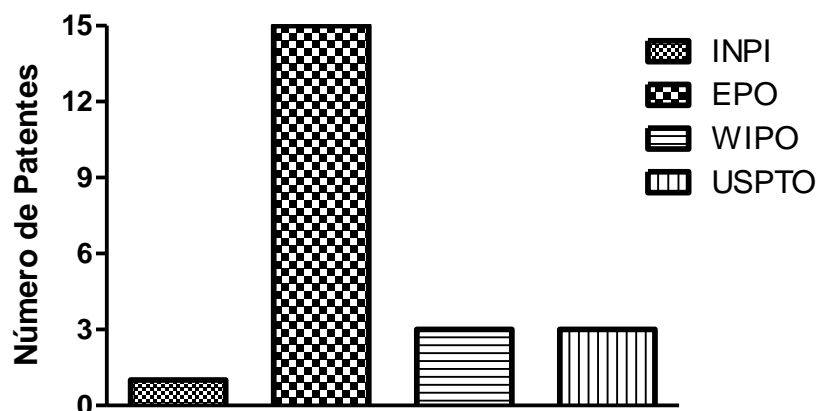


Figura 18: Número de patentes depositadas por base de dados.

Fonte: Autoria própria (2013).

Na distribuição das patentes encontradas por país de origem, os Estados Unidos e China são os maiores detentores de patentes envolvendo microemulsões para uso transdérmico, com 3 e 10 patentes, respectivamente (Figura 19). Os outros países, envolvendo 3 europeus e 2 asiáticos, somaram um total de 6 patentes. China, Japão e República da Coréia possuem quase 70% das patentes depositadas. Esses resultados demonstram os grandes investimentos de países asiáticos, como a China, em inovação tecnológica na área de ciências farmacêuticas (GORGULHO, 2013).

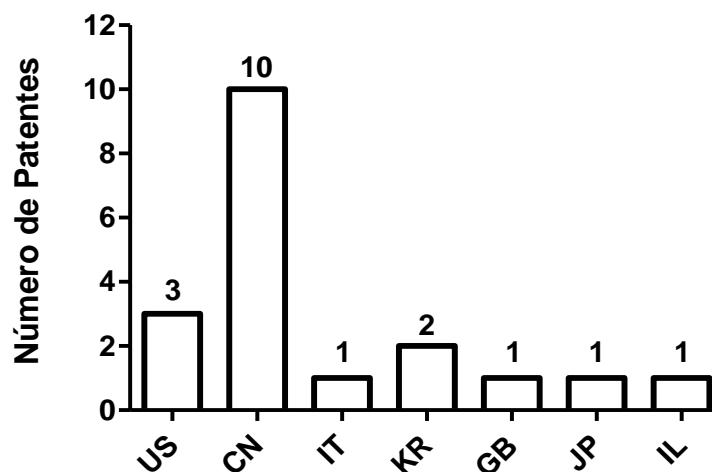


Figura 19: Distribuição das patentes depositadas por país de origem. US (Estados Unidos); CN (China); IT (Itália); KR (República da Coréia); GB (Grã-Bretanha); JP (Japão); IL (Israel).

Fonte: Autoria própria (2013).

Na Figura 20, foi observada a evolução do número de depósitos de invenções envolvendo microemulsões para aplicação transdérmica nos últimos anos, com um decréscimo no ano de 2012. Todas as patentes encontradas estão inseridas na subclasse A61K, que engloba preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas.

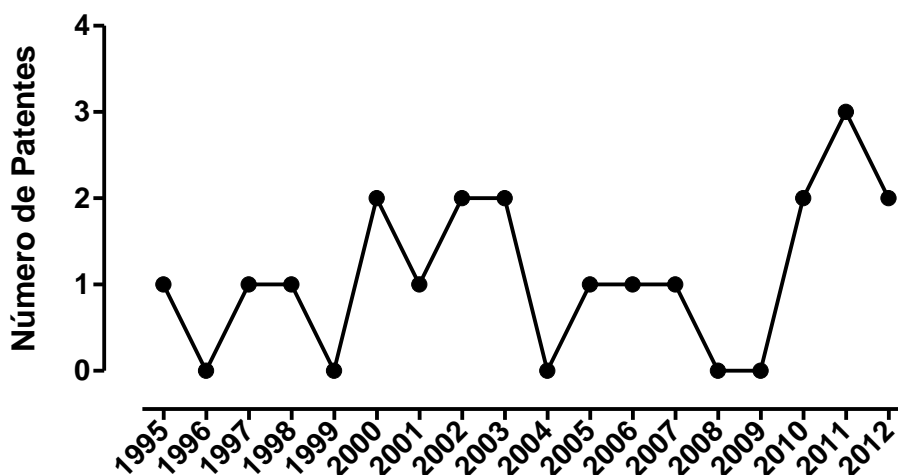


Figura 20: Evolução anual de depósitos de pedido de patente.

Fonte: Autoria própria (2013).

As microemulsões vêm se destacando como SLF potenciais para proporcionar a penetração cutânea de diversos fármacos: anti-inflamatórios não esteroideais (AINES), como meloxicam (YUAN et al. 2006), diclofenaco (SILVA et al., 2009) e naproxeno (ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011); antineoplásicos, como paclitaxel (HE; WANG; ZANG, 2003); e outras classes, como bupiriona (TSAI et al., 2011), lidocaína (YUAN et al. 2010) e teofilina (ZHAO et al. 2006). Alguns pedidos de patentes de fármacos em microemulsões são descritos na literatura: US6159933, contendo ciclosporina (SHERMAN, 2000); retinóides em US7781489 (BELLATO et al. 2010); EP2097073 contendo propofol para uso parenteral (PACHECO; MOREIRA; RIZZI, 2009).

Fármacos de diversas classes terapêuticas foram encontrados na busca nas bases de dados, com predomínio dos AINES (Figura 21). A utilização de uma via de administração alternativa, como a transdérmica, proporciona a redução de efeitos adversos gastrintestinais decorrentes da administração oral dos AINES e uma melhora da sua tolerabilidade (YUAN et al., 2006). Dessa forma, a utilização de uma via de administração alternativa pode permitir o seu uso no tratamento de condições crônicas, como as doenças reumatológicas, em pacientes com úlcera gástrica (DAVIES; SKJODT, 1999). Além disso, as microemulsões administradas

de forma transdérmica podem possibilitar uma liberação controlada desses fármacos (ÜSTÜNDAĞ OKUR et al., 2011).

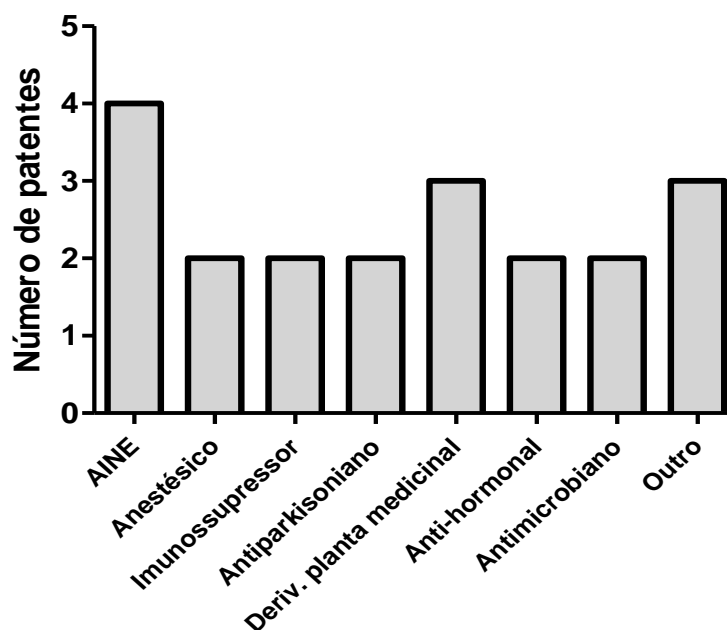


Figura 21: Classes terapêuticas dos fármacos incorporados em microemulsões para aplicação transdérmica.

Fonte: Autoria própria (2013).

Na Tabela 10, observa-se o resultado de patentes de microemulsões com evidências de permeação transdérmica para algumas classes de fármacos, como AINES, antigotosos, hipoglicemiantes e até mesmo extratos de plantas medicinais. Os documentos de patentes descrevem as microemulsões como sistemas termodinamicamente estáveis, transparentes, não irritantes para a pele e que diminuem a toxicidade dos fármacos em certos órgãos e promovem a sua permeação transdérmica. Essas características especiais tornam mais vantajoso o uso desses SLF em relação a formulações convencionais.

Os sistemas microemulsionados contendo fármacos para administração transdérmica podem compor SLF em adesivos transdérmicos (*patches*) através de sistemas reservatórios ou incorporados em matrizes poliméricas (ZHAO et al., 2011). A utilização de tais formas farmacêuticas proporciona comodidade na sua administração e possibilidade de liberação controlada, além da interrupção da dose quando necessário.

Os tensoativos têm importante papel na formação das microemulsões, pois diminuem a tensão interfacial para valores mais baixos do que nas emulsões convencionais (HO; HO;

SHEU, 1996). Os principais tensoativos encontrados na busca de patentes são não iônicos, anfóteros e apresentam uma propriedade interessante para a administração transdérmica: a baixa irritabilidade cutânea (HEUSCHKEL; GOEBEL; NEUBERT, 2008). Foram encontrados os polissorbatos e os derivados do ácido capríco/caprílico labrasol[®] (caprilocaproil macrogol-8 glicérido), labrafil[®] (oleoil macrogol-6 glicérido) e labrafac[®] (propilenoglicol dicaprilocaprato), tensoativos desenvolvidos por uma multinacional francesa (GATTEFOSSE, 2013).

Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a permeação transdérmica de fármacos a partir de microemulsões: aumento da atividade termodinâmica do fármaco; ação dos componentes da microemulsão como promotores de permeação; aumento da hidratação da pele (WILLIAMS; BARRY, 2004). O alto conteúdo de tensoativo pode promover a desestruturação do estrato córneo e facilitar a penetração cutânea de diversas moléculas (SILVA et al., 2010; ZHU et. al, 2008). Além dos tensoativos, os constituintes da fase oleosa podem ter um importante papel como promotores da permeação transdérmica (NOKHODCHI et al. 2003), como os ésteres derivados de ácidos graxos miristato de isopropila e palmitato de isopropila e o ácido oléico, que foram encontrados em algumas patentes, conforme Tabela 10.

Não foi encontrada nenhuma patente de origem brasileira, demonstrando, assim, a carência no Brasil de pesquisas e proteção patentária dos SLF desenvolvidos, como as microemulsões. As dificuldades são grandes nas Universidades do país na área de tecnologia farmacêutica de sistemas microemulsionados: muitas delas não possuem os equipamentos necessários para realização de caracterização físico-química, assim como é alto o custo de aquisição dos tensoativos de origem francesa

Os países desenvolvidos vêm investindo em formulações mais cômodas ao paciente que facilitem a adesão terapêutica e reduzam problemas com biodisponibilidade/reações adversas. O aumento de investimentos na área de nanotecnologia aplicada a novas formas farmacêuticas é essencial para o desenvolvimento do Brasil no campo da terapia farmacológica. No entanto, a expansão e estruturação das universidades brasileiras assim como a criação de programas de pós-graduação *stricto sensu* e o lançamento de editais de financiamento para a produção científica e tecnológica na área de fármacos e medicamentos vêm abrindo portas para as pesquisas envolvendo novos SLF em várias regiões do país.

Tabela 10: Algumas patentes de microemulsões para uso transdérmico.

Fármaco	Aplicação	Constituintes da microemulsão	Inferências	Nº patente
Colchicina	Antigotoso	Lecitina de ovo, álcool propílico, brometo de hexadeciltrimetilamônio, éster do ácido isopropílico.	Promove a permeação cutânea do fármaco, além da redução dos efeitos adversos no fígado e rim decorrentes da administração oral.	CN102366403
<i>Tripterygium wilfordii</i>	Tratamento de doenças autoimunes	Polissorbato, álcool propílico, ácido oléico, água.	Microemulsão com derivado de planta medicinal que apresenta reduzida irritabilidade cutânea, modo de preparo de fácil execução, boas características de permeação cutânea e de estabilidade.	CN102462723
Tamoxifeno	Antiestrogênico	Polissorbato 80, propilenoglicol, ácido oléico, água.	Sistema transparente, termodinamicamente estável e excelente efeito transdérmico.	CN1857242
Apomorfina	Tratamento da doença de Parkinson	Decanol, dodecanol, propilenoglicol, miristato de isopropila, água, álcool benzílico, Cremophor EL, polissorbato 20, entre outros.	O fármaco foi facilmente solubilizado no sistema e apresentou boa permeação <i>in vitro</i> . Formulação útil no tratamento de doenças crônicas como o Parkinson.	EP1270007
Lidocaína	Anestésico local para o tratamento da ejaculação precoce	Polissorbato, óleo de castor, cremophor, etanol, álcool benzílico e isopropílico, miristato de isopropila, Labrafac CC, Labrafil M1944CS, Labrafil WL2609BS, carbopol, água, entre outros.	Microemulsão hidrogel que, além de retardar a ejaculação, apresenta vantagens como: é suave, agradável ao tato, fácil de lavar e não apresenta irritação quando aplicado à pele.	KR0013248
Insulina	Hipoglicemiante	Palmitato de isopropila, oleato de glicerila, carbonato de propileno, labrasol.	Microemulsão contendo carbonato de propileno foi capaz de melhorar a biodisponibilidade da insulina após administração intranasal.	EP2120863
Cetoprofeno	AINE	Polissorbato 80, polivinil pirrolidona/acetato de vinila, PEG 4000, poliacrilato, água, entre outros.	Adesivo transdérmico contendo fármaco antiinflamatório incorporado em microemulsão e que apresenta excelente absorção transdérmica e boa aderência na pele, não apresentando irritação dérmica.	US6455067

Fonte: Autoria própria (2013). AINE: antiinflamatório não esteroideal. PEG: polietilenoglicol.

CONCLUSÃO

Os principais documentos de patentes encontrados foram oriundos de pesquisas nos Estados Unidos e em países asiáticos, como a China. Fármacos de diversas classes terapêuticas foram encontrados na busca nas bases de dados, com predomínio dos AINES. As microemulsões encontradas apresentam características importantes para a administração transdérmica, como a baixa irritabilidade dérmica. Os novos SLF, como as microemulsões, são um campo de pesquisa em potencial para as Universidades e Centros de Pesquisa do país, tendo em vista que o Brasil vem incentivando e financiando a busca de novas tecnologias, principalmente na área de nanotecnologia farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- BADRAN, M. M.; KUNTSCHE, J.; FAHR, A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 4, p. 511-523, 2009.
- BALI, V.; BHAVNA; ALI, M.; BABOOTA, S.; ALI, J. Potential of microemulsions in drug delivery and therapeutics: a patent review. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 2, n. 2, p. 136 - 144, 2008.
- BELLATO, P.; CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; GENNARI, G.; MENEGATTI, E. Microemulsions of retinoids, and pharmaceutical compositions containing them. US7781489, 24 ago. 2010.
- BURNETT, K. M.; KURTZ, E. S. Anhydrous topical skin preparations. US0321574, 20 dez. 2012.
- CHOW, E. P. Y.; YING, J. Y.; GAO, S. J. Emulsions for transdermal delivery. WO123564, 28 out. 2010.
- DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.
- DAVIES, N. M.; SKJODT, N. M. Clinical pharmacokinetics of meloxicam. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 36, n. 2, p.115–126, 1999.

DELGADO, G. R.; FERNANDEZ, B. A.; VILADOT, P. J. L. Nanocapsules containing microemulsions. WO2012038061, 29 mar. 2012.

ELSHAFEEY, A. H.; HAMZA, Y. E.; AMIN, S. Y.; ZIA, H. *In vitro* transdermal permeation of fenoterol hydrobromide. **Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 2, p. 125-132, 2012.

GALLO, R. L. Transdermal Drug Delivery: Development Issues and Research Initiatives. **Archives of Dermatology**, v. 125, n. 10, p. 1449, 1989.

GATTEFOSSE. **Solubilizers / skin penetration enhancers**. Disponível em: <<http://www.gattefosse.com/en/applications/?administration-route,topical,solubilizers-skin-penetration-enhancers>> . Acesso: 06 jul 2013.

GORGULHO, G. P&D na indústria farmacêutica: Crise no desenvolvimento de novas moléculas e potencial de mercado colocarão China na liderança do setor farmacêutico. **Inovação Unicamp**, 2010. Disponível em: <<http://www.inovacao.unicamp.br/report/noticias/index.php?cod=835>>. Acesso: 01 jul 2013.

HE, L.; WANG, G-L.; ZHANG, Q. An alternative paclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 2, p. 45 - 50, 2003.

HEUSCHKEL, S.; GOEBEL, A.; NEUBERT, R. H. Microemulsions—modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 2, p. 603-631, 2008.

HO, H.; HO, C. C SHEU, M. T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. **Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 85, n. 2, p. 138-43, 1996.

LAWRENCE, M. J. Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. **European Journal of Drug Metabolism Pharmacokinetics**, v. 19, n. 3, p. 257 - 269, 1994.

MEHTA, S. K.; KAUR, G. Microemulsions as carriers for therapeutic molecules. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 4, n. 1, p. 35-48, 2010.

NOKHODCHI, A.; SHOKRI, J.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; BARZEGAR-JALALI, M. The enhancement effect of surfactants on

the penetration of lorazepam through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 2, p. 359-369, 2003.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

PACHECO, O.; MOREIRA, R.; RIZZI, M. Stable and ready-to-use oil-in-water propofol microemulsion. EP2097073, 9 set. 2009.

RIZWAN, M.; AQIL, M.; TALEGAONKAR, S.; AZEEM, A.; SULTANA, Y.; ALI, A. Enhanced transdermal drug delivery techniques: an extensive review of patents. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, n. 2, p. 105-124, 2009.

ROY, P. Irritation-reducing ocular iontophoresis device. US8306613, 6 nov. 2012.

SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A. K. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: mechanistic view. **The AAPS Journal**, v. 10, n. 1, p. 120-132, 2008.

SHERMAN, B. C. Emulsion preconcentrate comprising a cyclosporin, propylene carbonate, and glycerides. US6159933, 12 dez. 2000.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R., DAMASCENO, B. P. G. L., MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p.125-131, 2010.

SITRUK-WARE, R.; CARRARA, D. N. R.; GRENIER, A. Nestorone®/estradiol transdermal gel. WO084668, 14 jul., 2011.

SUBEDI, R. K.; OH, S.; CHUN, M. K.; CHOI, H. K. Recent advances in transdermal drug delivery. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 3, p. 339-351, 2010.

SVIRSKIS, D.; SEYFODDIN, A.; CHALABI, S.; IN KIM, J. H.; LANGFORD, C.; PAINTER, S.; AL-KASSAS, R. Development of mucoadhesive floating hollow beads of acyclovir with gastroretentive properties. **Pharmaceutical Development and Technology**, 2013. doi: doi:10.3109/10837450.2013.813539.

TIRNAKSIZ, F.; KAYIŞ, A.; ÇELEBI, N.; ADIŞEN, E.; EREL, A. Preparation and evaluation of topical microemulsion system containing metronidazole for remission in rosacea. **Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 60, n. 5, p. 583 - 592, 2012.

TIWARY, A. K.; SAPRA, B.; JAIN, S. Innovations in transdermal drug delivery: formulations and techniques. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 1, n. 1, p.23-36, 2007.

TSAI, Y. H.; CHANG, J. T.; CHANG, J. S.; HUANG, C. T.; HUANG, Y. B., WU, P. C. The effect of component of microemulsions on transdermal delivery of buspirone hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2358-2365, 2011.

ÜSTÜNDAĞ OKUR, N.; APAYDIN, S.; YAVAŞOĞLU, N. U. K.; YAVAŞOĞLU, A.; KARASULU, H. Y. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 1, p. 136-144, 2011.

WESTESEN, K.; BUNJES, S.; HAMMER, G.; SIEKMANN, B. Novel colloidal drug delivery systems. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 55, n. 4, p. 240-247, 2001.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, 603–618, 2004.

YELLANKI, S.; JAGTAP, S.; MASAREDDY, R. Dissofilm: a novel approach for delivery of phenobarbital; design and characterization. **Journal of Young Pharmacists: JYP**, v. 3, n. 3, p. 181 - 188, 2011.

YUAN, J. S.; YIP, A.; NGUYEN. N.; CHU, J.; WEN, X. Y.; ACOSTA, E. J. Effect of surfactant concentration on transdermal lidocaine delivery with linker microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, n. 1, p. 274-284, 2010.

YUAN, Y.; LI, S. M.; MO, F. K.; ZHONG, D. F. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, n. 1, p. 117-123, 2006.

ZHAO, J-H.; JI, L.; WANG, H.; CHEN, Z-Q; ZHANG, Y-Q; LIU, Y.; FENG, N-P. Microemulsion-based novel transdermal delivery system of tetramethylpyrazine: preparation and evaluation in vitro and in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1611, 2011.

ZHAO, X.; LIU, J. P.; ZHANG, X.; LI, Y. Enhancement of transdermal delivery of theophylline using microemulsion vehicle. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 327, n. 1, p. 58-64, 2006.

ZHU, W.; YU, A; WANG, W.; DONG, R.; WU, J.; ZHAI, G. Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 360, n. 1, p. 184-190, 2008.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, foi possível obter uma microemulsão com excelente incremento da solubilidade do fármaco fenobarbital, com valor superior a uma recente publicação com microemulsão oral. A incorporação do fenobarbital nas concentrações de 5 e 10% não alterou o pH e a resistência à centrifugação. Houve aumento do tamanho da partícula, redução da condutividade e alteração do índice de refração em relação à microemulsão placebo. A microemulsão apresentou viscosidade 200 vezes inferior à emulsão convencional e isto pode ser um dos fatores que influenciam na superioridade da liberação *in vitro* do sistema microemulsionado. Além disso, ela se manteve estável físico-quimicamente por 30 dias à temperatura ambiente e quando foi submetida ao teste de estresse térmico e teste de ciclo gelo-desgelo.

Foi desenvolvido um método analítico de determinação do fármaco em microemulsão de fácil execução, barato e seguro, tendo em vista ser realizado por espectrofotometria e utiliza reagentes de baixo custo e de pequena toxicidade. Este é um importante método de controle de qualidade que pode ser aplicado em pequenos laboratórios.

Por último, foi demonstrada a capacidade da microemulsão contendo fenobarbital em reduzir tanto as crises epiléticas, quanto as suas consequências, como a morte, o estresse oxidativo gerado e lesões neuronais em uma importante área cerebral dos animais no estudo. Essa atividade farmacológica foi superior à emulsão utilizada de forma comparativa e a microemulsão obteve uma quantidade liberada de fármaco 4,8 vezes maior em 24 h, o que reforça a hipótese do potencial deste sistema como um excelente sistema de liberação de fármacos para a via transdérmica, tendo em vista suas inúmeras características especiais.

Desta forma, a microemulsão obtida tem potencial para a liberação do fármaco com futura aplicação transdérmica no tratamento da epilepsia e está em processo de depósito um pedido de patente de invenção que contém um sistema de liberação de fármacos para tratamento da epilepsia, fruto desta dissertação de mestrado.

REFERÊNCIAS

AMORIM, M. M. R.; LIPPO, L. A. M.; COSTA, A. A. R.; COUTINHO, I. C.; SOUZA, A. S. R. Nitroglicerina transdérmica versus nifedipina oral para inibição do trabalho de parto prematuro: ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 11, p. 552-558, 2009.

ANVISA. Consulta de Produtos – Medicamentos. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp> . Acesso em: 21 mar. 2013.

ARAÚJO, E. S. **Caracterização elétrica e óptica de transições de fase em colóides e microemulsões**. 2009. 141 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Juazeiro – BA, 2009.

BEN-ARI, Y., TREMBLAY, E., RICHE, D., GHILINI, G., NAQUET, R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculdeoxyglucose or pentylenetetrazole: metabolite mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 6, p. 1361-1391, 1981.

BETTING, L. E.; KOBAYASHI, E.; MONTENEGRO, M. A.; MIN, L. L.; CENDES, F.; GUERREIRO, M. M.; GUERREIRO, C. A. M. Tratamento de epilepsia: consenso dos especialistas brasileiros. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 4, p. 1045-1070, 2003.

BIALER, M. Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 10, p. 887–895, 2012.

BONINA, F. P.; MONTENEGRO, L.; MICALI, G.; WEST, D. P; PALICHARLA, P.; KOCH, R. L. In vitro percutaneous absorption evaluation of phenobarbital through hairless mouse, adult and premature human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 98, n. 1-3, p. 93-99, 1993.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5^a. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010b, v. 2.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Formulário terapêutico nacional 2010**: Rename 2010. 2. ed. Brasília, Ministério da Saúde, 2010c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 492, de 23 de setembro de 2010. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

BRODIE, M. J.; KWAN, P. Current position of phenobarbital in epilepsy and its future. **Epilepsia**, v. 53, n. 8, p. 40-46, 2012.

BROWN, I.; SHEERAN, P.; REUBER, M. Enhancing antiepileptic drug adherence: A randomized controlled trial. **Epilepsy Behavior**, v. 16, n. 4, p. 634-639, 2009.

CALLEJON, D. R.; RIOS, D. R. A.; FRANCESCHINI, S. A.; TOLOI, M. R. T. Transdermal Estradiol and Lipid Profile: Effects on a Specific Group of Brazilian Postmenopausal Women. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 6, p. 571-575, 2009.

CARVALHO, A. L. M.; SOUSA, V. R. ; SOUSA, D. M. P. ; OLIVEIRA, E. T. ; FIGUEIREDO, K. A.; SILVA, A. S. Therapeutic adherence to levothyroxine in patients undergoing total thyroidectomy. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 31, n. 8, p. 1089-1095, 2012.

CAVALHEIRO, E. A. SILVA, D. F.; TURSKI, W. A.; CALDERAZZO-FILHO, L. S.; BORTOLOTTI, Z. A.; TURSKI, L. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. **Developmental Brain Research**, v. 37, n. 1, p. 43-58, 1987.

DALMORA, S. L.; MAXIMILIANO, S. S.; DANIELE, R. N.; FELIPE, B. D.; RONÍLSON, A. M.; CARLOS EDUARDO, S.; ROGÉRIO ANTONIO, O.; NEY, C. B. Determination of phenobarbital in human plasma by a specific liquid chromatography method: application to a bioequivalence study. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 124-129, 2010.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DJABRI, A.; GUY, R. H.; DELGADO-CHARRO, M. B. Passive and iontophoretic transdermal delivery of phenobarbital: Implications in paediatric therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, n. 1, p. 76-82, 2012.

FREITAS, R. M. **Estudo farmacológico e neuroquímico da fase aguda do processo convulsivo induzido por pilocarpina em áreas cerebrais de ratos adultos**. 2006. 332 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

GEBARA, T. C. E.; VIEIRA, N. W.; MEYER, J. W.; CALICH, A. L. G.; TAI, E. J.; PIERRI, H.; WAJNGARTEN, M.; ALDRIGHI, J. M. Efeitos Cardiovasculares da Testosterona. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 6, p. 644-649, 2002.

GOMES, M. D. M.; ZEITOUNE, R. G.; KROPF, L. A. L.; VAN BEECK, E. S. A house-to-house survey of epileptic seizures in an urban community of Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, p. 708-711, 2002.

GOMES, M. M. Mortalidade Atribuída à Epilepsia, às Suas Doenças Subjacentes ou às Condições Não Relacionadas a Ela: Uma Síntese. **Journal of Epilepsy**, v. 16, n. 3, p. 100-105, 2010.

GOMES, M. M. Mortalidade por epilepsia: Brasil (capitais), 1987-2007. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 69, n. 2, p. 166-169, 2011.

GUILHOTO, L. M. F. F.; MUSZKAT, R. S.; YACUBIAN, E. M. T. Consenso terminológico da associação brasileira de epilepsia. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 3, p. 175-177, 2006.

HE, L.; WANG, G.-L.; ZHANG, Q. An alternative paclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 45-50, 2003.

HO, H.; HSIAO, C. C., SHEU, M. T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. **Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 85, n. 2, p. 138-43, 1996.

HOLMGAARD, R.; NIELSEN, J. P. Dermal absorption of pesticides – evaluation of variability and prevention. **Pesticides Research**, n. 124, 2009.

HOVINGA, C. A.; ASATO, M. R.; MANJUNATH, R.; WHELESS, J. W.; PHELPS, S. J.; SHETH, R. D.; PINA-GARZA, J. E; ZINGARO, W. M.; HASKINS, L. S. Association of non-adherence to antiepileptic drugs and seizures, quality of life, and productivity: Survey of patients with epilepsy and physicians. **Epilepsy & Behavior**, v. 13, n. 2, p. 316-322, 2008.

JALLING, B. Plasma concentrations of phenobarbital in the treatment of seizures in newborns. **Acta Paediatrica**, v. 64, n. 3, p. 514-524, 1975.

JELVEGHARI, M.; NOKHODCHI, A. Development and Chemical Stability Studies of Alcohol-Free Phenobarbital Solution for Use in Pediatrics: a Technical Note. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n.3, p. 939-943, 2008.

KANASHIRO, A. L. A. N. **Epilepsia: prevalencia, características epidemiológicas e lacuna de tratamento farmacológico**. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

KLEIN, T. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose**. 114. f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, 2007.

KLOSE, D.; DELPLACE, C.; SIEPMANN, J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1–2, p. 75–82, 2011.

KOGAN, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Improved solubilization of carbamazepine and structural transitions in nonionic microemulsions upon aqueous phase dilution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 315, n. 2, p. 637-647, 2007.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. S77-S98, 2002.

LAKI, M.; HAJDU, M.; ANTAL, I.; KLEBOVICH, I. Modern pharmaceutical facilities in the formulation of rectal dosage forms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 144, 2005.

LAURETTI, G. R.; MATSUMOTO, M.; MATTOS, A. L.; LANCHOTE, V.; PEREIRA, N. L. Avaliação clínica e laboratorial da cetamina transdérmica, do fentanil transdérmico, da clonidina transdérmica ou suas associações na dor lombar crônica. **Coluna/Columna**, v. 8, n. 4, p. 434-440, 2009.

LAWRENCE, M. J. Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. **European Journal of Drug Metabolism Pharmacokinetics**, v. 19, n. 3, p. 257 - 269, 1994.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 1, p. 89-121, 2000.

LECUE, A; MARÍN, I; SÁNCHEZ DE OCAÑA, E.; VICARIO, E. Fentanilo transdérmico vs morfina oral: eficacia analgésica en pacientes oncológicos. **Gaceta Médica de Bilbao**, v. 98, n. 3, p. 78-83, 2001.

LINEHAN, C.; TELLEZ-ZENTENO, J. F.; BURNEO, J. G.; BERG, A. T. Future directions for epidemiology in epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 1, p. 112-117, 2011.

LYNK BIOTECH. **Transdermal Delivery Technology**. Disponível em: <<http://www.lynk-biotech.com/science-tech-transdermal.html>>. Acesso em: 25 mar. 2013.

MEDICINES. **Phenobarbital Tablets 30 mg, 60 mg**. Disponível em: <<http://xpil.medicines.org.uk/ViewPil.aspx?DocID=18131>> . Acesso em: 03 abr. 2013.

MEHTA, S. K.; KAUR, G. Microemulsions: Thermodynamic and Dynamic Properties. In: TADASHI, M. (Ed.). **Thermodynamics**. Croatia: In Tech., 2011.

MONTEAGUDO, E.; LANGENHEIM, M.; SALERNO, C.; BUONTEMPO, F.; BREGNI, C; CARLUCCI, A. Pharmaceutical optimization of lipid-based dosage forms for the

improvement of taste-masking, chemical stability and solubilizing capacity of phenobarbital. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2013. doi:10.3109/03639045.2013.787536].

MOOLENAAR, F.; KONING, B.; HUIZINGA, T. Biopharmaceutics of rectal administration of drugs in man 7. Absorption rate and bioavailability of phenobarbital and its sodium salt from rectal dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 4, n. 2, p. 99-109, 1979.

MORANTES, M.; VARGAS, M.; FIGUEROA, F. S.; SIERRA, N.; BARBOSA, H. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de fenobarbital en una suspensión extemporánea. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 39, n.1, p. 68-78, 2010.

MORENO, L. C. G. A. I.; FREITAS, R. M.; MAGALHÃES, N. S. S.; SANTOS, H. M. L. R. Evaluation of anticonvulsant effect of LCN on pilocarpine-induced seizures. In: **Committee of the International Congress of Pharmaceutical Sciences**, 2011, Ribeirão Preto. Committee of the International Congress of Pharmaceutical Sciences. Ribeirão Preto: CIPHARP, 2011.

ODRIA, S.; STUPARB, M.; KRISTLC, J.; KLEBOVICH, I.; ANTALA, I. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 163-164, 2005.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

PASTORE, M. E.; OFUCHI, A. S.; NISHIYAMA, P. Monitorização terapêutica de fenobarbital. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 29, n. 2, p. 125-131, 2007.

PUGLIA, C.; BONINA, F.; TRAPANI, G.; FRANCO, M.; RICCI, M. Evaluation of *in vitro* percutaneous absorption of lorazepam and clonazepam from hydro-alcoholic gel formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1-2, p. 79-87, 2001.

ROCHA, G. P.; BATISTA, B. H.; NUNES, M. L. Orientações ao pediatra sobre o manejo das drogas psicoativas e antiepilépticas. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 45-55, 2004.

SAVIO, E. O., FAGIOLINO, P.; PARRILLO, S.; AIACHE, J. M. Biodisponibilidade de uma microemulsão de fenitoína em voluntários sanos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 13, n. 2, p. 79-83, 1994.

SCORZA, F. A., ARIDA, R. M.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; SCERNI, D. A.; CALDERAZZO, L.; CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 345-365, 2009.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R., DAMASCENO, B. P. G. L., MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p.125-131, 2010.

SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. M. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.

SIMÕES, S. I. Veiculação transdérmica de fármacos: I. A pele humana. II. Liberação transdérmica. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, v. 27, n. 5, p. 200-216, 2001.

SWEETMAN, S. **Martindale: The Complete Drug Reference**. 35. ed. Pharmaceutical Press, Londres, 2007.

TOUW, D. J.; GRAAFLAND, O.; CRANENDONK, A.; VERMEULEN, R.J., VAN WEISSENBRUCH, M. M. Clinical pharmacokinetics of phenobarbital in neonates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 111-116, 2000.

TSAI, Y. H.; CHANG, J. T.; CHANG, J. S.; HUANG, C. T.; HUANG, Y. B., WU, P. C. The effect of component of microemulsions on transdermal delivery of buspirone hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2358-2365, 2011.

USP - **United States Pharmacopeia**. Disponível em: <http://www.uspbpep.com/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_alpha-19-1560.html>. Acesso em: 04 jun. 2013.

ÜSTÜNDAĞ OKUR, N.; APAYDIN, S.; YAVAŞOĞLU, N. U. K.; YAVAŞOĞLU, A.; KARASULU, H. Y. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 1, p. 136-144, 2011.

VARONA, J.; ESCRIBANO, E.; MARTÍN-CALDERÓN, J. L. Fenobarbital: farmacocinética, toxicología y monitorización por el Laboratorio. **Revista de Diagnóstico Biológico**, v. 50, n.1, p. 13-16, 2001.

VISWANATHAN, C. T.; BOOKER, H. E.; WELLING, P. G. Bioavailability of oral and intramuscular phenobarbital. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 18, n. 2, p. 100-105, 1978.

WANG, X.; XUE, M.; GU, J.; FANG, X.; SHA, X. Transdermal microemulsion drug delivery system for impairing male reproductive toxicity and enhancing efficacy of *Tripterygium wilfordii* Hook f. **Fitoterapia**, v. 83, n. 4, p. 690-698, 2012.

WANNMACHER, L. Tratamento medicamentoso antitabagismo. **Uso Racional de Medicamentos: temas selecionados**, v. 4, n. 4, p. 1-6, 2007.

WELLSPRINGS. **Transdermal Creams - How they work and why**. Disponível em: <<http://www.wellsprings-health.com/pages/transdermal-creams-how-they-work-and-why>>. Acesso em: 23 mar. 2013.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, 603–618, 2004.

YACUBIAN, E. M. T. Tratamento da epilepsia na infância. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 1, p. 19-27, 2002.

YELLANKI, S. K.; JAGTAP, S.; MASAREDDY, R. Dissofilm: A Novel Approach for Delivery of Phenobarbital; Design and Characterization. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n. 3, p. 181–188, 2011.

YSKA, J. P.; ESSINK, G. W.; BOSCH, F. H.; LANKHAAR, G.; VAN SORGE, A. A. Oral bioavailability of phenobarbital: a comparison of a solution in myvacet 9-08, a suspension, and a tablet. **Pharmacy World & Science**, v. 22, n. 2, p. 67-71, 2000.

YUAN, Y.; LI, S. M.; MO, F. K.; ZHONG, D. F. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, n. 1, p. 117-123, 2006.

YUKAWA, E.; HIGUCHI, S.; AOYAMA, T. Phenobarbitone population pharmacokinetics from routine clinical data: role of patient characteristics for estimating dosing regimens. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, n. 9, p. 755-760, 1992.

YUKAWA, M.; YUKAWA, E.; SUEMATSU, F.; TAKIGUCHI, T.; IKEDA, H.; AKI, H.; MIMEMOTO, M. Population pharmacokinetics of phenobarbital by mixed effect modelling using routine clinical pharmacokinetic data in Japanese neonates and infants: an update. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 704-710, 2011.

ZHAO, X.; LIU, J. P., ZHANG, X.; LI, Y. Enhancement of transdermal delivery of theophylline using microemulsion vehicle. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 327, n. 1-2, p. 58-64, 2006.

8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Apresentação de trabalho em eventos científicos:

1. Development of analytical method for determination of phenobarbital in microemulsion system.

4° Congresso Brasileiro de Biotecnologia – Guarujá/SP - 2012

2. Avaliação in vivo de um microemulsão contendo fenobarbital na epilepsia induzida por pilocarpina: resultados preliminares e perspectivas.

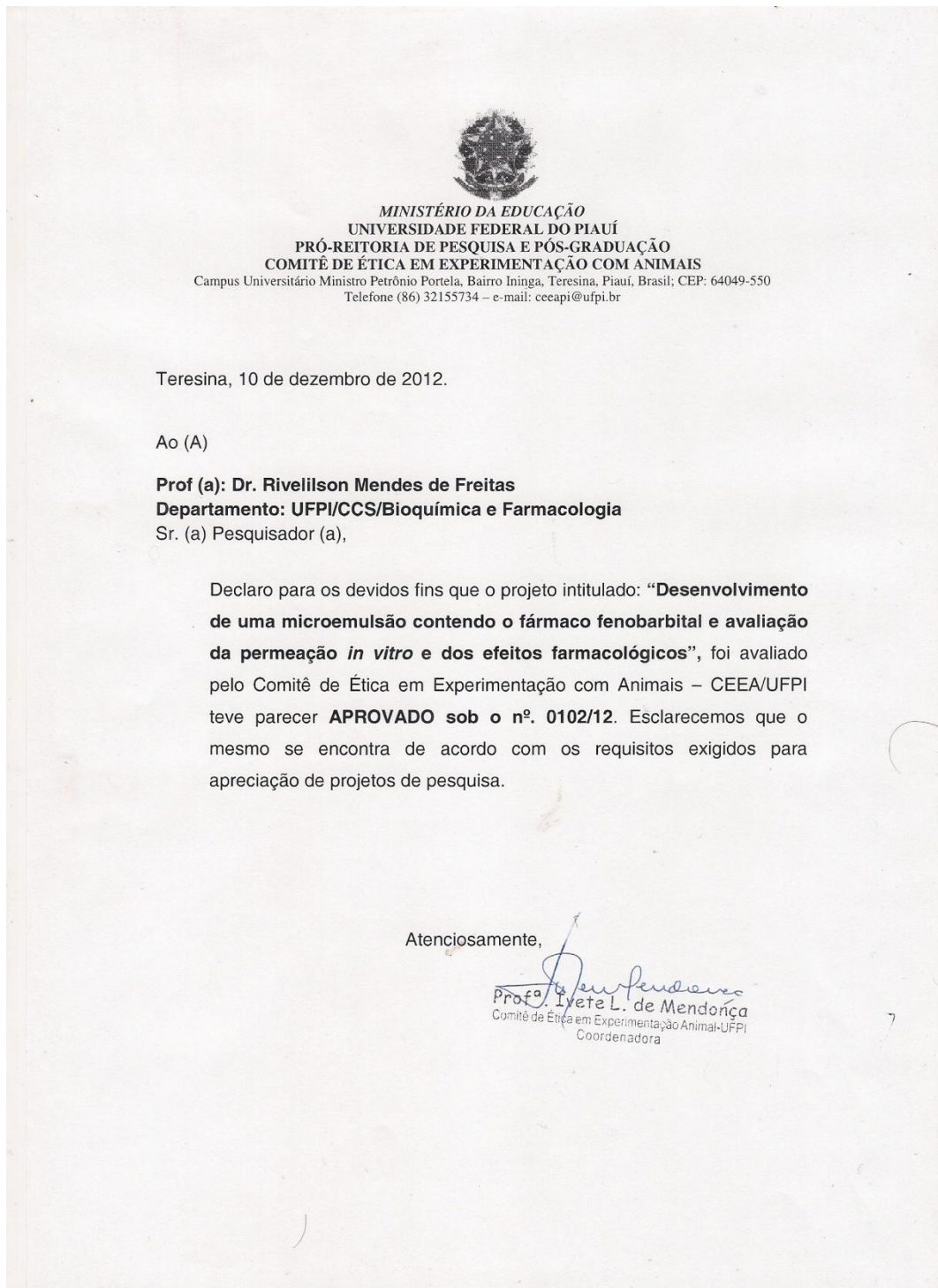
I Workshop de Projetos e Dissertações – Universidade Federal do Piauí - 2012

3. Avaliação da solubilidade de fenobarbital em meios tampões para delineamento de estudos de cinética de liberação in vitro.

I Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Piauí – 2012

ANEXOS

Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI.



Comprovante de submissão de artigo à *Revista Geintec Gestão, Inovação e Tecnologias*

#186 Sinopse

<http://www.revistageintec.net/portal/index.php/revista/autor/submissao...>

[CAPA](#) [SOBRE](#) [PÁGINA DO USUÁRIO](#) [PESQUISA](#) [ATUAL](#) [TAMANHO DE FONTE](#)
 ANTERIORES
[Capa > Usuário > Autor > Submissões > #186 > Resumo](#)

#186 SINOPSE

[RESUMO](#) [AVALIAÇÃO](#) [EDIÇÃO](#)

SUBMISSÃO

Autores KAYO ALVES FIGUEIREDO, ROSANA MÍRIAN BARRÓS MENDES, ANDRÉ LUIS MENEZES CARVALHO, RIVELISON MENDES FREITAS
Título MICROFMULSÕES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS PARA A VIA TRANSDÉRMICA: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA
Documento original 186-821-1-SMDOCN 2013-07-12
Docs sup. Nenhum(a) [INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR](#)
Submetido por Sr KAYO ALVES FIGUEIREDO
Data de submissão julho 12, 2013 - 11:00
Seção Artigos
Editor Suzana Russo

USUÁRIO

Logado como:
kayofigueiredo
[Meus periódicos](#)
[Perfil](#)
[Sair do sistema](#)

CONTEÚDO DA REVISTA

[Pesquisa](#)

[Todos](#)
 [Pesquisar](#)

Procurar

[Por Edição](#)
[Por Autor](#)
[Por título](#)
[Outras revistas](#)

SITUAÇÃO

Situação Em Edição
Iniciado 2013-08-16
Última alteração 2013-08-16

METADADOS DA SUBMISSÃO[EDITAR METADADOS](#)**AUTORES**

Nome KAYO ALVES FIGUEIREDO
Instituição/Afiliação Universidade Federal do Piauí
País Brasil
Resumo da Biografia Atualmente é Farmacêutico hospitalar do Hospital de Urgência de Teresina e Farmacêutico Analista Clínico do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí. Atuou na Assistência Farmacêutica no município de Teresina - PI junto à Coordenadoria Regional de Saúde Centro/Norte/Fundação Municipal de Saúde. Atuou também como Farmacêutico Hospitalar da Central de Manipulação de Quimioterápicos da Associação Piauiense de Combate ao Câncer /Hospital São Marcos na área de oncologia. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas na área de Nanotecnologia Farmacêutica

Contato principal para correspondência.

Nome ROSANA MÍRIAN BARRÓS MENDES
Instituição/Afiliação Universidade Federal do Piauí
País Brasil
Resumo da Biografia