



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Natália Gianini Suterio

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
GEL TÓPICO A BASE DE ARGILA SINTÉTICA E
SINVASTATINA PARA ATUAR COMO ALTERNATIVA
TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO DO MELANOMA**

Florianópolis

2021

Natália Gianini Suterio

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
GEL TÓPICO A BASE DE ARGILA SINTÉTICA E
SINVASTATINA PARA ATUAR COMO ALTERNATIVA
TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO DO MELANOMA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Química na Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestrado em Química.

Orientador: Prof^a Dr^a Hellen Karine Stulzer

Coorientador: Prof Dr Alexandre Luis Parize

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Suterio, Natália Gianini
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM GEL TÓPICO A BASE
DE ARGILA SINTÉTICA E SINVASTATINA PARA ATUAR COMO
ALTERNATIVA TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO DO MELANOMA /
Natália Gianini Suterio ; orientador, Profa Dra Hellen
Karine Stulzer, coorientador, Prof Dr Alexandre Luis
Parize, 2021.
116 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Química. 2. Sinvastatina. 3. Melanoma. 4. Argila
sintética. 5. Tratamento tópico. I. Stulzer, Profa Dra
Hellen Karine . II. Parize, Prof Dr Alexandre Luis . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Química. IV. Título.

Natália Gianini Suterio

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM GEL TÓPICO A
BASE DE ARGILA SINTÉTICA E SINVASTATINA PARA ATUAR COMO
ALTERNATIVA TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO DO MELANOMA**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª Drª Vera Lucia Azzolin Frescura Bascuñan
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª Drª Priscileila Colerato Ferrari
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Giovana Carolina Bazzo
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão
que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em química.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profª Drª Hellen Karine Stulzer
Orientadora

Este trabalho é dedicado aos amores
da minha vida (Ricardo, Elaine,
Marcela, Dalila e Felipe).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à todos que permaneceram na minha trajetória desde o início até este momento, me apoiando, incentivando, ouvindo minhas reclamações e desapontamentos me mostrando os lados positivos. Obrigada pai e mãe por terem tornado tudo possível e pelo apoio eterno... vocês são inenarráveis. Minhas irmãs Dalila e Marcela por estarem presentes nos momentos de distração e descanso. A Heloísa Comelli que mesmo haja distância nos separando sempre esteve perto. E principalmente ao meu namorado Felipe que sempre esteve presente nos momentos de alegria e empolgação até nos mais difíceis desta etapa, sempre me propulsionando a seguir em frente e não desistir.

Gostaria de agradecer também à todos que me ensinaram e me inspiraram durante esses últimos anos, dentre eles em especial a melhor orientadora da vida, a prof^a Hellen Karine Stulzer, que esteve sempre presente com muita paciência e me guiando em todo o processo. Ao meu coorientador professor Alexandre Luis Parize, as doutoras Maria Terezinha França, Giovana Carolina Bazzo e a Gabriela Schneider Rauber que me auxiliaram nas partes experimentais e sempre estiveram à disposição para sanar minhas dúvidas e complementar este projeto. E a todos os integrantes atuais e que já passaram pelo Laboratório Controle de qualidade, em especial a Roberta de Oliveira Ramos, por todos os ensinamentos e companheirismo sem igual.

Meus sinceros agradecimentos aos laboratórios parceiros que se disponibilizaram e contribuíram com o desenvolvimento desse projeto. À Natália B. Caon e ao Rodrigo H. Saatkamp do Grupo de Estudos de Materiais Poliméricos (POLIMAT), ao professor Adailton Bortoluzzi da Central de Análises, aos integrantes da Central Analítica que auxiliaram ao uso do rotaevaporador, à Susane Lopes do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), ao professor Thiago Caon e a Débora Fretes Argenta do Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia, à professora Tânia Pasa e a pós-doutoranda Adny Henrique Silva do LaBioSignal - Laboratório de Bioquímica e Sinalização Celular localizados na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Além dos meus professores que contribuíram para minha formação não apenas profissional assim como pessoal, à UFSC que disponibilizou o espaço físico e a capacitação e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro que tornou possível essa pesquisa.

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais para temer menos."

Marie Curie

RESUMO

Estudos recentes demonstram que a sinvastatina (SIN), amplamente utilizada no tratamento do colesterol, possui propriedades antitumorais, cicatrizantes, antimicrobianas entre outras. Este trabalho, tem como objetivo propor uma nova formulação farmacêutica a base de gel visando o tratamento tópico complementar do melanoma através da inibição de seu crescimento. Para isso, o uso do Laponite® XL21 como modificador reológico na presença dos promotores de permeação, miristato de isopropila (MIR) e esqualeno (ESQ), além da já mencionada SIN foram selecionados para o desenvolvimento do gel. A caracterização no estado sólido foi aplicada para melhor entendimento das propriedades físico-químicas dos constituintes da formulação e para assegurar a qualidade da matéria prima. Estudos de pré-formulação foram aplicados e os géis FSP (sem MIR e ESQ), FMIR e FESQ foram propostos a partir dos melhores resultados apresentados. A caracterização dos géis foi avaliada através do teor de SIN, viscosidade aparente, microscopia de luz polarizada (MLP) e permeação *ex vivo* em pele humana. Além disso, a atividade microbiológica e a atividade citotóxica *in vitro* em células de melanoma (B16F10) foram investigadas. E por fim, foi avaliada a estabilidade acelerada das melhores formulações obtidas foram avaliadas pela variação do: teor de SIN, pH, viscosidade aparente, aspecto visual e ensaio microbiológico durante o armazenamento de 28 dias a 25 e 40°C. O teor das formulações FSP, FMIR e FESQ apresentaram valores médios acima de 95%. A MLP apresentou birrefringência para os cristais de LAP e indicou que os cristais de SIN ficam dispersos na FSP e em agregados na FMIR e FESQ. A análise de variância (ANOVA) e o teste t demonstraram que estatisticamente a presença do MIR e ESQ não influenciaram na permeação da SIN, quando comparados com FSP ($p > 0,05$). Além disso, a atividade microbiológica para *S. aureus*, apenas a SIN apresentou uma CIM de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para *E. coli* apenas o ESQ e o MIR apresentaram uma CIM de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A atividade citotóxica *in vitro* da SIN foi promissora apresentando uma CC_{50} de 44,13 e $3,13 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em 24 e 48 h de tratamento, respectivamente. E por fim, a estabilidade acelerada da FMIR e FSP, foi avaliada. O teor da FMIR à 40°C reduziu enquanto os demais parâmetros avaliados permaneceram estatisticamente iguais nos dias zero, 7, 14 e 28 ($p > 0,05$). Por fim, os dados obtidos indicam que a formulação final FSP é promissora para aplicação tópica, uma vez que a SIN permeada se concentra na epiderme, podendo atuar como tratamento complementar ao melanoma, uma vez que a SIN, princípio ativo do gel, apresentou atividade citotóxica.

Palavras chaves: Sinvastatina. Melanoma. Argila sintética. Tratamento tópico. Permeação *ex vivo* em pele humana.

ABSTRACT

Recent studies have shown that simvastatin (SIN), widely used in treatment of cholesterol, has antitumor, wound healing, antimicrobial properties, among others. This work aims to propose a new gel-based pharmaceutical formulation targeting a complementary topical treatment of melanoma by inhibiting its growth. For this purpose, the use of Laponite® (LAP) XL21 as a rheological modifier in the presence of permeation enhancers, isopropyl myristate (MIR) and squalene (ESQ), besides of the aforementioned SIN were selected for the development of the gel. Solid state characterization was applied to understand better the physicochemical properties of the formulation constituents and to ensure the quality of the materials. Pre-formulation study was applied and the FSP (without MIR and ESQ), FMIR and FESQ gels were developed from the best results presented. The gels characterization was evaluated through SIN content, apparent viscosity, polarized light microscopy (PLM) and *ex vivo* permeation in human skin. Furthermore, the *in vitro* microbiological activity by microdilution and cytotoxic activities in melanoma cells (B16F10) were investigated. And finally, the accelerated stability of the best formulations obtained were evaluated by the variation of: SIN content, pH, apparent viscosity, visual appearance, and microbiological test during storage for 28 days at 25 and 40°C. The mean values of drug content of FSP, FMIR and FESQ formulations were above 95%. PLM presents birefringence for LAP crystals and that SIN crystals are dispersed in FSP and inside aggregates in FMIR and FESQ. The analysis of variance (ANOVA) and the t test showed that statistically the presence of permeation promoters did not improve the permeation of SIN, when compared to FSP ($p > 0.05$). Furthermore, *in vitro* microbiological activity for *S. aureus*, only SIN shows a MC of $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and for *E. coli* only ESQ and MIR exhibits a MIC of $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The cytotoxic activities was promising by presenting a CC_{50} of 44.13 and $3.13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ at 24 and 48 h of treatment, respectively. And finally, the accelerated stability of the best formulation obtained, FMIR and FSP, were evaluated. Drug content of FMIR at 40°C reduced ($p < 0,05$), while the other parameters obtained remained statistically equal on days zero, 7, 14 and 28 ($p > 0.05$). This study indicates that the final formulation FSP is promising for topical application, since the permeated SIN is concentrated in the epidermis and can act as a complementary treatment to melanoma, since SIN, the active principle of the gel, showed cytotoxic activity.

Keywords: Simvastatin; Melanoma; Synthetic clay; Topical treatment; *ex vivo* permeation in human skin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele em camadas	31
Figura 2. Subcamadas da epiderme	31
Figura 3. Caminhos de penetração do IFA pelo estrato córneo.....	33
Figura 4. Estrutura molecular dos promotores químicos de permeação o MIR e o ESQ.....	36
Figura 5. Representação esquemática da geometria do LAP em forma de disco e estrutura química.....	38
Figura 6. Representação esquemática do gel de automontagem do LAP.	38
Figura 7. Quantidades de publicações referente ao LAP na literatura e em patentes obtidas no dia 30 de novembro de 2020 na base de dados SciFinder-n.	39
Figura 8. Esquema ilustrativo do preparo dos géis e pré-géis desenvolvidos.	48
Figura 9. Sistema de montagem da célula de Franz para a permeação <i>ex vivo</i> em pele humana.....	51
Figura 10. Representação da análise de microdiluição em caldo dos microorganismos <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> para a SIN, LAP, MF 1:1, MIR e ESQ.	53
Figura 11. Esquema do ensaio da viabilidade celular.....	55
Figura 12. Espectros de infravermelho da SIN (cor preta), do LAP (cor vermelha), da MF1:1 (cor azul), da F1:2 (cor rosa), F1:3 (cor verde) e da F1:4 (cor roxa).	58
Figura 13. Curvas referentes as análises de DSC da SIN, do LAP, das formulações F1:2, F1:3, F1:4 e da MF1:1.....	60
Figura 14. Curvas referentes as análises termogravimétricas de: (a) SIN, (b) LAP, (c) MF1:1 e das formulações (d) F1:2, (e) F1:3 e (f) F1:4 e suas respectivas primeiras derivadas.	62
Figura 15. Difratogramas da SIN, do LAP, da MF1:1 e das formulações F1:2, F1:3 e F1:4.	64
Figura 16. MEV da a) SIN, b) LAP, c) F1:2, d) F1:3, e) F1:4 e f) MF1:1.	65

Figura 17. Viscosidade aparente à 25°C do G2, G3 e G4 após 0, 4 e 24 h de seu preparo.....	69
Figura 18. Viscosidade aparente do G2, G3 e G4 descritas no item 4.3.1.1 após 24 horas do seu preparo a 25, 32 e 37°C.	70
Figura 19. Viscosidade aparente dos pré-géis PG-3E, PG-3M, PG-4E PG-4M após 24 horas do seu preparo a 25, 32 e 37°C.	72
Figura 20. Gel FSP após 24h do seu preparo.....	73
Figura 21. Viscosidade aparente das formulações FMIR e FESQ a 25, 32 e 37°C em comparação com o G3, PG-3M e PG-4E.....	74
Figura 22. Imagens de microscopia na presença da luz polarizada com magnificação 3,0x para a) G3, b) FSP, c) PG-3M, d) FMIR, e) PG-4E e f) FESQ.....	75
Figura 23. Quantidade de SIN permeada em 24 horas de ensaio <i>ex vivo</i> para a FSP, FMIR e FESQ e seus respectivos desvios padrões.....	77
Figura 24. Quantidade de SIN retida na derme e na epiderme para a FSP, FMIR e FESQ com seus respectivos desvios padrões.....	78
Figura 25. Efeito citotóxico da sinvastatina na linhagem B16-F10 após 24 (A) e 48 h (B) de tratamento.	83
Figura 26. Esquema exemplificando os estudos de estabilidade acelerada realizada com a FMIR e FSP.....	84
Figura 27. Teor da SIN na FSP e FMIR durante 28 dias no estudo de estabilidade acelerada.....	85
Figura 28. Acompanhamento do pH para a FSP e a FMIR durante 28 dias no estudo de estabilidade acelerada.	85
Figura 29. Viscosidade aparente da FSP e da FMIR durante 28 dias no estudo de estabilidade acelerada.....	86
Figura 30. Especificidade do método a partir da análise em modo SCAN no espectrofotômetro de absorção no UV na faixa de 400 nm a 200 nm, no qual: a) linha preta: sinvastatina e b) linha vermelha: Laponite® na mesma concentração (15 µg.mL ⁻¹).....	109
Figura 31. Especificidade do método desenvolvido por CLAE para análise de SIN na presença de: na pele em acetoneitrila, na pele em meio receptor	

utilizado no ensaio de permeação, em fase móvel na presença de 1% de
LAP, 1% de ESQ e 1% de MIR..... 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da Sinvastatina.	24
Tabela 2. Propriedades físico-químicas ideais para permeação passiva pela administração tópica.	35
Tabela 3. Artigos descritos na literatura relacionados ao LAP XL21 como veículo de liberação de fármacos na área farmacêutica nos últimos 4 anos.	41
Tabela 4. Proporções de SIN e LAP nos pós preparados para a caracterização e desenvolvimento dos géis a serem estudados.	43
Tabela 5. Estudos desenvolvidos no estudo de pré formulação e desenvolvimento dos géis de LAP.	46
Tabela 6. Área de superfície e volume do compartimento receptor das cubas utilizados no ensaio de permeação.	50
Tabela 7. Escala padrão de turbidez McFarland.	52
Tabela 8. Análises de EDS para identificação de carbono, oxigênio, flúor, sódio magnésio e sílica.	66
Tabela 9. Soluções preparadas para secagem de solvente por rotaevaporação e seus respectivos rendimentos.	67
Tabela 10. Porcentagem de SIN presente na solução doadora no tempo zero e a permeada após 24 horas de ensaio, em relação a quantidade presente na solução doadora, para a FSP, FMIR e FESQ presentes na solução receptora, na epiderme e na derme e seus respectivos desvios padrões.	79
Tabela 11. Resultado do estudo microbiológico da SIN, LAP, MF 1:1, MIR e ESQ para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> . Incolor = sem crescimento microbiológico, rosa = com crescimento microbiológico.	81
Tabela 12. Resultado do estudo microbiológico da SIN, LAP, MF 1:1, MIR e ESQ para a bactéria <i>Escherichia coli</i> . Incolor = sem crescimento microbiológico, rosa = com crescimento microbiológico.	82
Tabela 13. Comparação entre as absorvâncias da solução A, B e C que refere à solução contendo SIN em metanol/água (50:50), SIN em metanol/0,5% de LAP aquoso (50:50) e SIN em metanol/0,5% de LAP aquoso (50:50)	

com o equipamento zerado com uma solução de metanol/0,5% de LAP aquoso (50:50), respectivamente.	109
Tabela 14. Linearidade, LD, LQ, precisão, exatidão e a robustez para validação do método proposto.	110
Tabela 15. Linearidade, LD, LQ, precisão e exatidão para validação do método por CLAE proposto.	115

LISTA DE ABREVIATÖES

ANOVA - Análise de variância	G3 - Gel de LAP a 3% descrita no item 4.3.1.1;
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária;	G4 - Gel de LAP a 4% descrita no item 4.3.1.1;
ATR - refletância total atenuada;	HEPES - Ácido 2-[4-(2-hidroxi-til)1-piperazinil]-etanosulfônico;
CC ₅₀ - Concentração do composto que causa 50% de morte celular;	ICH - <i>International Conference on Harmonization</i> ;
DMEM - <i>Dulbelco's Modified Eagle</i> (meio de cultivo celular);	LAP - Laponite®;
DMSO - Dimetilsulfóxido;	Log P - Coeficiente de partição;
EDS - Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X;	MEV - Microscopia eletrônica de varredura;
EPM - Erro padrão da média;	MF1:1 - Mistura física de SIN e LAP na proporção 1:1 (m/m);
ESQ - Esqualeno;	MIR - Miristato de isopropila;
F1:2 - Formulação na proporção 1:2 descrita no item 4.2.1;	mL - Microlitos;
F1:3 - Formulação na proporção 1:3 descrita no item 4.2.1;	MLP - Microscopia de luz polarizada;
F1:4 - Formulação na proporção 1:4 descrita no item 4.2.1;	PBS - Tampão fosfato salino;
FESQ - Formulação contendo SIN, LAP e ESQ descrita no item 4.3.1.3;	PG-3E – Pré-gel contendo 3% de LAP e 5% de ESQ descrita no item 4.3.1.2;
FMIR - Formulação contendo SIN, LAP e MIR descrita no item 4.3.1.3;	PG-4E - Pré-gel contendo 4% de LAP e 5% de ESQ descrita no item 4.3.1.2;
FSP - Formulação contendo SIN e LAP descrita no item 4.3.1.3;	PG-3M - Pré-gel contendo 3% de LAP e 5% de MIR descrita no item 4.3.1.2;
FTIR - Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier;	PG-4M - Pré-gel contendo 4% de LAP e 5% de MIR descrita no item 4.3.1.2;
G2 - Gel de LAP a 2% descrita no item 4.3.1.1;	SIN - Sinvastatina;

SFB - Soro fetal bovino;

TG - Análise termogravimétrica;

UFSC - Universidade Federal de
Santa Catarina;

UV – Ultravioleta;

XRPD - Difração de raios X;

θ - Teta;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1 SINVASTATINA.....	24
3.1.1 <i>Uso off label de fármacos</i>	25
3.1.2 <i>Uso off label da sinvastatina</i>	26
3.2 MELANOMA.....	27
3.3 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS	29
3.3.1 <i>Via de administração tópica</i>	29
3.3.2 <i>Estrutura da pele e mecanismos e penetração</i>	30
3.3.3 <i>Formulações semissólidas para aplicação tópica</i>	34
3.3.4 <i>Promotores de permeação</i>	34
3.3.3.1 Promotores químicos	35
3.3.3.2 Promotores físicos.....	37
3.4 LAPONITE®	37
3.4.1 <i>Uso do Laponite® XL21 como veículo de liberação de fármacos</i> ..	40
4 METODOLOGIA.....	42
4.1 MATERIAIS E REAGENTES	42
4.2 CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	42
4.2.1 <i>Preparo dos pós</i>	42
4.2.2 <i>Caracterização do sólido</i>	43
4.2.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho	43
4.2.2.2 Calorimetria exploratória diferencial	44
4.2.2.3 Análise termogravimétrica.....	44
4.2.2.4 Difração de raios-X de pó.....	44
4.2.2.5 Microscopia eletrônica de varredura	44
4.2.2.6 Teor de SIN nos pós	44
4.3 ESTUDOS DE PRÉ FORMULAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS DE LAPONITE®	45

4.3.1 Estudos de viscosidade da pré-formulação e desenvolvimento dos géis de Laponite®.....	45
4.3.1.1 Avaliação da influência da concentração do Laponite® na viscosidade	46
4.3.1.2 Avaliação da influência dos promotores de permeação na viscosidade	47
4.3.1.3 Desenvolvimento das formulações propostas	48
4.3.2 Teor de SIN nos géis desenvolvidos	48
4.3.3 Estudos por microscopia de luz polarizada.....	49
4.4 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO DA SINVASTATINA <i>EX VIVO</i> EM PELE HUMANA.....	49
4.4.1 Obtenção da pele	49
4.4.2 Estudos de permeabilidade da sinvastatina <i>ex vivo</i>	50
4.4.3 Avaliação da retenção cutânea da sinvastatina.....	51
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	52
4.6 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA SIN.....	54
4.6.1 Linhagens e cultivos celular.....	54
4.6.2 Ensaio de viabilidade celular	54
4.7 ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA DO GEL DE LAPONITE®, SINVASTATINA E MIRISTATO DE ISOPROPILA.....	55
4.7.1 Testes físico-químicos	55
4.7.2 Teste microbiológico	55
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO	57
5.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier	58
5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial	59
5.1.3 Análise termogravimétrica	61
5.1.4 Difração de raios-X de pó	63
5.1.5 Microscopia eletrônica de varredura.....	65
5.1.6 Doseamento	67

5.2 ESTUDOS DE PRÉ FORMULAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS DE LAPONITE®	68
5.2.1 Estudos de viscosidade da pré-formulação e desenvolvimento dos géis de Laponite®.....	68
5.2.1.1 Avaliação da influência da concentração do Laponite® na viscosidade	68
5.2.1.2 Avaliação da influência dos promotores de permeação na viscosidade	71
5.2.1.3 Análise da viscosidade dos Géis de Sinvastatina e Laponite®	73
5.2.2 Doseamento das formulações	74
5.2.3 Estudo por Microscopia de Luz Polarizada.....	75
5.3 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO DA SINVASTATINA <i>EX VIVO</i> EM PELE HUMANA.....	76
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	80
5.5 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA SIN.....	82
5.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA DO GEL DE LAPONITE®, SINVASTATINA E MIRISTATO DE ISOPROPILA.....	83
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	90
8 REFERÊNCIAS	91
APÊNDICE A - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR UV/VIS	107
1. METODOLOGIA.....	107
1.1 Especificidade.....	107
1.2 Linearidade.....	107
1.3 Precisão e Exatidão.....	108
1.4 Robustez.....	108
2. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	109
3. REFERÊNCIAS.....	111
APÊNDICE B - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE	112
1. METODOLOGIA.....	112

1.1 Especificidade.....	112
1.2 Linearidade.....	113
1.3 Precisão e Exatidão.....	113
2. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	114
2.1 Especificidade.....	114
2.1 Linearidade.....	115
3. REFERÊNCIAS.....	116

1 INTRODUÇÃO

O melanoma (câncer de pele) é uma das formas mais comuns entre cânceres humanos (ZGHAL; DERBEL, 2018). Este é considerado o mais agressivo tipo de câncer de pele e surge dos melanócitos, que são células produtoras de pigmento da pele (KURYK *et al.*, 2020). O controle do melanoma cutâneo está associado ao uso de tratamentos auxiliares da doença em estágio inicial (MILLER *et al.*, 2020).

As abordagens terapêuticas atuais de tratamento incluem ressecção cirúrgica, quimioterapia, terapia fotodinâmica, imunoterapia, bioquimioterapia e terapia direcionada (DOMINGUES *et al.*, 2018). No entanto, o tratamento à base de medicamentos através da aplicação tópica está se tornando comum em pacientes que recusam a cirurgia ou nos quais a cirurgia não é indicada (BHUIYAN; MAKHUBELE, 2020; SISTI *et al.*, 2015).

Uma forma de aplicação tópica que vem ganhando espaço no mercado consumidor nas últimas décadas, tanto na área cosmética quanto nas formulações farmacêuticas, são os géis. Os géis são formulações semissólidas gerados através do aprisionamento de grandes quantidades de líquido aquoso ou hidroalcoólicos em uma rede de partículas sólidas coloidais (ASHARA *et al.*, 2016). Devido à alta capacidade de sorção, dilatação e área de superfície, o produto conhecido pelo nome comercial Laponite® (LAP), trata-se de um mineral de argila sintético, atóxico e biodegradável, que possui diversas funções, dentre elas a de emulsificante e espessante, o que o torna interessante para formação de géis (TOMÁS *et al.*, 2018).

A sinvastatina (SIN) é um fármaco da família das estatinas, amplamente utilizada no tratamento da redução dos níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e, com isso, diminui os riscos de desenvolvimento de doença arterial coronariana (RIZVI *et al.*, 2019). Estudos apontam que a sinvastatina tem atividade diferente das indicações terapêuticas aprovadas por entidades reguladoras. Dentre estes, o seu uso *off-label* para cicatrização de feridas e no tratamento de melanoma, principalmente através da indução do apoptose e inibição do crescimento, vêm sendo estudados (ALUPEI *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2021; LEDEȚI *et al.*, 2016). Este estudo tem como objetivo propor uma nova formulação farmacêutica em forma de gel a base de SIN e LAP para auxiliar no tratamento de melanoma.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Propor uma nova formulação farmacêutica em forma de gel a base de SIN e LAP para aplicação tópica de forma a auxiliar no tratamento de melanoma.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(i) Desenvolver e validar as metodologias analíticas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência capazes de quantificar a SIN nas formulações de gel.

(ii) Realizar a caracterização em estado sólido da SIN e LAP isolados e das misturas obtidas por rota evaporação em diferentes proporções dos componentes por meio de técnicas de espectroscopia de infravermelho (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TG), difração de raios X (XRPD), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e teor da SIN nas misturas.

(iii) Realizar estudos de pré-formulação dos géis contendo LAP e os promotores de permeação.

(iv) Desenvolver e caracterizar os géis de SIN e LAP através das análises de reologia, doseamento (teor) e microscopia de luz polarizada (MLP).

(v) Avaliar a permeabilidade *ex vivo* da SIN nos géis preparados no item (iv) em pele humana para avaliar a melhor formulação desenvolvida para o tratamento de melanoma.

(vi) Determinar a atividade antimicrobiana dos constituintes da formulação desenvolvida no item (iv).

(vii) Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* da SIN.

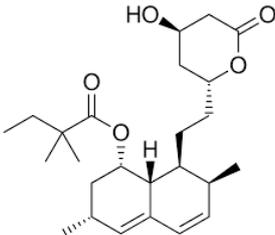
(viii) Realizar estudos de estabilidade acelerada da melhor formulação em termos da viscosidade, doseamento, pH e teste microbiológico, durante 28 dias.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SINVASTATINA

A sinvastatina (SIN) pertencente à família das estatinas, possui ação redutora do colesterol e é amplamente utilizada para tratar doenças coronárias, dislipidemia e hipercolesterolemia (RIZVI *et al.*, 2019). A SIN foi desenvolvida a partir da inserção de uma metila no carbono alfa à carbonila da função éster da lovastatina e atua como inibidor competitivo da HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A) redutase e, portanto, reduz a biossíntese de colesterol na via do mevalonato (EMAMI *et al.*, 2019). A Tabela 1 mostra sua estrutura molecular e suas principais propriedades físico-químicas reportadas na literatura.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da Sinvastatina.

Sinvastatina	
Estrutura Molecular	
Fórmula Química	$C_{25}H_{38}O_5$
Massa molar (g.mol ⁻¹ ou Da)	418,574
Solubilidade 25 °C (mg.mL ⁻¹)	0,000003 (H ₂ O)
	540 (DMSO)
	610 (clorofórmio)
	200 (metanol)
	160 (etanol)
	30 (propileno glicol)
	0,06 (0,1M HCl)
	70 (0,1M NaOH)
	0,0032 (PBS pH 7,4) (SIMÕES <i>et al.</i> , 2013)
	200,12 (tween 80) (ABDELBARY <i>et al.</i> , 2013)
pK _a	14,91
Log P	4,68
Ponto de fusão (°C)	135 -138
Transição vítrea (°C)	33 (URBANOVA <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Dados obtidos da DrugBank e de Oliveira e colaboradores (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; DRUGBANK, 2005).

3.1.1 Uso *off label* de fármacos

O uso *off* de medicamentos trata-se da utilização do fármaco para uma finalidade diferente da aprovada pela entidade reguladora de um país. O *label*, de um medicamento contém usualmente as indicações e contraindicações terapêuticas, constituintes da formulação, dosagem, faixa etária, frequência de administração e via de administração. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é o órgão regulador vinculado ao Ministério da Saúde responsável pela autorização de determinado uso de um medicamento no território brasileiro. Todo medicamento registrado recebe aprovação da Anvisa para uma ou mais indicações, as quais passam a constar em sua bula (SILVA, 2018; SILVEIRA, 2019).

As informações contidas no *label* do medicamento, para que sejam aprovadas, são submetidas a avaliações em estudos clínicos que comprovem a qualidade, eficácia e segurança do fármaco (PEREIRA; RAU, 2013; SILVEIRA, 2019). Alguns grupos específicos de pacientes são raramente incluídos em estudos clínicos por razões éticas e até mesmo legais como é o caso de doentes psiquiátricos, mulheres grávidas, doentes pediátricos, idosos e portadores de doenças raras. Assim, a prática *off label* torna-se comum nesses casos, devido à dificuldade de encontrar práticas terapêuticas aprovadas. Outra situação no qual é realizada a prescrição *off label* é em doentes terminais ou em pacientes com doenças degenerativas graves na presença de evidências cientificamente comprovadas (SILVA, 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1985, afirmou que o uso de medicamentos é racional quando: o paciente recebe medicamentos adequados às suas necessidades clínicas, em doses que atendam às suas necessidades individuais, por um período de tempo adequado, e com o menor custo (PAUMGARTTEN; DE OLIVEIRA, 2020). O uso *off label* de fármacos é uma prática legal em muitos países, incluindo o Brasil, mas pode gerar problemas graves uma vez que não foram avaliados e aprovados (ZHENG *et al.*, 2017). A segurança do medicamento é uma

preocupação no uso *off label* e o monitoramento contínuo é recomendado, apesar dessa prática ser difícil devido à falta de estudos controlados e observações (STEPHENS; GURENLIAN, 2018).

Apesar das preocupações acerca do uso *off label*, seus benefícios podem ser proeminentes, desde a questão econômica, até mesmo o bem-estar do paciente no qual poderá ser submetido a um tratamento mais brando e menos agressivo. Para isso, um equilíbrio do benefício-dano deve ser realizado, com base na qualidade, eficácia e segurança. Em caso de medicamentos licenciados, são os médicos que avaliam o equilíbrio benefício-dano guiados por fatores relacionados ao paciente, a doença, os benefícios e os danos gerados pelo medicamento. O equilíbrio benefício-dano é mais favorável quando (i) o paciente tem pouca suscetibilidade aos danos potenciais, (ii) a doença é séria e severa, (iii) há eficácia substancial e bem estabelecida, e (iv) os danos são bem definidos, improváveis e triviais (ARONSON; FERNER, 2017).

3.1.2 Uso *off label* da sinvastatina

Apesar do amplo uso da SIN para o tratamento de doenças coronárias, a sinvastatina também tem sido estudada com finalidade diferente da aprovada pelas entidades reguladoras, de forma *off-label*. Nas últimas décadas, observações de estudos com animais e experimentos *in vitro* mostraram que as estatinas podem apresentar efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (BAGHERI *et al.*, 2020; GENERALI; CADA, 2015).

Além disso, no final do século XX e início do século XXI, estudos com a lovastatina, com estrutura muito próximo a da sinvastatina, mostraram sua capacidade de potencializar a eficácia dos agentes quimioterápicos no tratamento de melanomas malignos (FELESZKO *et al.*, 2002 e 1998; SHELLMAN *et al.*, 2005). Em 2008, Saito e colaboradores, demonstraram que a sinvastatina tem um efeito antiproliferativo *in vitro* contra linhagens celulares de melanoma humano (A375M, G361, C8161, GAK e MMAc), e esse efeito foi devido, pelo menos em parte, à indução de apoptose e à parada do ciclo celular (SAITO *et al.*, 2008).

Em 2013, Zanfardino e colaboradores relataram que a sinvastatina é capaz de induzir apoptose em células de melanoma, mas não em células

normais, e também é capaz de retardar o crescimento do tumor em um modelo experimental de melanoma em modelo murino (ZANFARDINO *et al.*, 2013). Em 2015, Alupeí e colaboradores demonstraram em modelo *in vivo* que a SIN lipossomal inibe fortemente o crescimento do melanoma B16-F10 (em 85%) (ALUPEI *et al.*, 2015). Em 2019, Barone e colaboradores desenvolveram filmes nanoestruturados híbridos para administração tópica de sinvastatina como tratamento coadjuvante de melanoma (BARONE *et al.*, 2019).

Em 2018, Sameh e colaboradores, em seu artigo de revisão, relataram que além do efeito redutor do colesterol, a SIN tem muitas modalidades terapêuticas *off label* para diferentes distúrbios patológicos, tais como: cicatrização de tecido ósseo, inibição de células cancerosas, muitas doenças inflamatórias e cicatrização de feridas. A indução de cicatrização de feridas SIN surge de sua atividade de angiogênese e atividade antibacteriana. Esta, pode interferir com a síntese de proteínas bacterianas e inibir as múltiplas vias biossintéticas e processos celulares em bactérias sem os efeitos colaterais dos antibióticos convencionais ou medo da resistência bacteriana (SAMEH *et al.*, 2018).

Recentemente, Duarte e colaboradores, em seu artigo de revisão, apontou que o número de ensaios clínicos em andamento avaliando o benefício clínico da sinvastatina no câncer é grande, uma vez que há uma variedade de cenários clínicos possíveis (DUARTE *et al.*, 2021). Apesar de estudos mostrarem que a sinvastatina pode auxiliar no tratamento de diversos distúrbios patológicos, pouco dessa área foi explorada, principalmente no quesito de formulações farmacêuticas de fácil aplicação e com ação local visando auxiliar o tratamento de melanoma, evitando as complicações do tratamento sistêmico.

3.2 MELANOMA

Melanoma é um tumor maligno que surge através da proliferação descontrolada de células produtoras de pigmento, os melanócitos. A forma mais comum de melanoma é a cutânea, porém também pode surgir nas superfícies mucosas, no trato uveal e nas leptomeninges (MATTHEWS *et al.*, 2017). Embora seja responsável por cerca de apenas 1% de todos os tumores malignos de pele, o melanoma maligno cutâneo representa a forma mais

agressiva e mortal do câncer de pele, sendo responsável por cerca de 55.500 mortes anualmente (DOMINGUES *et al.*, 2018; SCHADENDORF *et al.*, 2018).

Fatores de risco estabelecidos para melanoma cutâneo incluem radiação ultravioleta por exposição ao sol e queimaduras solares, bronzeamento artificial (especialmente antes dos 35 anos), a presença de nevos melanocíticos ou displásicos, histórico familiar, características fenotípicas, incluindo cabelos, olhos e cores de pele claros e tendência a sardas, e nível socioeconômico (LEONARDI *et al.*, 2018; SCHADENDORF *et al.*, 2018).

A identificação precoce desse câncer é fundamental para o sucesso do tratamento do paciente. Ainda, o tratamento depende basicamente das características do tumor, tais como: localização, estágio e o perfil genético. Devido aos mecanismos de resistência associados a heterogeneidade dos pacientes e dos tumores, a combinação de diferentes estratégias são utilizadas no tratamento de melanoma (DOMINGUES *et al.*, 2018; JENKINS; FISHER, 2021).

Os medicamentos de aplicação tópica estão se tornando tratamentos comuns para melanoma em pacientes que recusam a cirurgia ou em pacientes para os quais a cirurgia não é indicada (SISTI *et al.*, 2015). Estudos registrados na literatura apontam uso de ativos e algumas formulações de aplicação tópica com potencial tratamento de melanoma como o uso do creme de imiquimod (IMQ). Este é um modificador de resposta imunológica já utilizado no tratamento de carcinoma e verrugas genitais induzidas por HPV, entretanto, demonstrou efeito multifatorial no tratamento de melanoma (SISTI *et al.*, 2015).

O uso de polifenóis naturais pouco solúveis em água tem atraído considerável atenção da comunidade científica devido à sua eficácia quimiopreventiva e quimioterápica. Foi sugerido que polifenóis como a curcumina e o resveratrol, ambos de origem natural, entre outros, possuem potente efeito antitumoral devido à sua eficácia antioxidante, antiinflamatória, antiproliferativa e quimioprotetora (PALLIYAGE *et al.*, 2019). A exemplo o uso do creme tópico *Curaderm* BEC5 que contém o ingrediente ativo, *Solasodine Glycosides*, derivado da berinjela e uma planta menos conhecida da Austrália, a Maçã do Diabo. Após duas décadas de pesquisa, o bioquímico Dr. Bill Cham descobriu que o creme natural *Curaderm* BEC5 funciona

removendo um açúcar chamado ramnose, que não é encontrado em células saudáveis. Então, o sistema imunológico induz a apoptose e remove a célula prejudicial à saúde. Este creme provou ser eficaz em ceratose (manchas de sol) e até manchas de idade, muitas vezes removendo-as em poucos dias. Em um estudo de caso reportado pelo Dr. Bill Cham, o uso do creme apresentou ótimos resultados no tratamento de carcinoma em uma paciente que recusou cirurgia (CHAM, 2020).

3.3 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS

A via de administração de um medicamento deve ser escolhida conforme suas vantagens e desvantagens, pois está diretamente relacionada com a biodisponibilidade do fármaco, o que irá afetar no início e na duração do efeito farmacológico (RUIZ; MONTOTO, 2018). Portanto, a via de liberação dos diferentes ingredientes farmacêuticos ativos (IFA) podem ser projetadas com intuito de maximizar a resposta terapêutica (AULTON; TAYLOR, 2016).

3.3.1 Via de administração tópica

A via tópica é o principal meio de aplicação local de fármacos. Nesta via a aplicação do medicamento ocorre através da pele ou mucosa, apesar que, pode ser utilizada também para aplicação transdérmica no qual o efeito sistêmico é desejado. Na administração local as formulações são aplicadas diretamente em superfícies ou mucosas, tal como a pele, os olhos, o nariz e a vagina (SINGH et al., 2015).

A administração por via tópica é um método não invasivo, sem dor, de fácil aplicação, com uso de baixas dosagens, habilidade em aplicar fármacos seletivos a sítios ativos específicos, reduz a toxicidade sistêmica, evita o metabolismo de primeira passagem e irritação gástrica (CHOUDHURY *et al.*, 2017; PATIL *et al.*, 2019). Como desvantagens podem provocar irritabilidade na pele e dermatites devido ao fármaco ou aos excipientes da formulação. Ainda, podem causar reações alérgica e alguns IFA possuem baixa permeabilidade através da pele, principalmente os fármacos com grandes tamanho de partícula, sendo um dos maiores desafios dessa via (PATIL *et al.*, 2019).

Naturalmente a pele oferece baixa permeabilidade, consistindo na primeira linha de defesa do organismo contra partículas exógenas, agentes patogênicos e tóxicos. Além disso, a penetração de substâncias na pele pode ser afetada por diversos fatores fisiológicos, tais como a espessura da pele, pH, hidratação, idade, etnia, local de aplicação, sexo, algumas patologias, densidade dos folículos capilares e das glândulas sudoríferas (BEGUM *et al.*, 2019; SUPE; TAKUDAGE, 2021).

A taxa de liberação dos IFA está relacionada com as propriedades físico-químicas do carreador e do fármaco empregado na formulação farmacêutica para aplicação tópica. Propriedades como o coeficiente de partição ($\log P$), peso molecular, grau de ionização e eficiência do carreador são importantes e devem ser levadas em conta ao se planejar o desenvolvimento de formulações para via tópica (BEGUM *et al.*, 2019).

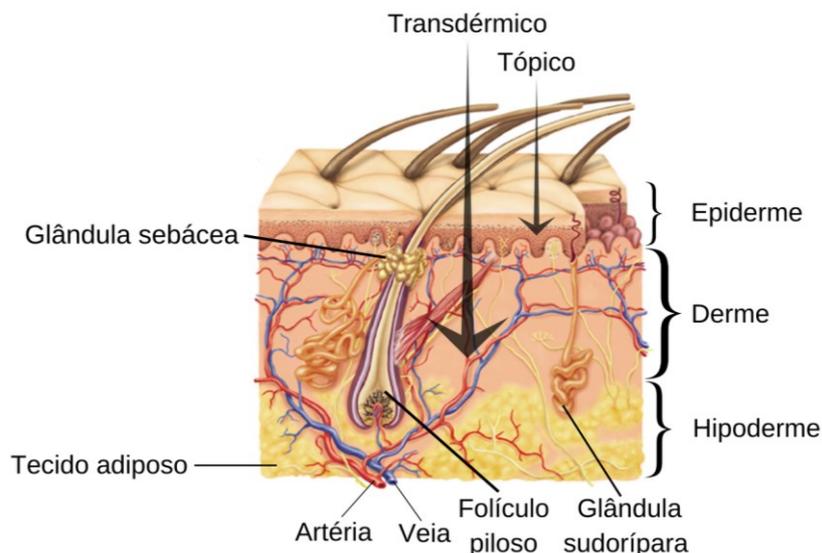
3.3.2 Estrutura da pele e mecanismos e penetração

Para entender sobre a permeação de IFA através da pele pela aplicação tópica é necessário entender sobre a estrutura da pele e seus mecanismos de penetração. A pele é um órgão heterogêneo com inúmeras camadas celulares que desempenha a função de barreira física e protege os tecidos do ambiente externo (infecção e perda excessiva de água), além de regular a temperatura corporal e atuar como órgão sensorial (SHESHALA *et al.*, 2019).

A pele é constituída por três camadas principais, a epiderme, a derme e a hipoderme, representadas na Figura 1. Com a intenção de obter o efeito local, o fármaco tem ação mais focada na epiderme, enquanto para o efeito transdérmico, o ativo precisa permear a camada da derme até os vasos sanguíneos (PARCHEN *et al.*, 2020). A epiderme é a camada mais externa da pele que desempenha a função de barreira física e química entre o corpo e o meio externo. A espessura da epiderme pode variar de 50 μm nas pálpebras à 800 μm nas solas do pé ou nas palmas da mão (MALVEY *et al.*, 2019). Essa camada é responsável pela formação do pigmento melanina e é constituída por 4 principais subcamadas formadas principalmente por queratinócitos. As subcamadas são fragmentadas pelos diferentes estágios de mutação que ocorre aos queratinócitos no processo de queratinização, no qual as células movimentam-se da camada mais interna para a superfície. Esse processo leva

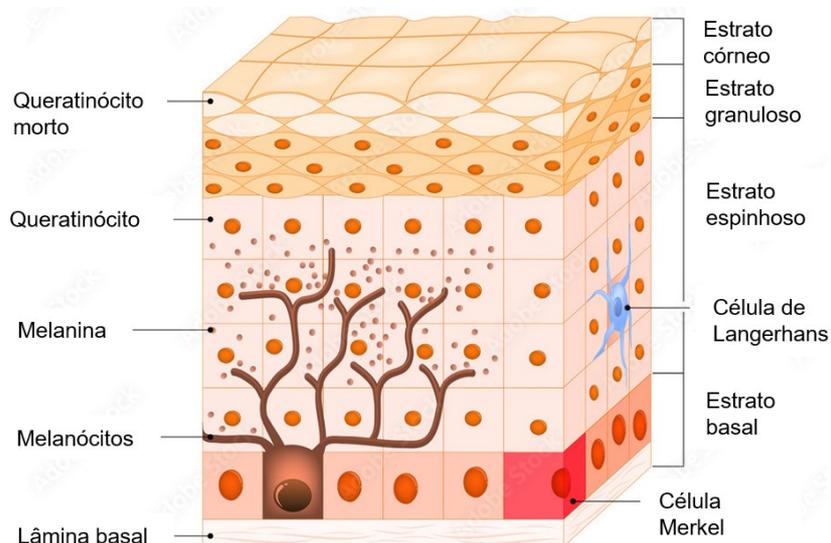
em torno de 28 dias. As quatro camadas da epiderme são: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e o estrato córneo, como demonstrado na Figura 2 (SOARES *et al.*, 2015; SUPE; TAKUDAGE, 2021).

Figura 1. Estrutura da pele em camadas



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 2. Subcamadas da epiderme



Fonte: Adaptado de Adobe Stock, different cell types populating the skin, nº: 77014250.

O estrato basal é a camada mais interna da epiderme e está situada acima da derme, no qual os queratinócitos se dividem e se diferenciam passando para as camadas mais externas (SUPE; TAKUDAGE, 2021). Nessa camada uma pequena porção das células são constituídas de melanina que

são acumuladas e transferidas para os queratinócitos adjacentes, no qual permanecem como grânulos. A melanina promove proteção contra a radiação de raios ultravioletas e a exposição crônica a luz aumenta a taxa de melanina nos queratinócitos (MALVEY *et al.*, 2019). Conforme as células basais reproduzem e maturam, movem para a camada superior adjacente, o estrato espinhoso (XIE; SKOTHEIM, 2020).

As células no estrato espinhoso são conectadas por desmossomos e outras pontes que produzem grânulos intracelulares lamelares que, ao se fundirem com a membrana celular, liberam lipídios que atuam como barreira. No interior de sua camada também se encontram células de Langerhans, provenientes da medula óssea, que promovem a ação imunológica da pele. Os queratinócitos continuam a madurar, se movendo para as camadas superiores, o estrato granuloso. Nesta camada as células perdem seu núcleo e seu citoplasma parece granular (MALVEY *et al.*, 2019; TSAKOVSKA *et al.*, 2017).

Por fim, na última etapa da queratinização, os queratinócitos são encontrados no estrato córneo, no qual são chamados de corneócito. Essa camada não realiza atividade metabólica, suas células não possuem núcleo e organelas citoplasmáticas, porém são responsáveis por impedir a penetração de substâncias exógenas e a perda de fluidos corporais. Suas células são envolvidas por proteínas capazes de reter água, com formatos e orientação que conferem resistência mecânica para penetração de substâncias provenientes ao meio externo do corpo (MALVEY *et al.*, 2019; SUPE; TAKUDAGE, 2021).

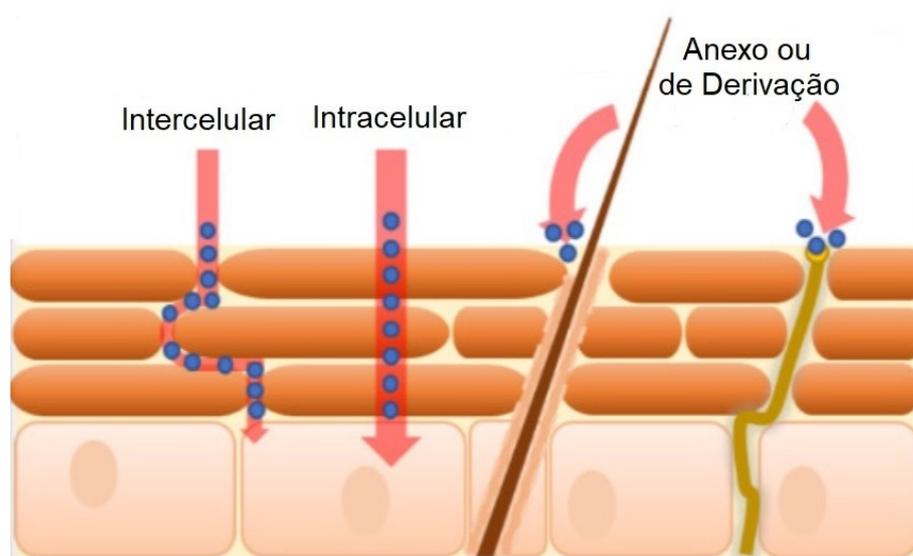
Da parte mais externa da estrutura da pele para a mais interna, localiza-se as subcamadas da epiderme: o estrato córneo seguido pelo estrato granuloso, espinhoso até o basal. Abaixo do estrato basal inicia-se a outra camada da pele, a derme. A derme é uma camada hidrofílica composta de vasos sanguíneos e células de suporte, tais como mastócito e macrófagos que possuem ação imunológica e de defesa, e por fibroblastos que são responsáveis pela produção do colágeno, da elastina e dos proteoglicanos estruturais. As fibras de colágeno compõem cerca de 70% da derme conferindo força e resistência, a elastina proporciona a elasticidade enquanto os proteoglicanos conferem elasticidade e hidratação. A derme também é

composta por glândulas sebáceas e sudoríferas, folículos pilosos terminações nervosas e por uma pequena quantidade de musculo estriado (MALVEY *et al.*, 2019; NAGULA; WAIRKAR, 2019; PATIL *et al.*, 2019).

A camada mais interna da pele é a hipoderme, também conhecida como camada subcutânea. Está localizada abaixo da derme e acima dos músculos. É constituída por adipócitos que promovem a regulação da temperatura e isolamento do corpo, além de armazenar energia (NAGULA; WAIRKAR, 2019).

A permeação de um IFA através do estrato córneo, para obter efeito local, pode ocorrer por três mecanismo de passagem: o caminho intercelular, o intracelular e o anexo (ou de derivação) conforme é demonstrado na Figura 3.

Figura 3. Caminhos de penetração do IFA pelo estrato córneo.



Fonte: Adaptado de KOVÁCIK *et al.*, 2020.

No caminho intercelular, o IFA atravessa o estrato córneo através da matriz lipídica contínua presente nos espaços extracelulares. A passagem pela fase lipídica é a via comumente empregada para as moléculas pequenas. No caminho intracelular, o ativo passa por difusão através dos corneócitos. A superfície dos corneócitos é formada por uma monocamada lipídica altamente hidrofóbica, enquanto o seu interior contém queratina que quando hidratadas promovem um ambiente aquoso favorecendo a passagem de ativos hidrofílicos. Para que haja passagem por essa via, o insumo passa por etapas

múltiplas de difusão e partição em ambientes hidrofílicos e lipofílicos. Já o caminho anexo ou de derivação, a molécula atravessa o estrato córneo através dos poros dos pelos e do suor (KOVÁCIK *et al.*, 2020; TSAKOVSKA *et al.*, 2017).

3.3.3 Formulações semissólidas para aplicação tópica

Raramente os fármacos são administrados em sua forma química pura, sendo regularmente utilizados através de formulações farmacêuticas, conhecidos popularmente como medicamentos (AULTON; TAYLOR, 2016). A formulação farmacêutica é o estado final de apresentação dos IFA na adição ou não de excipientes apropriados a fim de facilitar a sua utilização e obter o efeito terapêutico desejado, com características apropriadas para uma determinada via de administração (BRASIL, 2011).

Atualmente no mercado existe uma variedade de formulações aplicadas à pele, desde líquido ao pó. No entanto, as mais populares são as preparações semissólidas, como, géis, cremes e pomadas (NAMJOSHI *et al.*, 2020). As formulações semissólidas são geralmente multifásicas e complexas no qual fatores como o tamanho das partículas dispersas, a tensão interfacial entre as fases e a reologia, entre outros, determinam as propriedades físicas do sistema (KANFER *et al.*, 2017). Dentro desse grupo, o uso de gel tópico é uma opção segura e eficaz no tratamento de doenças relacionadas à pele (PATIL *et al.*, 2019).

Os géis são sistemas semissólidos que consistem em dispersões de moléculas pequenas ou grandes em um veículo líquido aquoso ou hidroalcoólico em uma rede de partículas sólidas coloidais, que podem consistir em substâncias inorgânicas, como sais de alumínio ou polímeros orgânicos de origem natural ou sintética (ASHARA *et al.*, 2016). Além disso, os géis podem ser formulados para conter IFA, promotores de permeação, conservantes antimicrobianos e estabilizadores (ALLEN JR. *et al.*, 2009; SOUZA, 2017)

3.3.4 Promotores de permeação

Apesar das vantagens atribuídas à via de administração tópica, o seu maior desafio é superar as características de barreira cutânea para obter a

administração dérmica ou transdérmica do IFA (ROY *et al.*, 2017). Para o fármaco permear passivamente pela via dérmica algumas propriedades físico-químicas são exigidas e se encontram descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas ideais para permeação passiva pela administração tópica.

Propriedade físico-química	Valor ideal
Massa molar	< 500 g.mol ⁻¹ ou Da
Lipofilicidade (Log P)	1-3
Solubilidade aquosa	> 1mg.mL ⁻¹
Raio hidrodinâmico	< 2nm
Ponto de fusão	< 200°C
Dose	10-40 mg.dia ⁻¹

Fonte: adaptado de IQBAL *et al.*, 2018.

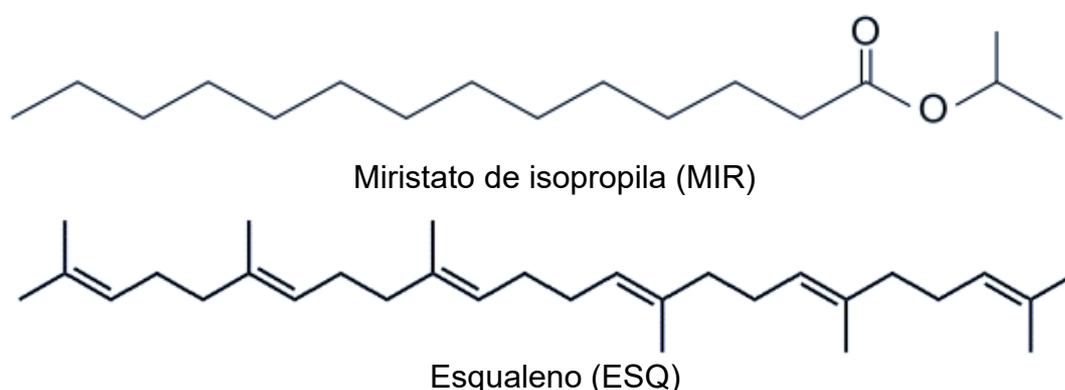
No entanto, essas características são limitadas a apenas alguns fármacos e muitas vezes essas limitações precisam ser contornadas. Para melhorar a permeação dos IFA pela pele e superar a sua baixa permeabilidade natural algumas alternativas foram desenvolvidas (IQBAL; ALI; BABOOTA, 2018). Entre estas, ressalta-se as estratégias utilizando promotores de permeação, estes são capazes de aumentar o fluxo do IFA através da pele, interagindo com os componentes da barreira ou alterando as propriedades da formulação para aumentar o transporte do fármaco (ROY *et al.*, 2017). Para tal, há basicamente duas principais abordagens: os promotores químicos e os promotores físicos, que serão apresentados abaixo.

3.3.3.1 Promotores químicos

Os promotores químicos atuam por três principais mecanismos: (i) gerando perturbações na estrutura do estrato córneo, (ii) interação com proteínas presentes e (iii) melhora a partição do fármaco com a ajuda do promotor (ou seja, solvente) (ROY *et al.*, 2017). A água é o promotor químico mais natural e atua aumentando a hidratação da camada córnea. Os álcoois, por exemplo, podem aumentar a permeação da pele por vários mecanismos, gerando o intumescimento do estrato córneo, extração de lipídios e proteínas ou melhora da solubilidade do fármaco na formulação. Os ésteres e os

hidrocarbonetos atuam através da partição na estrutura lipídica da camada córnea, como por exemplo o miristato de isopropila (MIR), sendo o éster mais estudado, e o esqualeno (ESQ) (Figura 4) (KOVÁČIK *et al.*, 2020; SOARES *et al.*, 2015).

Figura 4. Estrutura molecular dos promotores químicos de permeação o MIR e o ESQ.



Fonte: a) RODRIGUES, 2019 e b) COSMETIC INNOVATION, 2018.

O MIR, também chamado de éster isopropílico de ácido tetradecanóico, é uma molécula lipofílica com uma pequena fração polar no grupo éster. Este é conhecido por aumentar temporariamente a taxa de penetração de fármacos aplicados topicamente, superando as propriedades de barreira e aumentando o fluxo de IFA através da pele. Isto ocorre pois, devido à sua natureza hidrofóbica, induzem efeitos desordenadores às membranas lipídicas do estrato córneo ao ajustar às lamelas lipídicas. Além disso, o MIR é capaz de liquefazer parcialmente os lipídios da membrana intercelular do estrato córneo (EICHNER *et al.*, 2017; ZIDAN *et al.*, 2017).

O ESQ é um hidrocarboneto triterpeno de 30 carbonos amplamente presente na natureza no azeite de oliva, óleo de palma, óleo de gérmen de trigo, óleo de amaranto, óleo de farelo de arroz, entre outros. Dentre suas aplicações, destaca-se seu uso na indústria cosmética e farmacêutica uma vez que possui atividade antioxidante e antiinflamatória, além de ser utilizado como emoliente compatível com a pele e protetores de hidratação. O ESQ forma emulsões viscosas muito estáveis, sendo empregado para solubilizar moléculas lipofílicas, como adjuvantes e em vacinas visando a atividade de

transfecção e a formação de gotículas de tamanho pequeno (LIU *et al.*, 2020; SPANOVA; DAUM, 2011).

Devido as características citadas acima, o ESQ e o MIR foram selecionados como promotores químicos, que atuam pelo mesmo mecanismo de partição na estrutura lipídica da camada córnea, com o objetivo de potencializar a permeação da SIN no gel proposto.

3.3.3.2 Promotores físicos

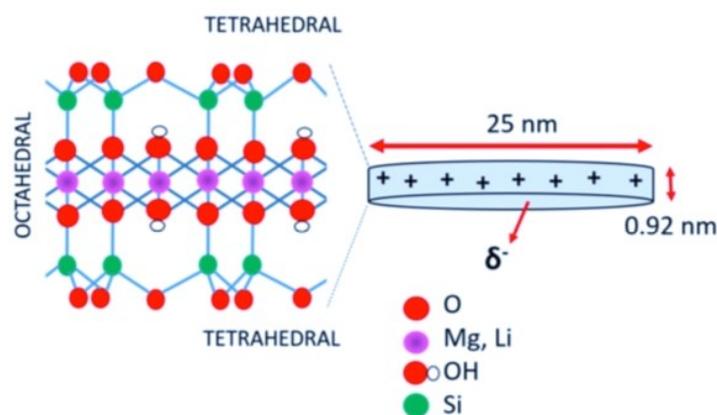
As tecnologias de promotores físicos em estudo são a iontoforese, a eletroporação, a sonoforese, as microagulhas, a injeção sem o auxílio de agulhas, a microdermoabrasão, a microporação por laser e a ablação térmica ou por radiofrequência. Porém, os métodos físicos são geralmente dolorosos e há baixa adesão do paciente (IQBAL *et al.*, 2018). Esses métodos foram cuidadosamente descritos por Soares e colaboradores em um artigo de revisão intitulado: Permeação cutânea: desafios e oportunidades (SOARES *et al.*, 2015).

3.4 LAPONITE®

O Laponite® (LAP) é uma argila sintética a base de silicato de magnésio hidratado em camadas pertencente à família dos filossilicatos. Este, é formado por uma folha octaédrica de hidróxido de metal ensanduichada entre duas folhas tetraédricas de óxido de silício, sendo denominado de mineral de argila 2:1 (HAMILTON *et al.*, 2019).

O LAP é um nanomaterial bidimensional (2D) composto de cristais em formatos de disco com aproximadamente 25 nm de diâmetro e 0,92 nm de altura e possui uma fórmula empírica $\text{Na}^{+0,7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,3})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]^{-0,7}$. A presença de cátions de lítio substitui aleatoriamente os íons magnésio na estrutura conforme mostrado na Figura 5. Essa substituição na camada octaédrica do cristal resulta em uma carga negativa nas superfícies circulares do cristal, enquanto as bordas possuem carga positiva (ou uma menor densidade negativa) dependendo da protonação dos grupos hidroxila expostos (BULAVIN, 2018; TOMÁS *et al.*, 2018).

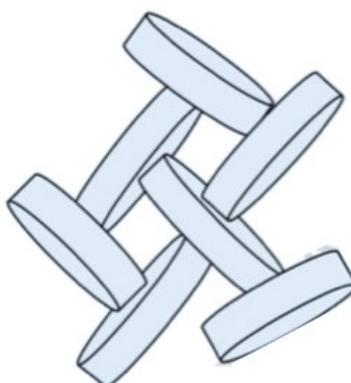
Figura 5. Representação esquemática da geometria do LAP em forma de disco e estrutura química.



Fonte: TOMÁS *et al.*, 2018.

As cargas positivas distribuídas nas bordas dos cristais de LAP podem interagir com as superfícies negativas dos adjacentes cristais, dando origem ao que é conhecido como castelo de cartas (do inglês, *house of cards*) ou gel de automontagem como demonstrado na Figura 6 (TOMÁS *et al.*, 2018). A estrutura do gel é formada por ligações iônicas, não afetando a viscosidade com a variação da temperatura, mas é facilmente quebrada com a aplicação da tensão de cisalhamento, tendo uma característica tixotrópica (BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS, 2014).

Figura 6. Representação esquemática do gel de automontagem do LAP.

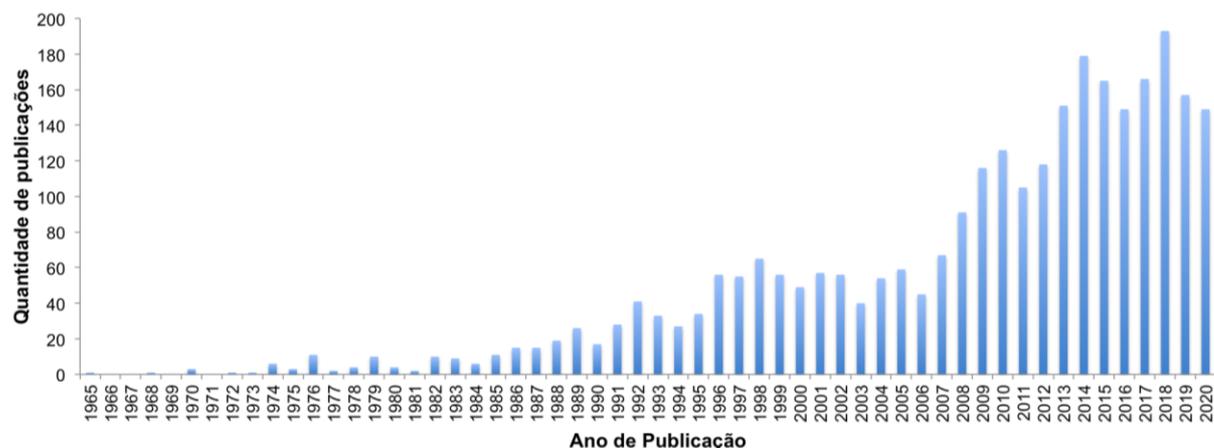


Fonte: adaptado de TOMÁS *et al.*, 2018.

O primeiro registro do LAP na literatura, segundo a base de dados SciFinder-n (SOCIETY, 2020), ocorreu em 1965 por Neumann em um estudo sobre o comportamento do uso de argilas sintéticas em dispersões de

pigmento e desde então suas publicações ao longo do ano vêm aumentando conforme observado na Figura 7 (NEUMANN, 1965).

Figura 7. Quantidades de publicações referente ao LAP na literatura e em patentes obtidas no dia 30 de novembro de 2020 na base de dados SciFinder-n.



Fonte: base de dados SciFinder-n (SOCIETY, 2020).

No mercado há diferentes tipos de LAP, sendo os mais estudados o RD e o XLG (que possui menor teor de metais tóxicos). O LAP XL21 é uma variação do XLG, portanto também possui menor teor de metais tóxicos em sua composição, além disso, os grupos hidroxilas (OH^-) presentes no XLG são substituídos por íons fluoreto (F^-) no XL21. Essa mudança altera algumas propriedades físico-químicas como demonstrado por Kimura e Haraguchi, no qual analisaram as variações refletidas na viscosidade das dispersões quando as proporções argila-álcool-água são alteradas. Em seus estudos, verificou-se que em dispersões contendo LAP XL21 foi necessário concentrações menores de etanol, em comparação ao XLG, nos pontos em que a sua viscosidade começa a aumentar e é maximizada, isso ocorre pelo fato de que mais água é necessário para hidratar o XL21 fluorado do que XLG (KIMURA; HARAGUCHI, 2017).

Este presente estudo utiliza o LAP XL21 proveniente da Colormix (São Paulo, Brasil), que também pode ser chamado de fluorossilicato de sódio e magnésio e é comercializado no Brasil para uso tópico humano. Segundo a base de dados do SciFinder-n (SOCIETY, 2020), LAP XL21 teve sua primeira publicação em patente no ano de 2012. Até Novembro de 2020 foram

encontradas nessa mesma plataforma 38 patentes e apenas duas publicações na literatura, uma na revista *Langmuir*, no qual foi realizado um estudo sobre dispersões ternárias de argila-álcool-água comparadas com misturas binárias álcool-água e avaliadas em termos de viscosidade e absorbância óptica (KIMURA; HARAGUCHI, 2017).

Em pesquisas com LAP XL21 na base de dados da Google acadêmico (GOOGLE, 2021) e SciVerse Scopus (ELSEVIER, 2021), foram encontrados 16 artigos, sendo 13 artigos publicados envolvendo o LAP XL21 nos últimos 4 anos. Dos artigos encontrados, a maior parte está relacionado a estudos comparativos entre os diferentes tipos de LAP ou de revisão (DAS *et al.*, 2019; KIMURA; HARAGUCHI, 2017; LBOVKA *et al.*, 2018; RUZICKA; ZACCARELLI, 2011). Devido à baixa toxicidade, o XL21 se torna uma ótima estratégia a ser explorada na biomedicina e na área farmacêutica, uma vez que ainda há poucos estudos tendo em vista o baixo número de publicações envolvendo esse material para essas finalidades, descrito mais detalhadamente a seguir.

3.4.1 Uso do Laponite® XL21 como veículo de liberação de fármacos

Entre os artigos encontrados na pesquisa realizada na base de dados da Google acadêmico (GOOGLE, 2021) e SciVerse Scopus (ELSEVIER, 2021), os artigos descritos na literatura relacionados ao LAP XL21 como veículo de liberação de fármacos na área farmacêutica foram apenas 4 e estes estão sumarizados na Tabela 3. Assim, pode-se perceber que existem poucos trabalhos sobre o uso do LAP XL21 na área farmacêutica, mesmo este sendo de alta pureza, baixo teor de metais tóxicos, baixo conteúdo microbiológico e indicado para controle de reologia em formulações de cuidados com a pele estabilizadas em pH 5,5 ou inferior (BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS, 2014).

Tabela 3. Artigos descritos na literatura relacionados ao LAP XL21 como veículo de liberação de fármacos na área farmacêutica nos últimos 4 anos.

Título	Ativo	Objetivo	Referência
<i>Formulation and antibacterial properties of clay mineral-tetracycline and T-doxycycline composites</i>	Tetraciclina e Doxiciclina	Tratamento de patógenos comuns da pele	(HAMILTON <i>et al.</i> , 2019)
Lyophilised Biopolymer-Clay Hydrogels for Drug delivery	Sulfatiazol	Argilas contendo fármacos em combinação com hidrogéis naturais para a preparação de xerogéis liofilizados.	(KIANFAR <i>et al.</i> , 2017)
Cell encapsulated and microenvironment modulating microbeads containing alginate hydrogel system for bone tissue engineering	Alginato	Sistema de microesferas-hidrogel para encapsular dois/mais tipos de células para a regeneração de tecido heterogêneo.	(VEERNALA <i>et al.</i> , 2021)
Hydrogel Nanocomposites with Independently Tunable Rheology and Mechanics	Hidrogel dopado com filossilicato	Ampla aplicabilidade para aplicação tópica.	(UNTERMAN <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

A sinvastatina utilizada foi proveniente da Henan Topfond Pharmaceutical Ltda (Zhengzhou, China). O Laponite[®] XL21 foi obtido da Colormix (São Paulo, Brasil). Etanol 96% da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi preparada pelo sistema Milli-Q[®] da Millipore Corporation (Massachusetts, EUA). O ácido cítrico utilizado nos ajustes do pH foram fornecidos pela Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, Brasil). Os promotores químicos de permeação esqualeno da Skin Lab Cosméticos (São Paulo, Brasil) e o miristato de isopropila é da Importadora química Delaware (Porto Alegre, Brasil). Para o preparo do tampão PBS foi utilizado fosfato de sódio dibásico da Química Moderna Indústria e Comércio (São Paulo, Brasil), fosfato de potássio monobásico da Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, Brasil), cloreto de sódio da Nuclear Ltda (São Paulo, Brasil) e cloreto de potássio da Labimpex Indústria e Comercio de Produtos para Laboratório Ltda (São Paulo, Brasil). A acetonitrila usada foi a de grau HPLC da Biograde Industries (BioScie Brazil, Goiás, Brasil).

4.2 CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

4.2.1 Preparo dos pós

A fim de analisar o impacto do solvente no preparo dos géis e poder caracterizar os materiais utilizando as técnicas de caracterização no estado sólido, foram preparadas amostras na forma de pó em proporções variáveis de SIN e LAP por secagem do solvente. Para tal, proporções variáveis de SIN e LAP foram solubilizados em 125 mL de etanol 95%. Os pós gerados após secagem em rotaevaporador foram denominadas de formulações de acordo com a proporção de SIN:LAP, conforme demonstrado na Tabela 4. A secagem do solvente foi realizada no rotaevaporador Laborota 4000 efficient WB eco da Heidolph (Schwabach, Alemanha). O solvente evaporou em aproximadamente 15 minutos à uma temperatura de 50°C e uma rotação de 120 rpm sob vácuo.

Tabela 4. Proporções de SIN e LAP nos pós preparados para a caracterização e desenvolvimento dos géis a serem estudados.

Proporção (SIN:LAP)	Porcentagens (%)	Etanol 95% em (mL)
F1:2	33,34 (SIN)	125
	66,67 (LAP)	
F1:3	25,00 (SIN)	125
	75,00 (LAP)	
F1:4	20,00 (SIN)	125
	80,00 (LAP)	

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

4.2.2 Caracterização do sólido

Os sólidos obtidos no item 4.2.1, juntamente com seus constituintes isolados e uma mistura física homogeneizada por maceração na proporção 1:1 (m/m), denominada de MF 1:1 foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TG), difração de raios X de pó (XRPD), microscopia de varredura eletrônica (MEV) e o teor através da quantificação de SIN por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV). Metodologias descritas detalhadamente a seguir:

4.2.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho

As espectroscopias na região do infravermelho foram realizadas em um espectrômetro FTIR/NIR Frontier da Perkin Elmer (Massachusetts, EUA), equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR) para amostragem universal. As amostras foram homogeneizadas em gral com pistilo previamente e foram realizadas uma média de 8 varreduras à temperatura ambiente em uma faixa espectral de 600 a 4000 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} .

4.2.2.2 Calorimetria exploratória diferencial

As análises de DSC foram obtidas em célula Shimadzu DSC-50 utilizando cadinhos de alumínio fechados (Quioto, Japão). As amostras foram pesadas em aproximadamente 5 mg enquanto a temperatura variou de 25 a 500°C a uma razão de 10°C.min⁻¹. A atmosfera utilizada foi a de nitrogênio, a um fluxo de 100 mL.min⁻¹.

4.2.2.3 Análise termogravimétrica

As análises termogravimétricas foram obtidas em célula Shimadzu TGA-50 utilizando cadinho de alumínio fechado (Quioto, Japão). As amostras foram pesadas em aproximadamente 10 mg enquanto a faixa de temperatura variou de 25 a 800°C a uma razão de 10°C.min⁻¹. A atmosfera utilizada foi a de nitrogênio, a um fluxo de 50 mL.min⁻¹.

4.2.2.4 Difração de raios-X de pó

As medidas de XRPD foram obtidas em um difratômetro de raios θ - θ D2 Phaser, (Bruker), com radiação de cobre $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418$), operando com uma corrente de 10 mA, voltagem de 30 kV e equipado com detector de cintilação unidimensional LYNXEYE. As amostras foram obtidas a temperatura ambiente, através de uma varredura angular a 2θ de 5° a 40°, com intervalo angular de 0,089° a cada 0,5 s.

4.2.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

A avaliação da morfologia foi realizada por MEV em um microscópio Jeol, modelo JSM6390LV na voltagem de aceleração de 10 kV, em diferentes aumentos, acoplado com o detector de energia dispersiva (EDS) para obter a composição química elementar qualitativa. As amostras foram previamente fixadas com fita adesiva dupla face em *stubs* e recobertas com ouro em recobridora a vácuo Leica EM SCD 500.

4.2.2.6 Teor de SIN nos pós

O doseamento dos pós foi realizado através da solubilização de 100 mg das formulações obtidas por rotaevaporação na etapa 4.2.2 em 50 mL de acetonitrila. As análises foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção no ultravioleta através da metodologia descrita no Apêndice A.

Considerou-se o valor da porcentagem teórica do LAP presente nas formulações. Para tal, foi preparado uma solução de LAP em acetonitrila ($1000 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e diluído para realizar o branco do equipamento para cada formulação analisada. Em seguida, cada amostra foi diluída em acetonitrila visando uma concentração teórica de SIN de $15 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e posteriormente quantificadas. As diluições realizadas foram consideradas nos cálculos.

4.3 ESTUDOS DE PRÉ FORMULAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS DE LAPONITE®

4.3.1 Estudos de viscosidade da pré-formulação e desenvolvimento dos géis de Laponite®

O estudo de pré-formulação dos géis ocorreu em duas etapas: (i) avaliação da influência da concentração de LAP na viscosidade de uma solução hidroalcoólica e (ii) avaliação da influência de 5% dos promotores MIR e ESQ na viscosidade dos pré-géis estudados. O desenvolvimento dos géis de LAP foram realizados a partir da análise dos resultados obtidos nos estudos de pré-formulação. A tabela 4 resume os estudos realizados nesta etapa.

Tabela 5. Estudos desenvolvidos no estudo de pré formulação e desenvolvimento dos géis de LAP.

Siglas	Composição sólida	Composição líquida	Estudo
G2	2% de LAP	Solução hidroalcoólica (80:20)	Tempo de gelificação e viscosidade à 25, 32 e 37°C
G3	3% de LAP	Solução hidroalcoólica (80:20)	Tempo de gelificação e viscosidade à 25, 32 e 37°C
G4	4% de LAP	Solução hidroalcoólica (80:20)	Tempo de gelificação e viscosidade à 25, 32 e 37°C
PG-3M	3% de LAP	5% de MIR; Solução hidroalcoólica (80:20)	Viscosidade à 25, 32 e 37°C
PG-4M	4% de LAP	5% de MIR; Solução hidroalcoólica (80:20)	Viscosidade à 25, 32 e 37°C
PG-3E	3% de LAP	5% de ESQ; Solução hidroalcoólica (80:20)	Viscosidade à 25, 32 e 37°C
PG-4M	4% de LAP	5% de ESQ; Solução hidroalcoólica (80:20)	Viscosidade à 25, 32 e 37°C
FSP	3% de LAP; 7,5 mg.mL ⁻¹ de SIN	Solução hidroalcoólica (80:20 água:etanol)	Viscosidade à 25, 32 e 37°C
FMIR	3% de LAP; 7,5 mg.mL ⁻¹ de SIN	5% de MIR; Solução hidroalcoólica (80:20)	Viscosidade à 25, 32 e 37°C
FESQ	4% de LAP; 7,5 mg.mL ⁻¹ de SIN	5% de ESQ; Solução hidroalcoólica (80:20)	Viscosidade à 25, 32 e 37°C

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

4.3.1.1 Avaliação da influência da concentração do Laponite® na viscosidade

Os géis de LAP foram preparados nas concentrações de 2, 3 e 4% de LAP conforme as recomendações da BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS,

uma vez que abaixo de 2% não há a formação do gel e acima de 4% o gel fica muito viscoso. O LAP foi adicionado a uma solução hidroalcoólica (80:20 água:etanol), sem a presença da SIN e foram denominados G2, G3 e G4 para as concentrações de 2, 3 e 4% respectivamente. As soluções preparadas foram homogeneizadas por agitação magnética durante 10 minutos. O pH das formulações foi avaliado e ajustado a $5,0 \pm 0,5$ (pH da pele) através de um pHmetro modelo SP1800 da Sensoglass (São Paulo, Brasil) e uma solução de 20% de ácido cítrico conforme recomendado pelo manual da BYK (BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS, 2014).

As análises reológicas foram realizadas em viscosímetro LVDV-II + Pro da *Brookfield Engineering Laboratories*, INC (Massachusetts, EUA) acoplado ao banho termostaticado TE-2005 Tecnal (São Paulo, Brasil). A fim de averiguar o tempo de gelificação do gel, a viscosidade aparente dos géis G2, G3 e G4 foi avaliada à 25°C após 0, 4 e 24 horas (h) de seu preparo. Para o G2 e G3 foi utilizado o *spindle* LV3 a uma rotação fixa de 30 rpm. Para o G4, devido a sua maior viscosidade, foi utilizado o *spindle* LV4 a uma rotação fixa de 10 rpm, a fim de manter as recomendações determinadas pelo fabricante. Com o tempo de gelificação definido a 24h, foi analisado a viscosidade aparente dos géis à 25, 32 e 37°C com o propósito de averiguar a influência da temperatura na viscosidade.

4.3.1.2 Avaliação da influência dos promotores de permeação na viscosidade

Com a intenção de avaliar a influência dos promotores de permeação, foi preparado pré-géis, ainda sem a adição do IFA, nas concentrações de 3 e 4% de LAP na presença de 5% de cada permeador químico selecionado, o miristato de isopropila (MIR) ou esqualeno (ESQ). Os géis foram preparados através da adição do permeador antes da solução hidroalcoólica, seguindo as demais etapas de homogeneização e ajuste de pH descrito no item 4.3.1.1 Os pré-géis contendo MIR a 3% e a 4% de LAP foram denominados de PG-3M e PG-4M, respectivamente, enquanto os de ESQ, também a 3 e 4% de LAP foram denominados de PG-3E e PG-4E. As análises ocorreram após 24 horas de preparo nas temperaturas de 25, 32 e 37°C.

4.3.1.3 Desenvolvimento das formulações propostas

Através dos resultados obtidos nos estudos de pré-formulação, foram propostos dois géis de aplicação tópica: (i) um contendo $7,50 \text{ mg.mL}^{-1}$ de SIN, 3% de LAP (proporção de 1:4 SIN e LAP), e 5% de MIR em uma solução hidroalcoólica na proporção 80:20 respectivamente denominada de FMIR e (ii) outra formulação contendo $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de SIN, 4% de LAP e 5% de esqualeno em uma solução hidroalcoólica na proporção 80:20 respectivamente denominada de FESQ. A fim de comparar a influência dos promotores de permeação, foi preparado um gel contendo $7,50 \text{ mg.mL}^{-1}$ de SIN e 3% de LAP em uma solução hidroalcoólica na proporção 80:20 denominada FSP. Todas as amostras foram homogeneizadas durante 10 minutos com agitação magnética e ajustadas ao pH 5,0 ($\pm 0,5$) com uma solução aquosa de 20% de ácido cítrico, conforme demonstrado na Figura 8. Após 24 horas do seu preparo, as amostras foram analisadas no viscosímetro de Brookfield com o *spindle* LV3 a uma rotação fixa de 30 rpm nas temperaturas de 25, 32 e 37°C.

Figura 8. Esquema ilustrativo do preparo dos géis e pré-géis desenvolvidos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

4.3.2 Teor de SIN nos géis desenvolvidos

A análise de SIN presente nas formulações denominadas FSP, FMIR e FESQ foi feita através da dissolução de 150 mg do gel em 50 mL de acetonitrila homogeneizada em banho de ultrassom (10 min) e centrifugadas à 5000 rpm

(15 min). O sobrenadante foi diluído em fase móvel (85:15 acetonitrila:água) na proporção 1:3 e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme metodologia descrita no apêndice B. As análises foram feitas em triplicatas.

4.3.3 Estudos por microscopia de luz polarizada

A técnica de microscopia de luz polarizada (MLP) foi utilizada para avaliar a presença dos cristais da SIN nas formulações FSP, FMIR e FESQ. De forma comparativa, analisou-se os géis G3, PG-3M e PG-4E. Pequenas quantidades dos géis e das formulações finais foram depositadas sobre as lâminas de vidro, cobertas com lamínulas de vidro e analisadas por MLP modelo SMZ-168-BL equipado com uma lente polarizadora acoplada a um sistema de aquisição TCS pro500 e um iluminador óptico MLC-150 da Motic Microscopes (Texas, EUA). A avaliação das amostras foi feita na presença da luz polarizada com magnificação 3,0x, no qual as imagens foram capturadas por fotografia digital. A cristalinidade foi baseada através da observação visual da birrefringência dos cristais (quando presentes), em comparação com as regiões amorfas não-birrefringentes.

4.4 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO DA SIN VASTATINA *ex vivo* EM PELE HUMANA

4.4.1 Obtenção da pele

A pele humana foi obtida através de cirurgias abdominais realizadas em um hospital local, sob doação anônima. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número CAE: 87349418.7.0000.0121. As amostras de pele foram coletadas em tampão Krebs¹ imediatamente após a cirurgia. Em seguida, as mesmas foram preparadas com a retirada do tecido adiposo subcutâneo e armazenadas em folhas de papel alumínio à -20°C até o uso.

¹Tampão Krebs - NaCl (20mM); KCl (4,7mM); KH₂PO₄ (1,2mM); NaHCO₃ (25mM); CaCl₂ (2,5mM); MgCl₂ (1mM); glicose (5,5mM), pH 7,4.

4.4.2 Estudos de permeabilidade da sinvastatina *ex vivo*

O ensaio de permeação ocorreu em um equipamento de difusão tipo câmara de Franz da VHTEX produtos para laboratórios (Santa Catarina, Brasil), contendo 8 cubas para testes simultâneos. Os valores das áreas de superfície e volume do compartimento receptor foram levados em consideração nos cálculos realizados e estão apresentados na Tabela 6.

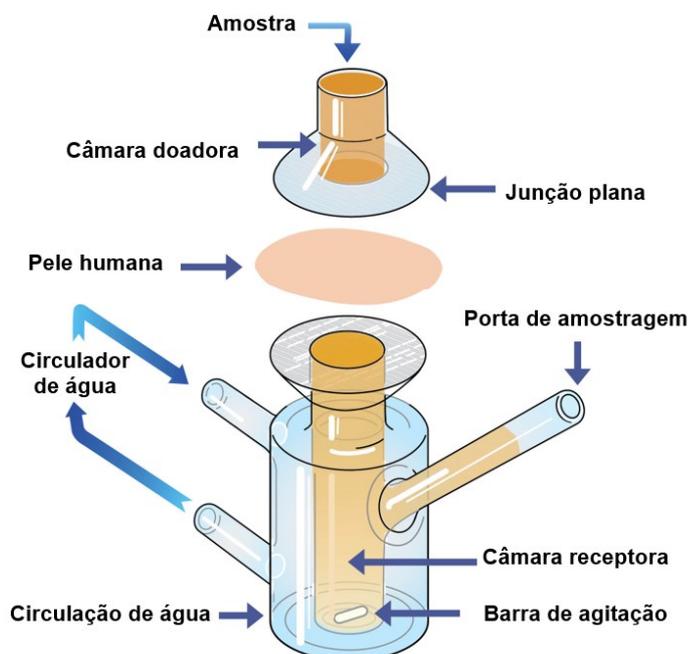
Tabela 6. Área de superfície e volume do compartimento receptor das cubas utilizados no ensaio de permeação.

Cuba	Área de superfície (cm ²)	Volume do compartimento receptor (mL)
I	1,77	13,85
II	1,54	13,16
III	1,33	14,07
IV	1,54	13,75
V	1,54	13,91
VI	1,33	14,02
VII	1,54	13,68
VIII	1,77	14,37

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A pele foi retirada do armazenamento e condicionada em temperatura ambiente na solução de Krebs. Parte da derme foi removida para garantir que não houvesse tecido adiposo e este interferisse nos resultados. Em seguida, a pele foi seccionada em pedaços e fixadas entre os compartimentos doador e receptor das cubas da célula de Franz (Figura 10). A solução receptora foi preparada a partir de uma solução de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e etanol na proporção 70:30, respectivamente, e mantida sob agitação magnética contínua de 240 rpm a 37°C ± 0,1 durante todo o experimento.

Figura 9. Sistema de montagem da célula de Franz para a permeação *ex vivo* em pele humana.



Fonte: Adaptado de GEAR, (s. d.).

O compartimento da solução doadora foi preenchido com 2 g dos géis FMIR e FESQ (n=5) desenvolvidos no item 4.3.1.3 preparados com 24 horas de antecedência. Paralelamente, foi preparado um controle na ausência do MIR e do ESQ denominado FSP (n=4) também descrito no item 4.3.1.3, para observar o desempenho dos promotores de permeação.

Nos tempos de 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas, alíquotas de 400 μ L foram retiradas da câmara receptora e o volume foi completado até sua capacidade descrita na Tabela 6 com a mesma solução inicial. As alíquotas foram diluídas em 800 μ L de acetonitrila, homogeneizadas no vórtex e centrifugadas à 6200 rpm em centrifuga Mini Star Bélgica por 15 minutos com o objetivo de precipitar as proteínas presentes na pele. A solução resultante (desproteínada) foi analisada por CLAE, conforme descrito no apêndice B.

4.4.3 Avaliação da retenção cutânea da sinvastatina

Após a última coleta, a formulação foi removida do compartimento doador com o auxílio de uma espátula, e a pele foi retirada da câmara de Franz. A pele foi limpa com auxílio de uma gaze e tampão PBS (pH 7,4) para garantir a remoção do excesso da solução doadora, em seguida separou-se a derme

da epiderme com o auxílio de um bisturi. A extração da SIN das camadas da pele foi feita pela adição de 5 mL de acetonitrila homogeneizada por vortex e banho de ultrassom (10 min). A solução ficou a temperatura ambiente por 24 horas sendo submetida novamente à etapa de homogeneização com posterior centrifugação à 6200 rpm durante 15 minutos. A solução desproteínada foi analisada por CLAE conforme metodologia descrita no apêndice B.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do LAP, da SIN, da MF 1:1, do ESQ e do MIR foi realizada frente aos micro-organismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e *Escherichia coli* (ATCC 25922). As cepas de *S. aureus* e *E. coli* foram replicadas para Caldo Mueller-Hinton (MH) e incubadas à 36°C por 76 horas. Em seguida, as suspensões contendo as cepas foram diluídas em salina estéril até apresentarem a mesma turbidez do tubo de ensaio número 0,5 preparado previamente conforme a escala de McFarland descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Escala padrão de turbidez McFarland.

Número (nº)	BaCl ₂ 0,048M (mL)	H ₂ SO ₄ 0,36M (mL)	Volume (mL)	Nº Células
0,5	0,05	9,95	10	1,5x10 ⁸
1	0,1	9,9	10	3x10 ⁸
2	0,2	9,8	10	6x10 ⁸
3	0,3	9,7	10	9x10 ⁸
4	0,4	9,6	10	12x10 ⁸
5	0,5	9,5	10	15x10 ⁸
6	0,6	9,4	10	18x10 ⁸
7	0,7	9,3	10	21x10 ⁸
8	0,8	9,2	10	24x10 ⁸
9	0,9	9,1	10	27x10 ⁸
10	1,0	9,0	10	30x10 ⁸

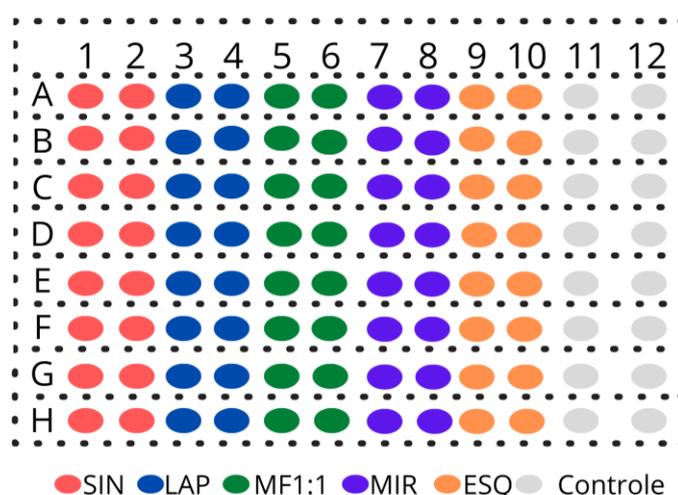
Fonte: Adaptado de WITKOWSKA-BANASZCZAK *et. al.*, 2015.

As suspensões contendo turbidez similar ao tubo número 0,5 da escala de Mc Farland foram diluídas (1 mL da suspensão em 9 mL de salina estéril), de forma que as concentrações dos inóculos estivessem com aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células.mL⁻¹.

Em seguida preparou-se as amostras, no qual 10 mg de LAP foi diluído em 10 mL da solução salina estéril. Enquanto 10 mg de SIN, 20 mg da MF 1:1 (quantidade equivalente a 10 mg de SIN), 10 mg do ESQ e 10 mg do MIR foram diluídos em 10 mL de uma solução 50:50 (v/v) de salina estéril e DMSO. Com todas as soluções preparadas, as amostras foram diluídas em solução salina na faixa de 250 µg.mL⁻¹ a 3,9 µg.mL⁻¹ nos próprios poços da placa de microdiluição.

A inoculação nas microplacas foi realizada em duplicata conforme demonstrado na Figura 10. Nos poços da fileira 1 e 2 foram feitas as diluições da SIN, nas fileiras 3 e 4 do LAP, nas fileiras 5 e 6 da MF 1:1, nas fileiras 7 e 8 do MIR e nas fileiras 9 e 10 do ESQ. Na sequência foi adicionado 80 µL do caldo MH e 50 µL da suspensão de cada micro-organismo a cada poço. Nas fileiras de 11 e 12 foram feitos os controles positivo e negativo, em duplicata. Onde se avaliou a esterilidade do meio de cultivo e do diluente, a capacidade promotora de crescimento do meio de cultivo, a presença de contaminantes nas amostras e o efeito do diluente (salina/DMSO) sobre a inibição do crescimento dos micro-organismos.

Figura 10. Representação da análise de microdiluição em caldo dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* para a SIN, LAP, MF 1:1, MIR e ESQ.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

As placas foram então incubadas em estufa à 36°C por 48h. Posteriormente, para confirmar o crescimento do micro-organismo em cada orifício, adicionou-se 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio a 0,5% (m/v) e realizou uma incubação adicional de 2 h, a 36°C. Os poços com crescimento celular adquiriram a coloração rosa, enquanto os poços sem crescimento permaneceram incolores. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração da diluição da amostra que inibiu o crescimento microbiano.

4.6 AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA SIN

4.6.1 Linhagens e cultivos celular

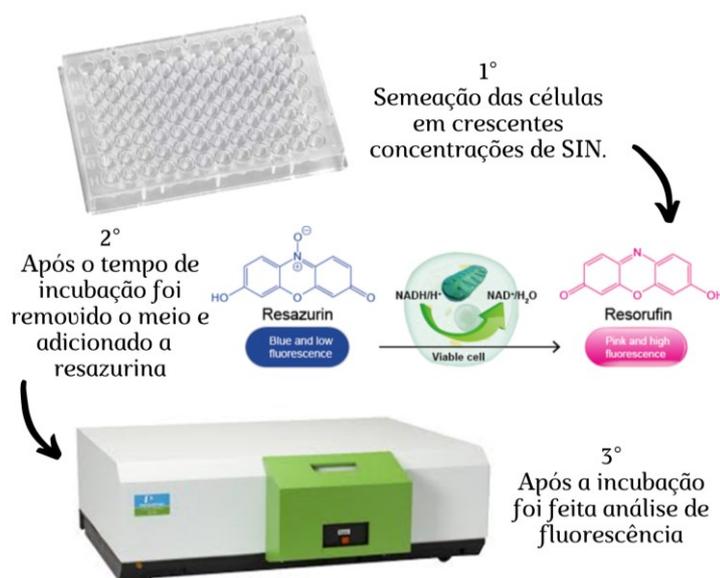
As células tumorais utilizadas pertencem a linhagem celular B16-F10 de melanoma murino e foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estas foram cultivadas em frascos apropriadas para cultura celular contendo meio *Dulbelco's Modified Eagle* (DMEM) pH 7,4, somado de soro fetal bovino (SFB) 10% (v/v), 100 U.mL⁻¹ penicilina, 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina, 10 mM de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (HEPES) e mantidas em estufa umidificada, à 37°C, em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂). As células foram subcultivadas assim que atingiram aproximadamente 80% de confluência, utilizando solução tampão PBS (1x) para lavagem e, após, tripsina para dissociação celular. Os estoques celulares foram mantidos em DMEM contendo 10% de DMSO a aproximadamente -180°C, em reservatório de nitrogênio líquido.

4.6.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada quantitativamente usando o ensaio de reagente resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células foram semeadas (1x10⁴ células/poço) em placa de 96 poços e crescentes concentrações de SIN (Figura 11). Após o tempo de incubação de 24 ou 48 h, o meio de cultivo foi removido e substituído por DMEM contendo resazurina (1mg.mL⁻¹). Após 2 h de incubação, a fluorescência foi medida em espectrômetro de fluorescência (LS 55 Perkin Elmer, excitação/emissão:

530/590nm). Dois ensaios independentes foram realizados em triplicata, e os resultados estão expressos em porcentagem considerando as células controle como 100% de viabilidade.

Figura 11. Esquema do ensaio da viabilidade celular.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

4.7 ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA DO GEL DE LAPONITE[®], SINVASTATINA E MIRISTATO DE ISOPROPILA

4.7.1 Testes físico-químicos

As formulações FSP e FMIR descritas no item 4.3.1.3 foram embaladas em bisnagas brancas opacas de 100 mL e incubadas em estufas à 25±0,1°C e a 40±0,1°C por 28 dias. Alíquotas das amostras foram avaliadas nos dias zero, 7, 14 e 28, quanto ao teor de SIN (doseamento), pH e viscosidade descritos no item 4.3.

4.7.2 Teste microbiológico

A determinação do número total de bactérias mesofílicas e fungos nas formulações foi realizado pela metodologia de contagem em placa *Pour plate* conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019a), no tempo zero e após 28 dias de preparo da amostra. As amostras foram diluídas nas proporções 1:10 e 1:100 em tampão fosfato pH 7,0. Uma alíquota de 1 mL de

cada amostra foi transferida para placa de Petri no qual adicionou-se ágar caseína-soja para a análise de bactérias e ágar Sabouraud-dextrose para análise de fungos. As placas foram incubadas à 35°C por 3 dias para analisar o crescimento de bactérias e à 25°C por 7 dias para analisar o crescimento de fungos.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram relatados como a média \pm desvio padrão. As análises de variância (ANOVA) de uma via e teste de comparação entre grupos Tukey-HSD foram realizados pelo *software* StatPlus versão 7.5.0.0 para mac (AnalystSoft Inc., Walnut, Califórnia, EUA) a fim de verificar a significância estatística com um intervalo de confiança de 95%. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo (sendo estatisticamente diferentes).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO

Na etapa de desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica, a caracterização física dos sólidos desempenha um papel importante nas fases iniciais para assegurar o controle de qualidade e a reprodutibilidade da formulação (DE MOURA *et al.*, 2017). No estado sólido, as propriedades físicas de fármacos e excipientes farmacêuticos são de interesse pois podem afetar tanto na formulação quanto ao comportamento biológico da fórmula final. A estrutura da forma cristalina ou da forma amorfa de uma substância pode afetar sua estabilidade no estado sólido, suas propriedades e biodisponibilidade. (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

Os estudos na etapa de pré-formulação de uma forma farmacêutica se concentram em avaliar a estabilidade do IFA isolado e na presença dos excipientes, criando informações úteis que podem ser usadas para desenvolver uma formulação estável e comercializada assegurando a qualidade do produto (BANDOPADHYAY *et al.*, 2018).

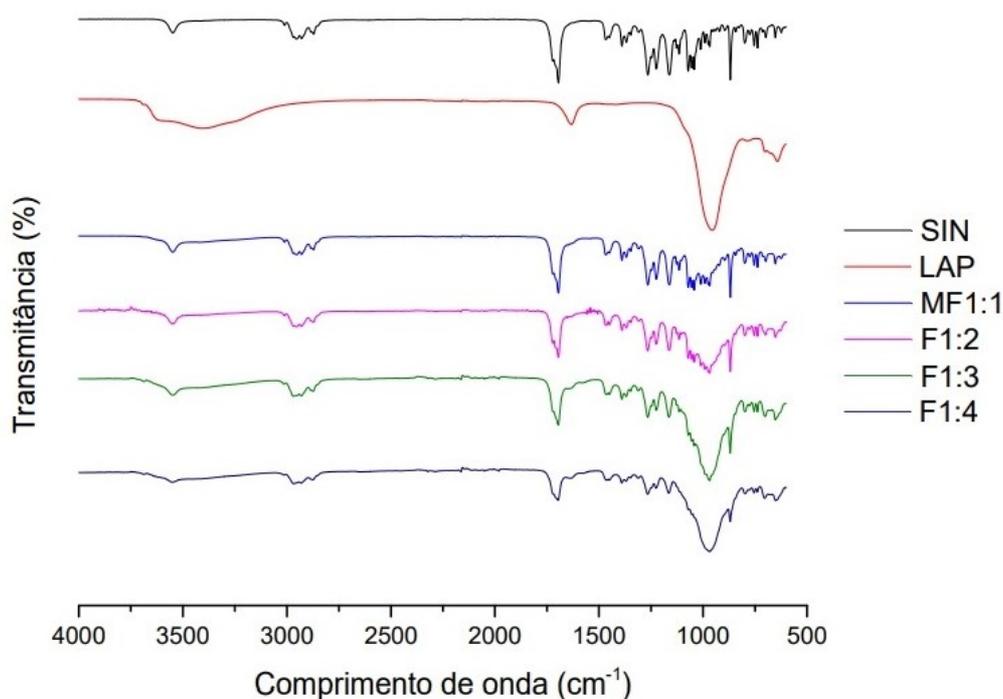
Segundo a Farmacopeia Brasileira: o controle de qualidade é o conjunto de medidas destinadas a garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos, que satisfaçam às normas de identidade, atividade, teor, pureza, eficácia e inocuidade (ANVISA, 2019a). Segundo a resolução RDC nº 301, de 21 de agosto de 2019 sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF), o Sistema da Qualidade Farmacêutica pode se estender ao estágio do desenvolvimento farmacêutico, de forma a facilitar a inovação e a melhoria contínua, e fortalecer o vínculo entre o desenvolvimento farmacêutico e as atividades de fabricação.

Devido a importância da correta caracterização do estado sólido dos constituintes da formulação farmacêutica, o emprego de múltiplas técnicas de modo integrado, tais como análises térmicas, microscópicas, espectroscópicas, cristalográficas e de avaliação de desempenho são empregadas na caracterização dos IFA e seus excipientes (RIBAS, 2015).

5.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

Dentre as abordagens espectroscópicas, o FTIR é uma das mais usuais para a caracterização de amostras sólidas. Esse fato, se justifica por se tratar de uma técnica não destrutiva, que utiliza uma quantidade mínima de amostra para medir a absorbância da radiação no infravermelho de ligações dipolo dos grupos funcionais de moléculas corresponde à frequência de vibração dos átomos de uma parte da amostra analisada (JONES, 2000; VALAND *et al.*, 2020). A Figura 12 apresenta os espectros obtidos por FTIR para SIN, LAP, MF1:1 e as formulações F1:2, F1:3 e F1:4 descritas no item 4.2.1.

Figura 12. Espectros de infravermelho da SIN (cor preta), do LAP (cor vermelha), da MF1:1 (cor azul), da F1:2 (cor rosa), F1:3 (cor verde) e da F1:4 (cor roxa).



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

O primeiro espectro da Figura 12 mostra bandas características da estrutura da SIN no comprimento de onda em 3549 cm^{-1} devido ao alongamento da ligação OH, entre os comprimentos 2955 e 2870 cm^{-1} obteve-se os picos referentes aos carbonos primários e secundários da molécula. O pico em 1694 cm^{-1} é devido ao estiramento carbonílico (C=O), em 1265 cm^{-1}

teve-se o pico referente ao desdobramento C-O-C da lactona (éster cíclico) e em 1162 cm^{-1} devido à ligação C-O-C de ésteres.

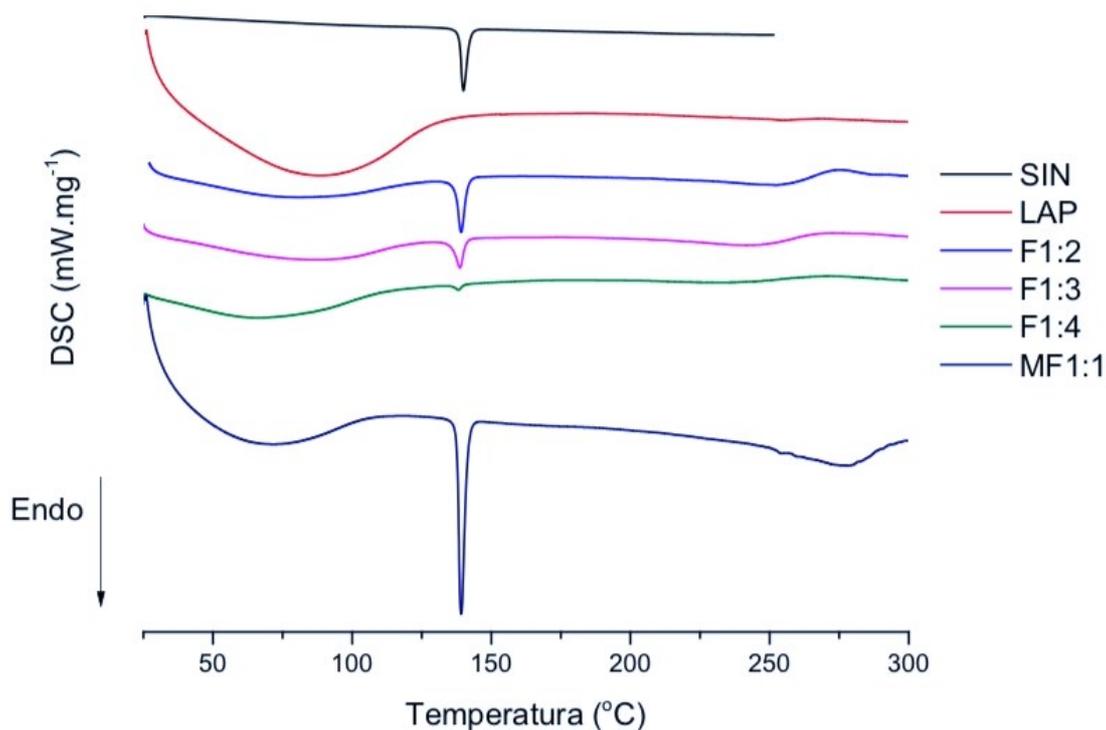
O segundo espectro mostrado na Figura 12 demonstra bandas características da estrutura do LAP. No comprimento de onda em 955 cm^{-1} o espectro exibiu uma grande banda típica da vibração Si-O. Em 651 cm^{-1} observa-se a banda de flexão do grupo hidroxila Mg-OH e em 1620 cm^{-1} referente à curvatura da água entre camadas. Já, em 3405 cm^{-1} observa-se uma leve banda referente a vibração de alongamento atribuída aos grupos hidroxila Mg-OH (PERARO *et al.*, 2020).

Nos espectros seguintes apresentados na Figura 10, ao analisar seus comprimentos de onda, observa-se um leve deslocamento nos picos dos espectros da SIN e do LAP. Com isso, demonstra-se que a SIN e o LAP interagem entre si. Além disso, pode-se perceber que a intensificação das bandas referente ao LAP nas formulações no qual a proporção da argila sintética é superior, enquanto há uma diminuição nas bandas características da SIN.

5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

Dentre as diversas técnicas térmicas de caracterização de amostras sólidas, destaca-se como as mais usuais a TG e a DSC. A análise por DSC permite o conhecimento das propriedades termodinâmicas tais como: capacidades térmicas, temperaturas das transições de fase e entalpias, através do monitoramento de eventos endotérmico ou exotérmico em função da variação de temperatura (PEÑALVER *et al.*, 2020). A Figura 13 mostra as curvas referentes as análises de DSC da SIN, do LAP, da MF1:1 e das formulações F1:2, F1:3 e F1:4.

Figura 13. Curvas referentes as análises de DSC da SIN, do LAP, das formulações F1:2, F1:3, F1:4 e da MF1:1.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A SIN apresentou um evento endotérmico referente a temperatura de fusão em 139,99°C com calor de fusão (ΔH) de $-128,67 \text{ J.g}^{-1}$ que está de acordo com o relatado na literatura (DRUGBANK, 2005).

A análise do LAP relatou um evento em 86,34°C com absorção (ΔH) de $-365,72 \text{ J.g}^{-1}$, neste evento o Laponite® perde a água presente em sua composição. Esse componente não apresenta nenhum evento endotérmico relativo a fusão, por se tratar de um precipitado amorfo (BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS, 2014).

As análises das formulações F1:2, F1:3 e F1:4 demonstraram um primeiro evento endotérmico em 79,95°C com ΔH de $122,57 \text{ J.g}^{-1}$, 85,46°C com ΔH de $125,81 \text{ J.g}^{-1}$ e 65,35°C com ΔH de $108,14 \text{ J.g}^{-1}$ respectivamente, referentes a perda das moléculas de água presentes em sua composição. O segundo evento das formulações ocorrera a 139,11°C com ΔH de $12,61 \text{ J.g}^{-1}$, 138,74°C com ΔH de $8,08 \text{ J.g}^{-1}$ e 138,14°C com ΔH de $1,17 \text{ J.g}^{-1}$ respectivamente devido a fusão da SIN que ocorre a uma temperatura até 1,85°C abaixo da reportada anteriormente pelo IFA isolado, no qual gerou

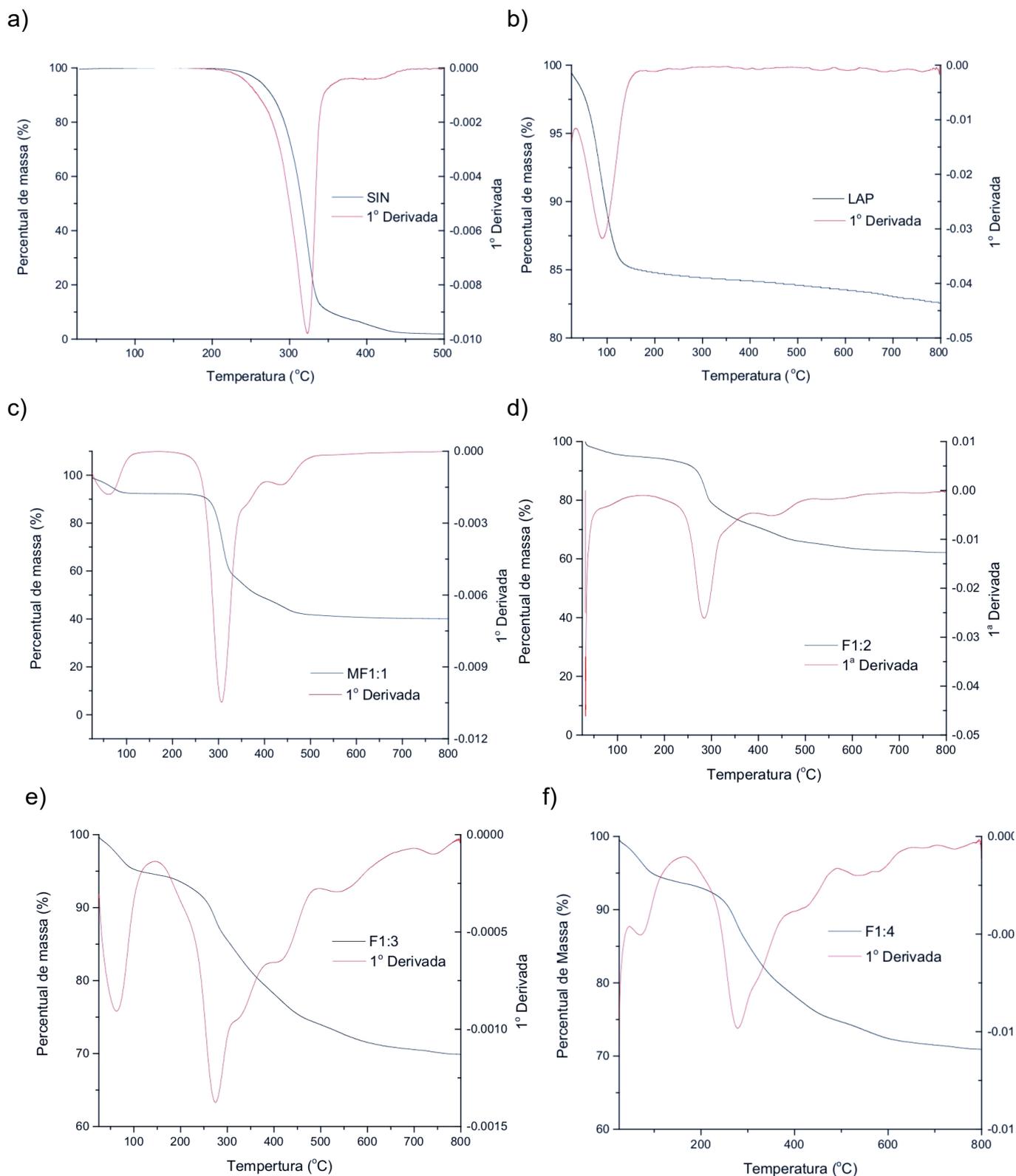
consequentemente uma redução no calor de fusão envolvido conforme a proporção do LAP aumenta na mistura. Por fim, em 276,21°C com ΔH de 8,43 J.g⁻¹, 265,44°C com ΔH de 35,95 J.g⁻¹ e 306,79°C com ΔH de 12,45 J.g⁻¹ devido ao evento exotérmico associado à degradação do IFA.

E por fim, a análises da mistura física de SIN:LAP na proporção 1:1 (m/m) teve o primeiro evento em 71,79°C com ΔH de 480,45 J.g⁻¹ devido liberação de moléculas de água; o segundo evento a 139,11°C com ΔH de 41,12 J.g⁻¹ referente a fusão da SIN; e o último evento ocorreu em 277,92°C com ΔH de 72,57 J.g⁻¹, indicando a degradação da SIN. Com a análise da Figura 11 constata-se que a rotaevaporação influencia no primeiro evento das análises, referente a liberação de moléculas de água, sendo evidenciado na análise da mistura física, no qual a proporção de LAP é menor, e ainda assim seu evento é mais intenso. Isso ocorre, pois, a solução preparada no item 4.2.2 fica submetido à uma temperatura de 60°C sob vácuo por aproximadamente 15 min, favorecendo a liberação das moléculas de água presentes na estrutura do LAP.

5.1.3 Análise termogravimétrica

A TG propicia uma análise quantitativa através do monitoramento da variação de massa da amostra em relação ao tempo ou a temperatura enquanto a mesma é programada (isotérmica ou rampa) sob uma atmosfera específica (inerte ou ar) (PEÑALVER *et al.*, 2020). A Figura 14 mostra as curvas referentes as TG: (a) SIN, (b) LAP, (c) MF 1:1 e das formulações (d) F1:2, (e) F1:3 e (f) F1:4, bem como suas respectivas primeiras derivadas.

Figura 14. Curvas referentes as análises termogravimétricas de: **(a)** SIN, **(b)** LAP, **(c)** MF1:1 e das formulações **(d)** F1:2, **(e)** F1:3 e **(f)** F1:4 e suas respectivas primeiras derivadas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A partir da derivada da TG apresentada na Figura 14 (A), observa-se que a SIN sofre um processo de decomposição à 323,40°C, no qual ocorre uma perda de massa de aproximadamente 99,9%, que corresponde a uma degradação total do esqueleto da estatina (LEDEȚI *et al.*, 2016).

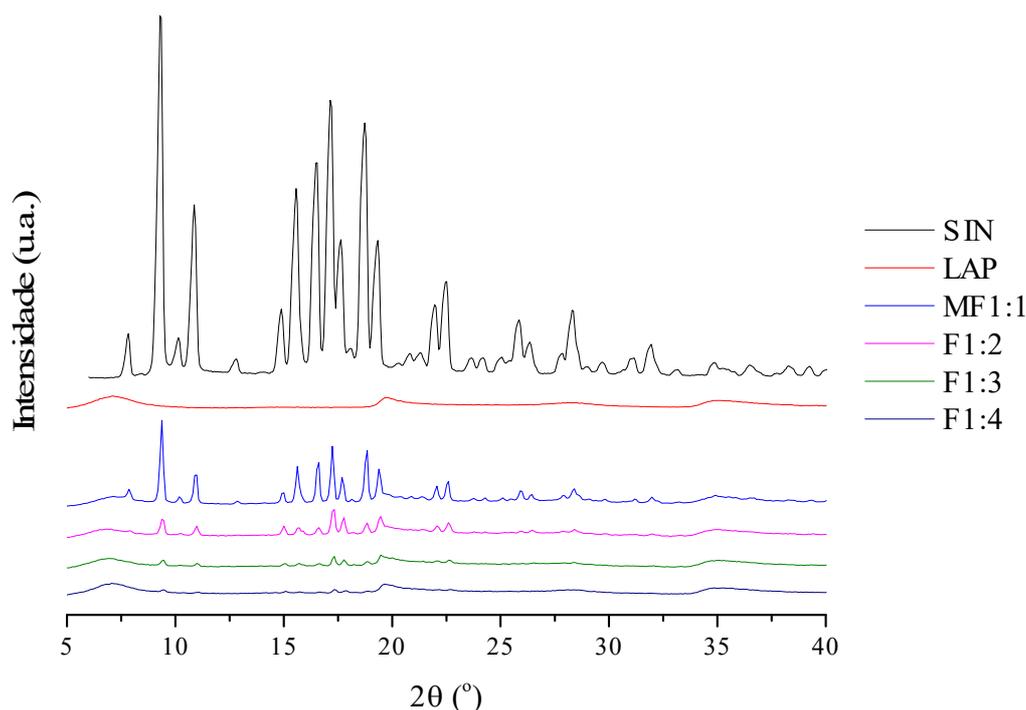
Na Figura 14 (B) obtém-se um evento único para LAP a 90,24°C referente a perda de moléculas de água adsorvidas na amostra, evidenciando que até 800°C, temperatura analisada, ocorre a perda de massa do LAP, porém de forma mais branda, ocorrendo uma perda percentual de 8,52459% em uma variação de mais de 700°C.

Na Figura 14 (C, D, E e F) verifica-se um evento antes de 90°C devido a perda de água presente no LAP referente à mistura física 1:1, formulação 1:2, 1:3 e 1:4, respectivamente. A presença do pico de degradação da sinvastatina ocorreu em 306,50°C, 284,30°C, 274,90°C e 279,20°C, respectivamente. Esses dois eventos ocorrem em temperaturas menores que as reportadas na imagem A e B que tratam dos constituintes isolados, pois trata-se de uma mistura, que ao contrário das substâncias puras, suas propriedades não são fixas, pois dependem da proporção dos componentes presentes. A desidroxilação das camadas estruturais da argila sintética tornam-se mais acentuadas em eventos à 435,00°C, 434,30°C, 528,70°C e 538,6°C respectivamente para MF1:1, F1:2, F1:3 e F1:4 (GHADIRI; CHRZANOWSKI; ROHANIZADEH, 2014).

5.1.4 Difração de raios-X de pó

A XRPD é uma técnica cristalográfica importante para a identificação direta de fases cristalinas em misturas complexas. Consiste no desvio da direção, em angulações específicas, como uma propriedade intrínseca de cada substância sob a incidência de raios X (COSTA, 2017; VANMEERT *et al.*, 2018). A Figura 15 mostra os difratogramas da SIN e do LAP isolados, da mistura física na proporção 1:1 SIN:LAP e dos pós obtidos no item 4.2.1 nas proporções F1:2, F1:3 e F1:4 SIN:LAP.

Figura 15. Difratogramas da SIN, do LAP, da MF1:1 e das formulações F1:2, F1:3 e F1:4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

O padrão de difração de pó de raios-X da SIN mostrado na Figura 15, detectou picos intensos em $9,29^\circ$ e $10,87^\circ$ e dupletos intensos em $17,45^\circ$ e $18,91^\circ$, característicos da estrutura organizada de natureza cristalina da SIN sem a presença de polimorfos. Os resultados estão de acordo com o reportado na literatura, reforçando o resultado obtido pelo DSC o qual apresenta apenas um evento endotérmico característico da fusão da SIN (FERREIRA, 2017; LU *et al.*, 2019).

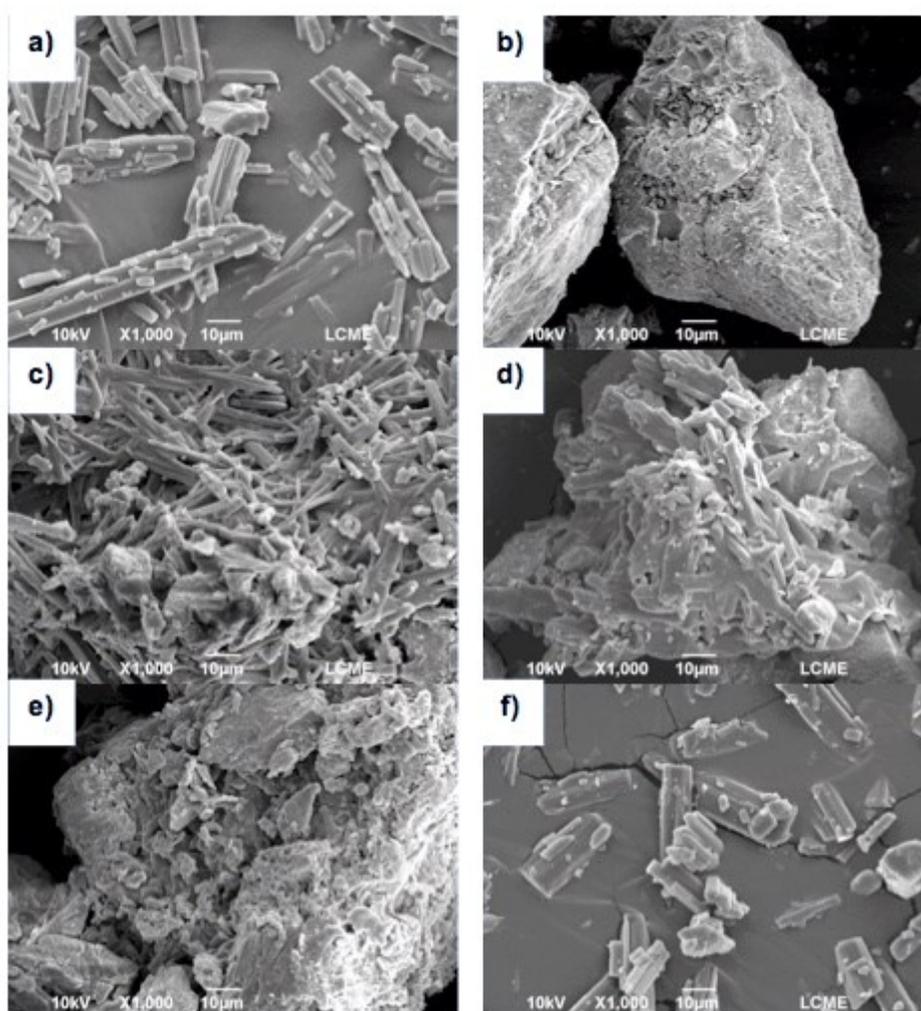
O LAP XL21 apresentou baixas intensidades de difração explicado pela sua orientação aleatória corroborando com o perfil obtido pelo DSC (ZHOU *et al.*, 2018). Os desvios de difração mais intensas foram em $7,05^\circ$, $19,83^\circ$ e $35,11^\circ$, indo de acordo com o relatado na literatura (HAMILTON *et al.*, 2019).

Nos difratogramas da F1:2, F1:3 e F1:4, pode-se observar o padrão de desvio observados para a SIN e o LAP isolados, reduzindo apenas a intensidade da SIN conforme diminui sua quantidade nas proporções analisadas enquanto aumenta a intensidade do LAP. Isto demonstra que a rotaevaporação do etanol não influenciou na forma cristalina da SIN.

5.1.5 Microscopia eletrônica de varredura

As técnicas microscópicas, tanto óptica quanto a eletrônica, possibilitam uma análise qualitativa e quantitativa dos sólidos através da observação da homogeneidade e determinação do tamanho e forma das partículas. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) quando acoplada a espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS), além de fornecer informações sobre a morfologia da amostra, pode trazer dados qualitativos de identificação dos elementos químicos presentes (BANDOPADHYAY *et al.*, 2018; RIBAS, 2015). A Figura 16 mostra as fotomicrografias referentes a análise por MEV da SIN e do LAP isolados, das formulações F1:2, F1:3, F1:4 e da mistura física MF1:1.

Figura 16. MEV da a) SIN, b) LAP, c) F1:2, d) F1:3, e) F1:4 e f) MF1:1.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Na Figura 16, imagem A é possível observar a morfologia em forma de agulha característica da SIN. Na imagem B, observa-se o agregado do LAP XL21 com algumas camadas em sua superfície. Padrões do agregado do LAP e dos cristais de SIN também são observados nas demais imagens (C, D, E e F). O EDS foi realizado para identificar a composição da superfície em cada mistura, e está apresentado na Tabela 8. Para tal, foram identificadas a presença de carbono, oxigênio, flúor, sódio magnésio e sílica.

Tabela 8. Análises de EDS para identificação de carbono, oxigênio, flúor, sódio magnésio e sílica.

	Átomos (%)					
	C	O	F	Na	Mg	Si
SIN	85,88 (±1,09)	5,91 (±1,63)	-----	-----	-----	-----
LAP	8,72 (±1,02)	45,04 (±1,61)	0,85 (±0,10)	1,50 (±0,21)	10,92 (±0,25)	24,78 (±1,78)
F1:2	52,56 (±33,22)	17,39 (±13,68)	-----	0,78 (±0,6)	4,83 (±5,25)	11,73 (±11,47)
F1:3	47,41 (±33,81)	26,26 (±16,04)	-----	1,18 (±0,51)	5,64 (±4,88)	12,35 (±10,86)
F1:4	24,67 (±20,53)	35,85 (±9,89)	0,54 (±0,05)	-----	8,01 (±3,86)	19,32 (±8,28)
MF1:1	82,43 (±5,01)	8,87 (±0,90)	-----	6,15	-----	-----

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Através da análise de EDS foi possível verificar a presença de apenas carbono e oxigênio na análise da SIN pura e a presença de flúor, sódio, magnésio e sílica além do carbono e oxigênio como os principais componentes do LAP XL21 isolado, conforme descrito na literatura (KIMURA; HARAGUCHI, 2017).

Além disso, sugere-se que em algumas misturas de SIN e LAP não foram observados o flúor, sódio, magnésio e/ou sílica, nas condições de

preparo de amostra utilizadas, evidenciando que as substituições do flúor ocorrem de forma aleatória e que a amostragem e a homogeneização das amostras são de extrema importância.

Todos os dados apresentados até este momento evidenciam a pureza dos materiais utilizados. Ainda apontam que a rotaevaporação e adição do álcool na solução contendo SIN e LAP não interferiu nas características físicas de composição e morfologia da superfície, ordenação cristalográfica e vibração dos átomos, apenas influenciando nos eventos de liberação da água presente na estrutura do LAP nas análises térmicas.

5.1.6 Doseamento

O doseamento consiste em um ensaio que tem como objetivo quantificar o teor de substância ativa podendo avaliar a qualidade das formulações desenvolvidas através do auxílio de diversas técnicas analíticas. O procedimento descrito na etapa 4.2.1 resultou em três massas sólidas de diferentes proporções de SIN e LAP com seus respectivos rendimentos apresentados na Tabela 9. Todas as soluções obtiveram um rendimento superior a 90%, sendo que a F1:3 obteve um rendimento acima de 100%, possivelmente por não ter secado o etanol por completo. Os resultados do doseamento da SIN (Tabela 8) indicam que todas as amostras apresentaram uma concentração (teor) na faixa preconizada na Farmacopeia Brasileira, que indica valores nas monografias geralmente entre 90-110% (ANVISA, 2019a).

Tabela 9. Soluções preparadas para secagem de solvente por rotaevaporação e seus respectivos rendimentos.

Formulação	Porcentagens (%)	Rendimento (%)	Doseamento (%)
F1:2	33,33 (SIN)	90,8581	94,71 ($\pm 2,55$)
	66,67 (LAP)		
F1:3	25,00 (SIN)	103,4679	96,42 ($\pm 4,58$)
	75,00 (LAP)		
F1:4	20,01 (SIN)	92,4564	102,51 ($\pm 8,34$)
	79,99 (LAP)		

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

5.2 ESTUDOS DE PRÉ FORMULAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS DE LAPONITE®

5.2.1 Estudos de viscosidade da pré-formulação e desenvolvimento dos géis de Laponite®

De forma qualitativa, foi feita a análise comparativa do gel preparado em água ultrapura (UP) e em uma solução hidroalcoólica contendo 80% água UP e 20% de etanol na concentração de 4% de LAP. Os géis formados a partir da solução hidroalcoólica solubilizam mais facilmente e possui uma coloração mais esbranquiçada e menos translúcida que as soluções preparadas com apenas água ultrapura. Com os testes qualitativos realizados, observou-se também que a formação do gel ocorre visualmente a partir das soluções preparadas com 2% de LAP em um curto intervalo de tempo.

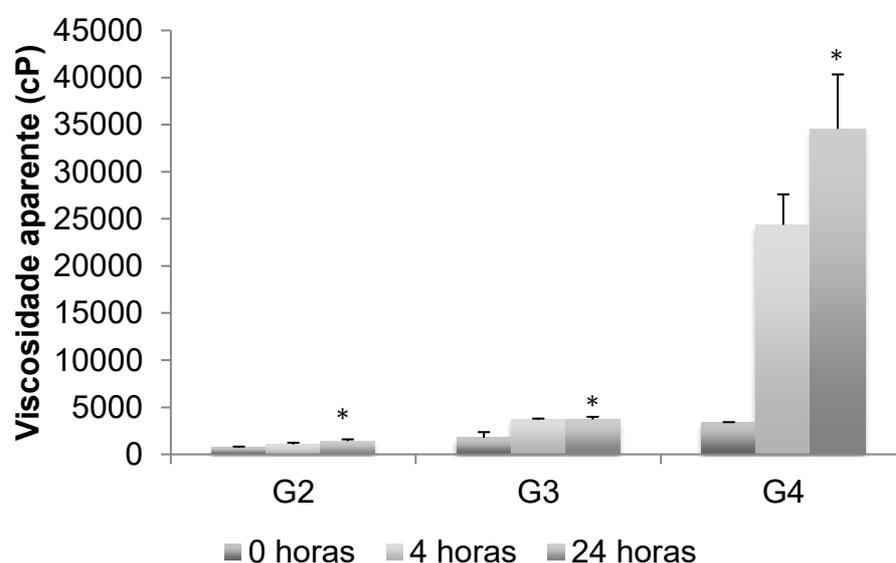
5.2.1.1 Avaliação da influência da concentração do Laponite® na viscosidade

A reologia é a ciência que estuda a resistência mecânica dos materiais quando submetidos à tensões ou deformações, sob diferentes condições termodinâmicas (COSTA, 2021). Compreender as propriedades reológicas é de grande importância pois podem fornecer alguns parâmetros capazes de auxiliar no entendimento da estrutura física ou química do material, fornece uma análise comparativa, modelar o comportamento dinâmico e o fluxo de materiais, analisar os fenômenos reológicos especiais como transição sólido-líquido, entre outros (SHAKEEL *et al.*, 2019)

A viscosidade é o parâmetro da reologia mais estudado no qual avalia a resistência de um material à deformação ou ao fluxo por meio da fricção ou do tempo de escoamento de uma solução sendo depende das características físico-químicas e da temperatura (LOPES *et al.*, 2019). O seu entendimento em formulações farmacêuticas é importante pois a velocidade de liberação do IFA e a concentração no local de ação estão relacionadas à viscosidade aparente, além disso, o conhecimento das propriedades de fluxo de um produto como um gel para aplicação tópica pode ser usado para prever a aceitabilidade dos consumidores (AULTON; TAYLOR, 2016).

A análise da viscosidade aparente pode fornecer caracterização estrutural de géis em termos da termodinâmica do processo de gelificação e da concentração crítica dos gelificadores e solventes. O processo gelificação para a formação de um gel dependem de fatores como as interações soluto-soluto e soluto-solvente (KAROYO; WILSON, 2017). Na intenção de averiguar o tempo de gelificação das pré-formulações de LAP, a viscosidade aparente a 25°C para G2, G3 e G4 nos tempos 0, 4 e 24 h foram analisados e se encontram descritas na Figura 17.

Figura 17. Viscosidade aparente à 25°C do G2, G3 e G4 após 0, 4 e 24 h de seu preparo.



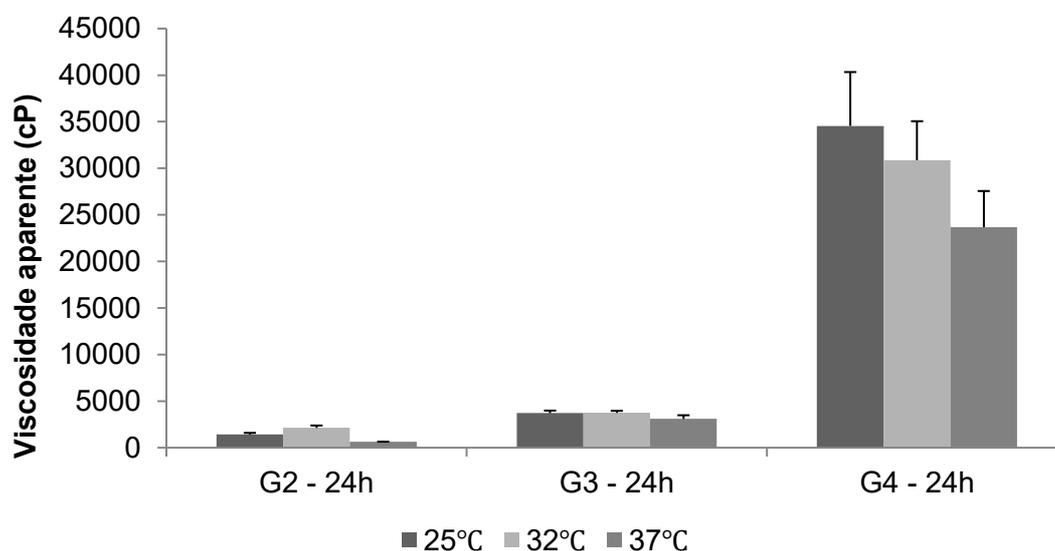
* a ANOVA demonstrou que estatisticamente a viscosidade aparente é diferente da viscosidade de 0h ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A viscosidade aparente do G3, por exemplo, foi de 1757 ± 605 , 3675 ± 124 e 3709 ± 275 cP para 0, 4 e 24h respectivamente. A análise estatística entre grupos demonstrou que o tempo de gelificação do LAP XL21 em solução hidroalcoólica, em 0 e 24h após seu preparo são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), comprovando que o tempo de gelificação influencia na viscosidade aparente do gel e deve ser levado em consideração. Enquanto a análise de 4 e 24h após o preparo dos géis demonstrou que estatisticamente são iguais ($p > 0,05$). No entanto, foi selecionando o tempo de 24 horas como tempo de gelificação necessário para atingir a estabilidade dos géis.

A análise da Figura 17 permite observar que a concentração de LAP influencia na viscosidade aparente da solução, sendo quanto maior a concentração, neste caso de 4%, maior a viscosidade conforme descrito na literatura (TOMÁS *et al.*, 2018).

A avaliação das mudanças nas viscosidades dos sistemas produzidos em função da temperatura, no qual foram selecionadas levando-se em conta a temperatura ambiente (25°C), a fisiológica da superfície da pele humana (32°C) (OH *et al.*, 2020) e do corpo (37°C). Os ensaios foram realizados e os resultados se encontram na Figura 18.

Figura 18. Viscosidade aparente do G2, G3 e G4 descritas no item 4.3.1.1 após 24 horas do seu preparo a 25, 32 e 37°C.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A viscosidade aparente após 24h do preparo para o G2 foi de 1417±175, 2132±250 e 630±14 cP para 25, 32 e 37°C respectivamente, para o G3, foi de 3709±275, 3744±217 e 3097±387 para 25, 32 e 37°C, respectivamente. Enquanto para o G4 foi de 34553±5778, 30873±4179 e 23675±3884 cP para 25, 32 e 37°C respectivamente. A análise estatística entre grupos demonstrou que a variação da temperatura a 25, 32 e 37°C para G2, G3 e G4 são estatisticamente iguais ($p > 0,05$) indo ao encontro com o que é reportado na literatura (BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS, 2014). Vale ressaltar que para cada análise foi utilizado uma alíquota nova da solução preparada, tendo em

vista que o LAP é um fluido com característica tixotrópica sensível ao cisalhamento.

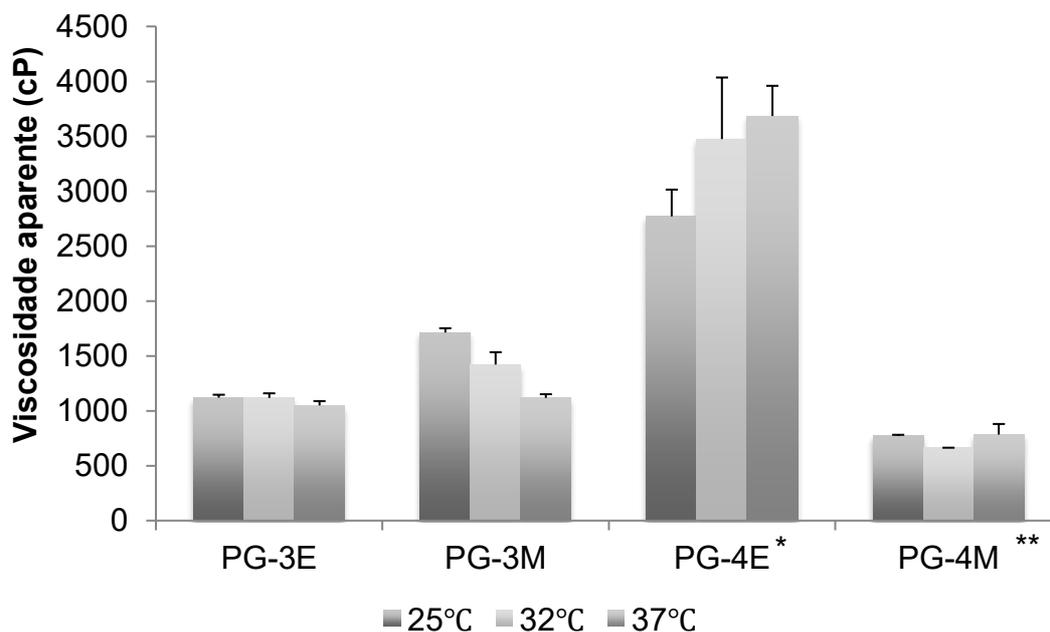
Nitidamente se observa uma discrepância entre a viscosidade aparente dos géis G2 e G3 para o G4, e isso devido a mudança do *spindle* LV3 para o LV4. Essa mudança foi necessária para obter dados confiáveis e reprodutíveis segundo as recomendações do fabricante do equipamento, uma vez que a solução de G2 é pouco viscosa enquanto a de G4 é muito viscosa.

Com os ensaios realizados anteriormente foi possível definir como 24 h o tempo necessário para o processo de gelificação finalizar e estabilizar. Além disso, como as viscosidades aparentes do G2 nas temperaturas analisadas demonstraram-se mais baixas comparadas as demais decidiu-se excluí-lo das próximas etapas deste estudo.

5.2.1.2 Avaliação da influência dos promotores de permeação na viscosidade

Quando se compara as propriedades físico-químicas ideais para a permeação na administração tópica (Tabela 2 do item 3.3.4) e as propriedades físico-químicas da SIN (Tabela 1 do item 3.1), observa-se que apesar da SIN possuir o peso molecular e o ponto de fusão dentro dos valores ideais, seu Log P é maior que o recomendado e sua solubilidade aquosa é muito menor que a recomendada, não conferindo uma boa permeação na pele humana. Com isso, o incremento de promotores químicos de permeação que atuam por mecanismos diferente ao da solução hidroalcoólica se torna interessante visando o aumento da permeação da SIN. Por esta razão, os ensaios de viscosidade dos pré-géis foram realizados a fim de avaliar as mudanças nas propriedades reológicas dos sistemas produzidos em função da concentração de LAP na presença de 5% dos promotores de permeação, MIR e do ESQ, sem a presença do IFA. Os resultados se encontram na Figura 19.

Figura 19. Viscosidade aparente dos pré-géis PG-3E, PG-3M, PG-4E e PG-4M após 24 horas do seu preparo a 25, 32 e 37°C.



* a ANOVA demonstrou que estatisticamente viscosidade aparente é diferente da viscosidade do PG-3E ($p < 0,05$); ** estatisticamente a viscosidade aparente é diferente do PG-3M ($p < 0,05$).
Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Através da Figura 19 constata-se que a presença dos promotores de permeação alterou a viscosidade aparente dos géis. A viscosidade aparente do PG-3E a 25°C foi de 1120 ± 26 cP, enquanto para o PG-4E na mesma temperatura foi de 2771 ± 243 cP, sendo 2,47 vezes maior, conforme esperado, já que a concentração de LAP é maior na solução. Com isso, entende-se que as insaturações presentes no ESQ não influenciam de forma negativa na formação do castelo de cartas do LAP. A análise estatística comprovou que os pré-géis de ESQ contendo 3 e 4% de LAP possuem viscosidades diferentes ($p < 0,05$). Portanto, para o ESQ definiu-se que a composição do gel para preparar uma formulação contendo SIN e LAP a 4%, o qual foi nomeado de FESQ.

Para o MIR, a viscosidade aparente foi de 1713 ± 38 cP e 773 ± 8 cP para o PG-3M e PG-4M respectivamente, reduzindo 2,21 vezes com o aumento de 1% de LAP. Acredita-se que o grupamento éster presentes no promotor influencia na formação do castelo de cartas do LAP. A análise estatística também comprovou que suas viscosidades são estatisticamente diferentes

($p < 0,05$). Portanto, para O MIR definiu-se a concentração do LAP a 3% para a formulação contendo SIN, nomeada de FMIR.

5.2.1.3 Análise da viscosidade dos Géis de Sinvastatina e Laponite®

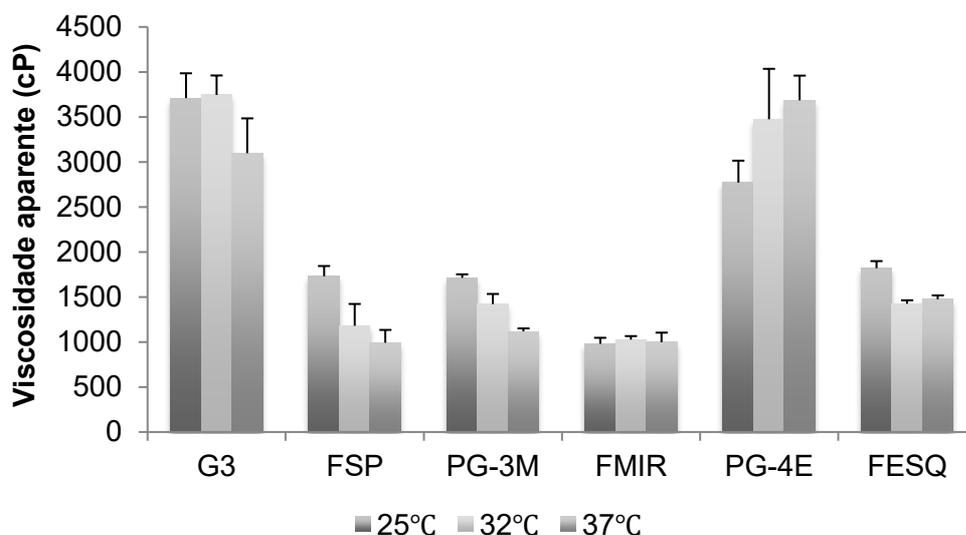
As formulações contendo SIN apresentaram uma coloração branca, conforme demonstrado na Figura 20, diferente das soluções contendo apenas a solução hidroalcoólica ou água. Para a formulação denominada FPS, sem ESQ ou o MIR, definiu-se a concentração de LAP de 3% para não precisar haver a troca de *spindle* nas análises dos géis propostos. Os resultados da viscosidade aparente da FSP, FMIR e FESQ se encontram na Figura 21, juntamente com os valores obtidos anteriormente do G3, PG-3M e PG-4E, sem a presença do IFA com intuito comparativo.

Figura 20. Gel FPS após 24h do seu preparo.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 21. Viscosidade aparente das formulações FMIR e FESQ a 25, 32 e 37°C em comparação com o G3, PG-3M e PG-4E.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A viscosidade das formulações a 25°C foram de 1731 ± 113 , 980 ± 67 e 1820 ± 79 cP para FSP, FMIR e FESQ, respectivamente. A presença de SIN reduz 2,14, 1,74 e 1,52 vezes a viscosidade aparente das formulações FSP, FMIR e FESQ quando comparados o seu pré-gel correspondente sem o IFA (G3, PG3M e PG-4E, respectivamente). Portanto a formulação final mais viscosa proposta foi a FESQ enquanto a menos viscosa foi a FMIR. Com as viscosidades dos géis e suas composições definidas foi feito a análise do teor de SIN presente, o qual foi descrito a seguir.

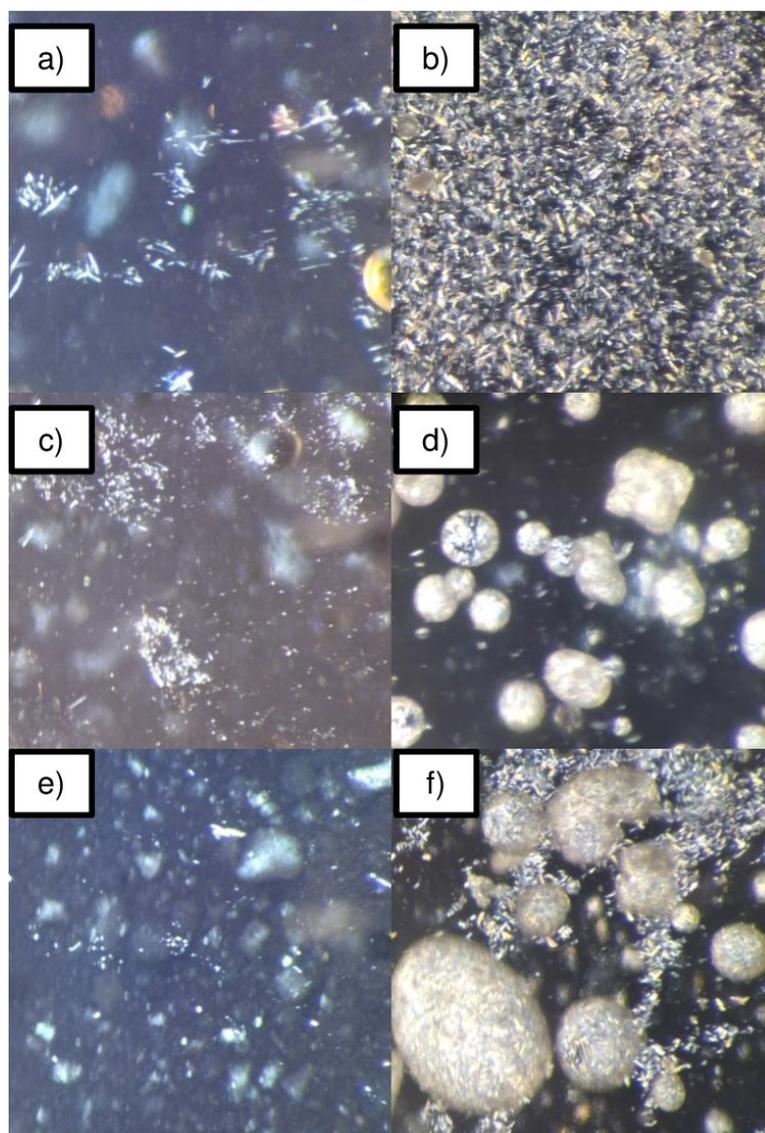
5.2.2 Doseamento das formulações

O doseamento das formulações foi realizado por CLAE com o objetivo de quantificar a SIN presente nos géis propostos. Os resultados obtidos foi de $95,64 \pm 12,58$, $99,85 \pm 25,40$ e $103,19 \pm 26,33\%$ para o FSP, FMIR e FESQ, respectivamente, estando de acordo com o preconizado na farmacopeia brasileira (90-110%) (ANVISA, 2019a). Os resultados foram expressos em função da porcentagem de fármaco presente na formulação em relação ao adicionado inicialmente, levando em consideração as diluições realizadas e a massa do gel pesado a cada replicata.

5.2.3 Estudo por Microscopia de Luz Polarizada

A MLP é um ensaio simples, barato e bem estabelecido para rápida visualização de domínios cristalinos qualitativamente nos materiais produzidos (POLOWSKY *et al.*, 2018). Este ensaio baseia-se na diferença de birrefringência dos domínios cristalinos sendo observadas pela presença ou ausência de partículas luminosas. Por definição, a birrefringência é diferença entre os índices de refração gerado pelas diferentes direções de propagação da luz (JUNIOR, 2020; PINTO, 2018). As imagens obtidas pela análise por MLP se encontram na Figura 22.

Figura 22. Imagens de microscopia na presença da luz polarizada com magnificação 3,0x para a) G3, b) FSP, c) PG-3M, d) FMIR, e) PG-4E e f) FESQ.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Na Figura 22 (imagem A) observa-se a birrefringência dos cristais proveniente da presença do LAP na solução hidroalcoólica. Isto confirma que, apesar do processo de síntese envolvendo a combinação de sais de sódio, magnésio e lítio com silicato de sódio a taxas e temperaturas controladas produzirem um precipitado amorfo, na sequência o LAP é submetido a cristalização parcial, justificando a presença de cristais observados na imagem (BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS, 2014). Os cristais de LAP também são observados na imagem C e E no qual não há a presença da SIN nas amostras analisadas.

Na imagem B, observa-se a birrefringência dos cristais de SIN dispersas em solução da FSP, enquanto na imagem D os cristais se encontram majoritariamente em vesículas formadas pelo MIR (TRUCILLO; CAMPARDELLI; REVERCHON, 2019) e na F parte dos cristais se encontram dispersos na FESQ e parte se encontram em vesículas geradas na presença do promotor utilizado.

Considerando as propriedades lipofílicas da SIN (Tabela 1 item 3.1), o IFA tende a se agregar mais facilmente com moléculas orgânicas em um meio hidrofílico. Quando os promotores de permeação são adicionados, a SIN se agrega junto destes aumentando o empacotamento das cadeias orgânicas, gerando sistemas com grandes aglomerados, que podem ser observados em formas de microdomínios hidrofóbicos conforme as imagens D e F, Figura 20.

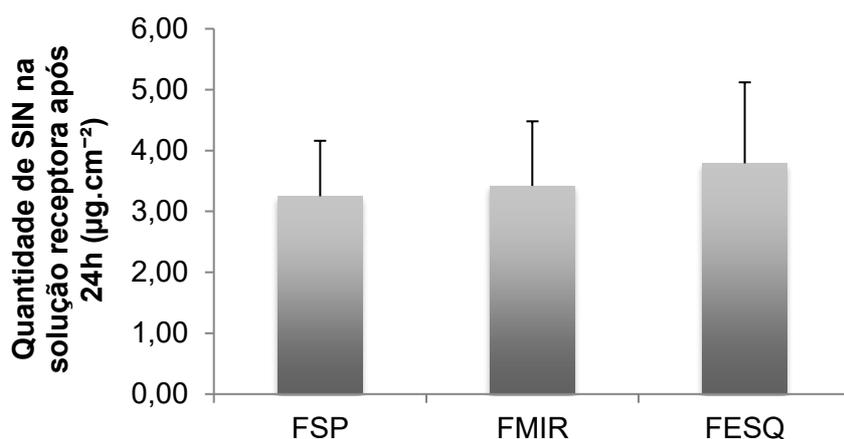
5.3 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO DA SIN VASTATINA *ex vivo* EM PELE HUMANA

Produtos tópicos destinados à ação local não se destinam a serem absorvidos. No entanto, a liberação do IFA a partir da formulação farmacêutica é um pré requisito para que ocorra a ação local (KANFER *et al.*, 2017). Para o transporte do IFA através da pele, os fármacos em geral devem ser liberados na superfície da pele. Com o fármaco sólido dissolvido na formulação, as moléculas mais próximas à superfície da pele penetram o tecido e estas devem ser repostas por outras moléculas que se difundirão pela formulação em direção à superfície da pele (AULTON; TAYLOR, 2016). O estudo de

permeação *ex vivo* foi realizado com o intuito preditivo do desempenho das formulações farmacêuticas em liberar a SIN simulando condições mais semelhantes ao que ocorreria *in vivo*.

A permeação da SIN na pele é regida por diversos fatores físico-químico, tais como seu peso molecular, seu tamanho de partícula, componentes presentes na formulação, entre outros. Na Figura 23 pode-se observar a quantidade de SIN permeada após 24 horas de experimento para cada formulação testada. Os dados apontam que ocorreu a permeação de menos de 0,01% de SIN para todas as formulações. A SIN demonstra ter uma alta interação com os constituintes lipídicos da pele, o que reduz sua taxa de difusão, dificultada também devida a sua alta massa molar, então de certa forma esse resultado já era esperado.

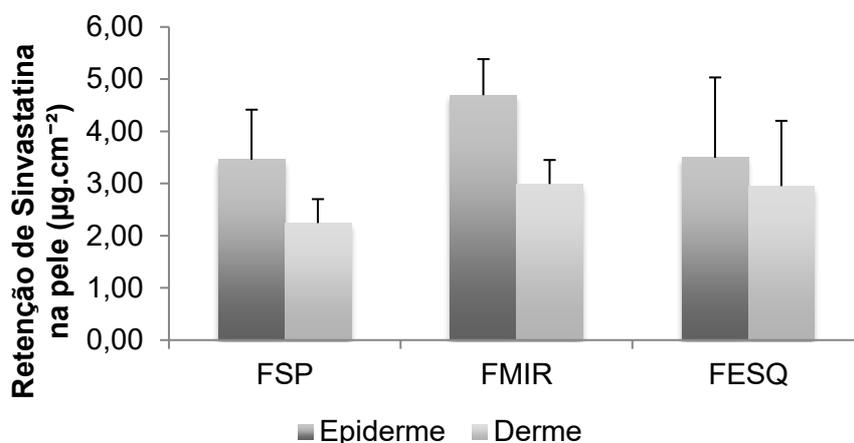
Figura 23. Quantidade de SIN permeada em 24 horas de ensaio *ex vivo* para a FSP, FMIR e FESQ e seus respectivos desvios padrões.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Para a solução receptora foi adotado o tampão PBS na faixa de pH fisiológico (7,4) na presença do etanol na proporção 70:30 no intuito de manter a condição *sink* para a SIN (PARHI; PADILAM, 2018). Ao avaliar-se o total permeado, a maior parte da SIN permaneceu retida na epiderme, como mostrado na Figura 24. A afinidade da SIN pela epiderme em relação a derme (Figura 22) pode ser atribuído ao caráter lipofílico da molécula ($\log P = 4,68$) (DRUGBANK, 2005). Esta alta interação com os constituintes lipídicos da pele reduz a taxa de difusão na pele.

Figura 24. Quantidade de SIN retida na derme e na epiderme para a FSP, FMIR e FESQ com seus respectivos desvios padrões.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A retenção da SIN na epiderme para FSP, FMIR e FESQ foi de $3,46 \pm 0,96$, $4,69 \pm 0,69$ e $3,49 \pm 1,54$ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivamente. Por se tratar de um ensaio biológico, conforme preconizado pelo guia nº 20, referente aos requisitos de qualidade para o registro de produtos tópicos e transdérmico, o emprego de tecido humano propicia certa variabilidade aos resultados (ANVISA, 2019b). Com objetivo de atingir resultados mais exatos, as análises foram realizadas com maior nível de repetição. Devido a isso, os desvios encontrados foram mais elevados, porém sem prejudicar a confiabilidade dos resultados. Visualmente, constata-se (Figura 24) que a FMIR permeou mais que o FSP e FSQ, porém, a ANOVA e análise entre grupos Tukey-HSD demonstraram que estatisticamente a presença dos promotores de permeação, ESQ e MIR, não influenciaram na permeação da SIN ($p > 0,05$).

Levando em consideração que as três formulações possuem água, etanol e o próprio LAP em comum atuando como promotores de permeação a presença do MIR e do ESQ não demonstrou o desempenho satisfatório na intensificação da retenção da SIN na epiderme e na derme. Sendo o FMIR com os valores médios maiores e os desvios menores obtendo o melhor desempenho na retenção da SIN na derme e na epiderme. A Tabela 10 apresenta os valores em porcentagem da SIN na solução receptora, na epiderme e derme em comparação a quantidade de SIN presente na solução doadora.

Tabela 10. Porcentagem de SIN presente na solução doadora no tempo zero e a permeada após 24 horas de ensaio, em relação a quantidade presente na solução doadora, para a FSP, FMIR e FESQ presentes na solução receptora, na epiderme e na derme e seus respectivos desvios padrões.

Doseamento	FSP (n=4)	FMIR (n=5)	FESQ (n=5)
Solução doadora t=0 (%)	98,70 ($\pm 0,69$)	99,85 ($\pm 25,40$)	103,19 ($\pm 26,33$)
Solução receptora (%)	0,0049 ($\pm 0,0014$)	0,0056 ($\pm 0,0039$)	0,0056 ($\pm 0,0021$)
Epiderme (%)	0,0152 ($\pm 0,0030$)	0,0233 ($\pm 0,0095$)	0,0120 ($\pm 0,0049$)
Derme (%)	0,0099 ($\pm 0,0012$)	0,0147 ($\pm 0,0047$)	0,0120 ($\pm 0,0071$)

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A inclusão do ESQ e do MIR no gel foi realizada na intenção de aprimorar a permeação da SIN na pele, já que ambos atuam por partição na estrutura lipídica no estrato córneo diferentemente da água e do etanol. (SOARES *et al.*, 2015).

No item 5.2.1, foi discutido que a viscosidade aparente das formulações farmacêuticas influenciam na velocidade de liberação do IFA e a concentração no local de ação (AULTON; TAYLOR, 2016). No item 5.2.1.3 foi evidenciado que a viscosidade da formulação FMIR é menor que a da FESQ e FSP, podendo ser esse o fator que está influenciando na maior liberação da SIN na FMIR, mesmo que em baixa intensidade.

Para um melhor entendimento, necessita-se de mais estudos a fim de compreender melhor como o LAP influencia na permeação do IFA na pele. A literatura disponível até o momento também não traz informações mais detalhadas sobre esta questão, principalmente por se tratar de um produto que, apesar de antigo, ainda foi pouco explorado na área farmacêutica.

A tabela 10 indica que a maior parte da SIN não atingiu a pele, permanecendo em sua maior parte na solução doadora, mas revela que, ao romper a barreira do estrato córneo, fica em sua maior parte concentrada na epiderme devido a sua alta interação com os constituintes lipídicos da pele. Como a intenção do gel proposto foi a de obter o efeito local, para a SIN poder atuar no tratamento tópico do melanoma, a maior concentração do fármaco na epiderme é desejada (PARCHEN *et al.*, 2020). Com isso, demonstra-se que o

gel proposto é promissor para o tratamento tópico do melanoma, assim que a barreira do estrato córneo é rompida.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A análise antimicrobiana é medida através da concentração inibitória mínima (CIM) que analisa a menor concentração de substância necessária para inibir o crescimento bacteriano (VAN DE VEL *et al.*, 2017). A atividade antibacteriana de substâncias pode ser avaliada por diferentes métodos, sendo os mais conhecidos: o método de difusão em ágar por poço, disco-difusão e métodos de microdiluição e microdiluição. Para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de uma substância, tanto os métodos de difusão em ágar ou em diluições em caldo são igualmente aceitáveis (BONA *et al.*, 2014).

No entanto, como a diluição do ágar é um método tedioso e demorado em relação a outros testes de sensibilidade, não é usado rotineiramente nos laboratórios de microbiologia. A microdiluição em caldo é a técnica base para a maioria dos testes de sensibilidade automatizados, portanto é o método mais utilizado na determinação da CIM (BALLESTERO-TÉLLEZ *et al.*, 2017). Além disso, o método da microdiluição utiliza pequena quantidade de amostra e de solventes, e ainda possibilita a realização de análises simultâneas em uma mesma placa.

Como descrito no item 3.5.1, estudos disponíveis na literatura apontam a SIN como um ativo em potencial no tratamento de diversos distúrbios patológicos. Outra aplicação da SIN *off label* que se torna interessante no tratamento do melanoma é a cicatrização de feridas e a ação antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, uma bactéria que frequentemente causa infecção em humanos (SURINI *et al.*, 2018).

Foi reportado na literatura que as ligações 2:1 entre as folhas tetraédricas de duas camadas são mais fracas, como ocorre com o LAP. Isso ocasiona, para as argilas neutras, um espaço desocupado entre as camadas ou ocupado por cátions contrabalanceados. Propriedades como essas são adequadas para aplicações onde o excesso de líquido precisa ser removido, incluindo em feridas auxiliando na cicatrização (GASKELL; HAMILTON, 2014). Devido a isso, foi feita a avaliação da atividade antibacteriana dos constituintes dessa formulação proposta isoladamente em bactéria gram-positiva e gram-

negativa, uma vez que esta ação é desejada em feridas de melanoma por auxiliar no processo de cicatrização como tratamento auxiliar.

Estudos realizados por Hamilton e colaboradores demonstraram que o LAP XL21 não apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis* (gram-positiva), *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa) e *Cutibacterium acnes* (gram-positiva). Uma das justificativa levantada pelos autores é devido aos cátions presentes na camada interna do LAP serem predominantemente Na^+ , que não tem atividade antibacteriana inerente ao contrário de outros cátions metálicos, como prata, cobre e zinco (HAMILTON *et al.*, 2019). Como não foi encontrado nenhum trabalho associando o LAP XL21 na avaliação da atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, decidiu testar sua ação de forma isolada para estas bactérias e na presença da SIN.

Para a SIN um estudo recente realizado por Akbarzadeh e colaboradores avaliando-se as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por microdiluição em caldo apresentou uma CIM de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (AKBARZADEH *et al.*, 2021) exatamente o mesmo valor encontrado nos ensaios realizados nesse projeto. Os resultados para a cepa *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* encontram-se na Tabela 11 e 12, respectivamente. Para a bactéria gram-positiva, o LAP e a MF 1:1 não inibiram o crescimento em nenhuma das concentrações testadas.

Tabela 11. Resultado do estudo microbiológico da SIN, LAP, MF 1:1, MIR e ESQ para a bactéria *Staphylococcus aureus*. Incolor = sem crescimento microbiológico, rosa = com crescimento microbiológico.

Bactéria gram-positiva: <i>Staphylococcus aureus</i>					
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	SIN (n=2)	LAP (n=2)	MF 1:1 (n=2)	MIR (n=2)	ESQ (n=2)
250,00	Incolor	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
125,00	Incolor	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
62,50	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
31,25	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
15,62	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
7,81	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
3,90	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Tabela 12. Resultado do estudo microbiológico da SIN, LAP, MF 1:1, MIR e ESQ para a bactéria *Escherichia coli*. Incolor = sem crescimento microbiológico, rosa = com crescimento microbiológico.

Bactéria gram-negativa: <i>Escherichia coli</i>					
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	SIN (n=2)	LAP (n=2)	MF 1:1 (n=2)	MIR (n=2)	ESQ (n=2)
250,00	Rosa	Rosa	Rosa	Incolor	Incolor
125,00	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
62,50	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
31,25	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
15,62	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
7,81	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
3,90	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Para a cepa gram-positiva (Tabela 11), apenas a SIN isolada apresentou uma CIM de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ enquanto o LAP, ESQ, MIR e a MF1:1 não demonstraram uma CIM para concentrações analisadas. Enquanto, para a bactéria gram-negativa (Tabela 12), o LAP, a SIN e a MF1:1 não apresentaram inibição no crescimento nas concentrações testadas, entretanto o ESQ e o MIR obtiveram uma CIM de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os controles realizados na presença dos microrganismos no caldo, na solução salina e na solução salina na presença de DMSO demonstram crescimento como esperado. Isto comprova que as soluções testadas não inibem o crescimento da bactéria. Nos controles realizados com as amostras não foram observados o crescimento de micro-organismos, comprovando que as soluções utilizadas e as amostras estavam estéreis.

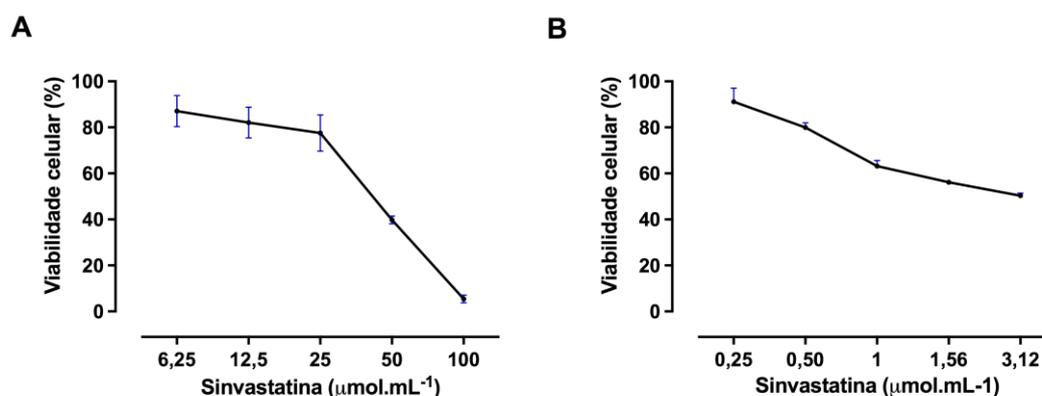
5.5 AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA SIN

Conforme demonstrado no item 3.1.2, a SIN foi reportada na literatura com potencial ação no tratamento de melanoma via inibição de seu crescimento. A fim de confirmar essa ação, a avaliação *in vitro* da atividade citotóxica da SIN foi realizado em parceria com o Grupo de Estudos de

Interações entre Micro e Macromoléculas (GEIMM) na UFSC, e observou que a SIN, possui ação citotóxica inibindo o crescimento do melanoma murino (B16-F10) confirmando seu potencial uso no tratamento de melanoma conforme reportado na literatura.

O ensaio de citotoxicidade da SIN nas células B16-F10 por 24 e 48h se encontram na Figura 25. As células foram incubadas com concentrações crescentes de SIN e a viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio com resazurina. Os resultados expressam a média \pm erro padrão da média (EPM) de dois ensaios independentes realizados em triplicata.

Figura 25. Efeito citotóxico da sinvastatina na linhagem B16-F10 após 24 (A) e 48 h (B) de tratamento.



Fonte: Elaborado por Adny Henrique Silva do GEIMM – Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas da UFSC, 2017.

De acordo com a Figura 25, a CC_{50} da sinvastatina para linhagem B16F10 foi de 44,13 e 3,13 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em 24 e 48 h de tratamento, respectivamente. Com os valores obtidos compreende-se que o tratamento de 48 horas é mais eficaz por apresentar um CC_{50} menor. Este resultado evidencia a eficácia da SIN em inibir o crescimento das células de melanoma, indo ao encontro com o reportado na literatura.

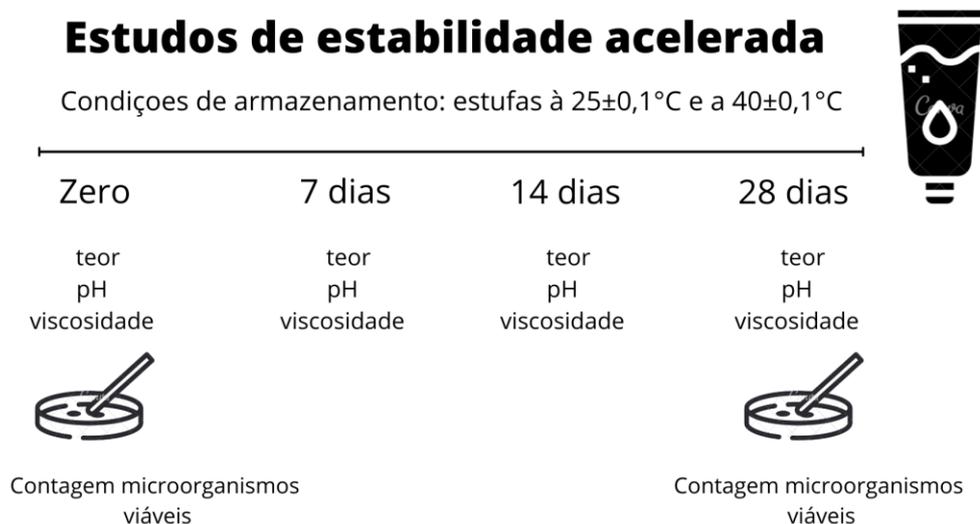
5.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA DO GEL DE LAPONITE[®], SINVASTATINA E MIRISTATO DE ISOPROPILA

O teste de estabilidade de produtos farmacêuticos é um procedimento complexo realizado para avaliar a qualidade, segurança e eficácia das formulações (GAYATRI *et al.*, 2019). Este ensaio verifica a capacidade do IFA

em um determinado sistema de embalagem em permanecer dentro das especificações estabelecidas para manter a qualidade e manter o desempenho desejado durante o período analisado (NARAYAN; MANUPRIYA, 2017).

Segundo a ANVISA, agência reguladora brasileira, através da resolução RDC Nº 318, de 6 de novembro de 2019, os estudos de estabilidade acelerado são análise projetada para averiguar as possíveis alterações físicas, químicas e microbiológicas de IFA ou formulações, em condições forçadas de armazenamento (ANVISA, 2019c). Esse estudo foi realizado em período de 28 dias, a 25 e a 40°C, sendo avaliada nos tempos zero, 7, 14 e 28 dias, conforme Figura 26.

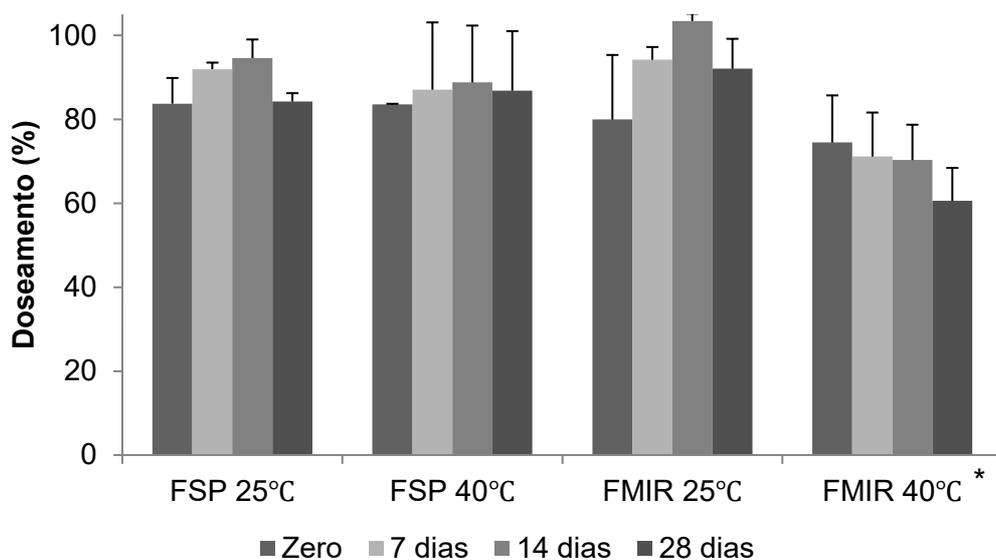
Figura 26. Esquema exemplificando os estudos de estabilidade acelerada realizada com a FMIR e FSP.



Fonte: Elaborado por Hellen Stulzer, 2021.

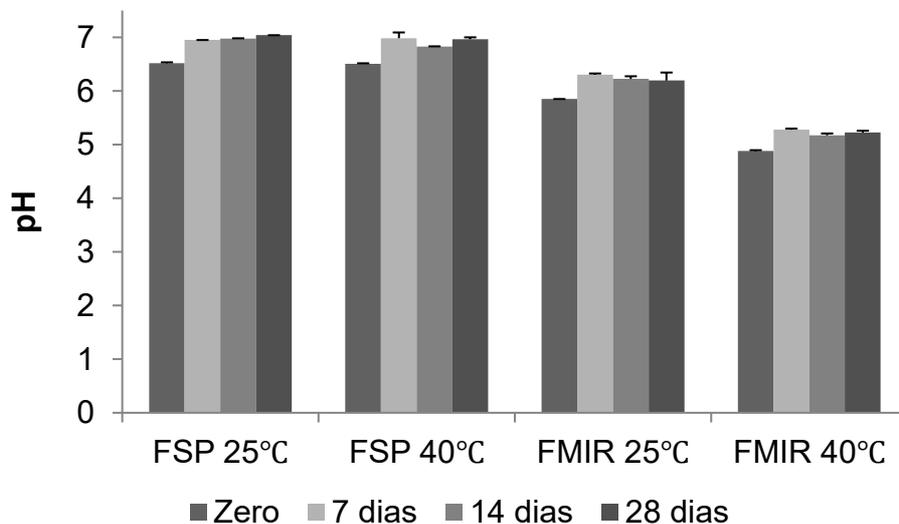
Devido a questão de tempo, optou-se em fazer um estudo reduzido de 4 semanas, como realizado por Gayatri e colaboradores (GAYATRI *et al.*, 2019). Além disso, salienta-se que a FESQ não foi testada devido ao resultado insatisfatório apresentado anteriormente no ensaio de permeação descrito no item 5.3. Portanto, testou-se a FSP juntamente com a FMIR a fim de comparar o impacto do MIR na estabilidade do gel e o resultado do teor, pH e da viscosidade aparente se encontram nas Figuras 27, 28 e 29, respectivamente.

Figura 27. Teor da SIN na FSP e FMIR durante 28 dias no estudo de estabilidade acelerada.



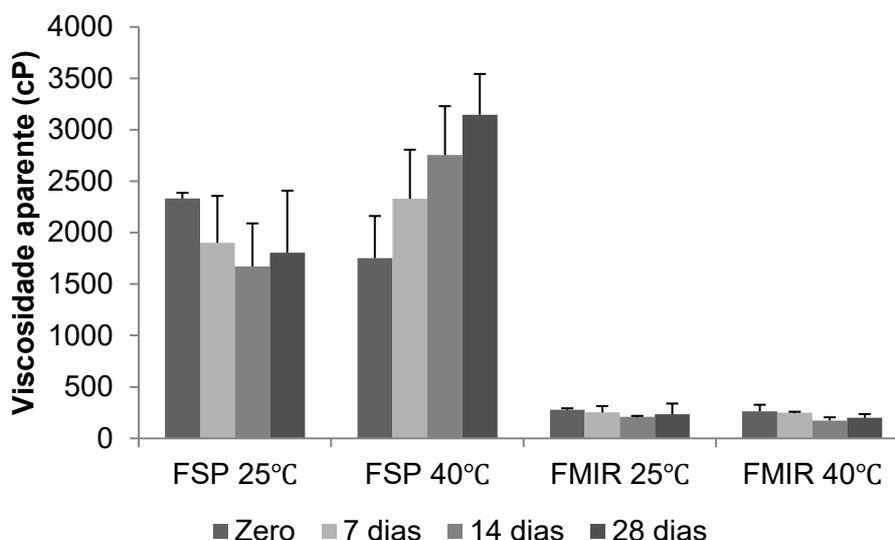
* estatisticamente, os valores do doseamento são diferentes da sua formulação à 25°C ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 28. Acompanhamento do pH para a FSP e a FMIR durante 28 dias no estudo de estabilidade acelerada.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 29. Viscosidade aparente da FSP e da FMIR durante 28 dias no estudo de estabilidade acelerada.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Em relação aos ensaios físico-químico do teor da SIN realizado (Figura 27), no dia zero, foi de $83,74\% \pm 6,11$ e $83,57\% \pm 0,12$ para FSP a 25°C e 40°. Já para a FMIR a 25°C e 40°C os valores calculados a partir dos dados experimentais foram $79,94\% \pm 15,39$, $74,47\% \pm 4,88$, respectivamente. Através da análise gráfica, observa-se que a temperatura de armazenamento influencia no teor de SIN mais intensamente na FMIR do que na FSP. Esse fato pode estar relacionado a degradação da SIN na presença do MIR, que devido a uma temperatura mais elevada, foi acelerada comparado com a FMIR à 25°C.

As formulações foram preparadas 24 h antes do envase e tiveram seu pH ajustado ao valor de $5,00 \pm 0,50$ (pH para aplicação tópica). Pode-se observar que no dia 0, após 24h do preparo, o pH das formulações aumentou durante o processo de gelificação para $6,52 \pm 0,01$, $6,51 \pm 0,01$, $5,85 \pm 0,01$ e $4,88 \pm 0,01$ para FSP e FMIR a 25 e 40°C, respectivamente. O pH médio obtido no dia 28, considerando os valores obtidos para as replicatas à 25°C e a 40°C, para a FSP foi de $7,00 \pm 0,05$ e da formulação FMIR de $6,25 \pm 0,11$. Com isso, conclui-se que os valores de pH aumentaram, sendo que a FMIR teve uma variação menos acentuada quando comparado a FSP. Essa variação pode ter sido ocasionada devido ao LAP que em solução possui um pH elevado ($\text{pH} > 9$). Visualmente observa-se que a partir do dia 7 o pH dos meios são estabilizados

(Figura 28), mesmo que estatisticamente os valores não possuem diferença quantitativa ($p>0,05$).

A viscosidade aparente (Figura 29), no dia zero, foi de 2331 ± 56 , 1753 ± 409 cP para FSP a 25°C e 40°C , respectivamente. Para a FMIR os valores nas mesmas temperaturas foram 278 ± 14 e 264 ± 63 cP, respectivamente. Quando comparados os valores para a FSP a 25°C descritos no item 5.2.1.3, a FSP que foi armazenada a 25°C teve sua viscosidade aumentada em 1,35 vezes nas primeiras 24h, enquanto a amostra em 40°C permaneceu com valores próximos aos descritos no item 5.2.1.3. Para FMIR observou-se uma redução de 3,52 e 3,71 vezes para as amostras armazenadas a 25°C e 40°C , respectivamente. Como trata-se da produção de novos lotes dos géis uma pequena variação dos valores analisados já eram esperados, porém, como a variação foi alta, um estudo mais aprofundado dos fatores que possam estar influenciando a formação do gel teria que ser realizado, uma vez que foram mantidas as condições experimentais.

Para cada amostra a cada temperatura nos dias zero, 7, 14 e 28 foram analisados através da ANOVA os resultados apresentados para o doseamento (Figura 27), pH (Figura 28) e viscosidade aparente (Figura 29) comprovando que estatisticamente os valores obtidos são iguais ($p>0,05$). Portanto não há diferença estatística entre os dias nos resultados para cada grupo analisado.

Foi aplicado também a análise entre grupos para cada amostra, a cada ensaio, comparando o armazenamento na temperatura de 25°C e 40°C , comprovando que o doseamento apenas da FSP, o pH e a viscosidade de ambas as amostras avaliadas são estatisticamente iguais para as temperaturas analisadas ($p>0,05$). Enquanto o doseamento da FMIR nas temperaturas à 25°C são estatisticamente diferentes ao de 40°C ($p<0,05$) comprovando o que foi observado na Figura 27.

Os testes microbiológicos de contagem do número total de microorganismos mesofílicos em placa, tanto para a FSP quanto para FMIR, não apresentaram crescimento de bactérias e fungos nos dias testados em nenhuma das replicatas realizadas. Assim, demonstra-se que mesmo sem o uso de conservantes, durante o tempo analisado não houve crescimento

bacteriano ou fúngico, fato este que é relevante, visando um futuro uso do gel no tratamento do melanoma.

Apesar do estudo em tempo reduzido, foi possível indicar que a formulação FSP é mais estável, em relação aos parâmetros analisados, da FMIR. Ainda, a produção do gel FSP é mais simples e barata devido a menor quantidade de matéria prima necessária, trazendo vantagens econômicas para a indústria farmacêutica, uma vez que a ANOVA demonstrou que estatisticamente tanto a FSP quanto a FMIR desempenharam a mesma capacidade de permeação em pele humana.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, o desenvolvimento de duas formulações, denominadas FSP e FMIR, para auxiliar no tratamento de melanoma foram desenvolvidas e caracterizadas com sucesso. A análise do teor de SIN demonstrou valores médios acima de 95%, estando de acordo com os valores previstos na Farmacopeia Brasileira em inúmeras monografias de medicamentos. Os ensaios preliminares da citotoxicidade da SIN em células de melanoma murino foram promissores, apresentando uma CC_{50} de 44,13 e 3,13 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em 24 e 48 h de tratamento, afirmando o efeito da SIN relatado na literatura.

Além disso, os promotores de permeação ESQ e MIR não influenciaram estatisticamente a permeação *ex vivo* da SIN ($p>0,05$). Enquanto os ensaios de estabilidade acelerada, mesmo que realizado em 28 dias, demonstraram que a formulação FSP permaneceu estável em condição de armazenamento de 40°C, diferentemente da FMIR, no qual o teor de SIN reduziu, sugerindo a degradação do IFA na formulação.

Esses resultados demonstraram que a formulação FSP é promissora para atuar no tratamento auxiliar do melanoma, uma vez que este estudo indicou que o IFA dispõe de atividade citotóxica, podendo inibir o crescimento das células tumorais, e de atividade microbiana contra *S. aureus*, inibindo o crescimento bacteriano nas feridas tratadas, auxiliando no processo de cicatrização. Além disso, o LAP, utilizado como modificador reológico, ainda é pouco explorado pela indústria farmacêutica e cosmética.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante os experimentos realizados com o LAP, foi observado que a quantidade do gel preparado, seja de 50mL ou 300mL, influência nas propriedades mecânicas do gel. Portanto, gostaria de realizar uma otimização mais aprofundada na forma de preparo dos géis, com controle da temperatura ambiente e de armazenamento, já que esta etapa demonstrou influenciar diretamente na reprodutibilidade dos resultados de caracterização dos mesmos. Além disso, os microdomínios observadas por MLP na FMIR não eram esperados e chamaram atenção para futuras investigações na influência da liberação do IFA através da pele.

Ademais, deseja-se concluir os estudos em células de melanoma com LAP XL21 isolado e em mistura com SIN e futuramente aplicar o gel *in vivo*, através do uso de modelo animal, para se ter uma avaliação mais precisa do seu comportamento e eficácia.

8 REFERÊNCIAS

- ABDELBARY, Ghada; AMIN, Maha; SALAH, Salwa. Self nano-emulsifying simvastatin based tablets: Design and in vitro/in vivo evaluation. **Pharmaceutical Development and Technology**, vol. 18, no. 6, p. 1294–1304, 2013. <https://doi.org/10.3109/10837450.2012.672989>.
- AKBARZADEH, Iman; KERAMATI, Maliheh; AZADI, Amir; AFZALI, Elham; SHAHBAZI, Rasoul; CHIANI, Mohsen; NOROUZIAN, Dariush; BAKHSHANDEH, Haleh. Optimization, physicochemical characterization, and antimicrobial activity of a novel simvastatin nano-niosomal gel against E. coli and S. aureus. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 234, no. October 2020, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.105019>.
- ALLEN JR., L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. [S. l.: s. n.], 2009. vol. 9th ed., . <https://doi.org/10.1002/jps.2600791127>.
- ALUPEI, Marius Costel; LICARETE, Emilia; PATRAS, Laura; BANCIU, Manuela. Liposomal simvastatin inhibits tumor growth via targeting tumor-associated macrophages-mediated oxidative stress. **Cancer Letters**, vol. 356, no. 2, p. 946–952, 2015. DOI 10.1016/j.canlet.2014.11.010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.010>.
- ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 6a Edição. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, vol. 1, p. 904, 2019a. .
- ANVISA. **Guia n 20 sobre requisitos de qualidade para o registro de produtos tópicos e transdérmicos**. [S. l.: s. n.], 2019b. vol. versão 1, .
- ANVISA. Nota Técnica 02/2017. , p. 1–10, 2017a. .
- ANVISA. RESOLUÇÃO RDC No 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. **Diário Oficial da União**, vol. 1, p. 87, 2017b. <https://doi.org/1677-7042>.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - RDC N° 318, DE 6 DE NOVEMBRO DE 2019. Brasil, , p. 17, 2019c. .
- ANZILAGGO, Daiane. **Sistemas Liquissólidos Como Uma Abordagem Tecnológica Para Melhorar O Perfil De Dissolução Da Simvastatina**. 2017. 2017.
- ARONSON, Jeffrey K.; FERNER, Robin E. Unlicensed and off-label uses of medicines: definitions and clarification of terminology. **British Journal of**

Clinical Pharmacology, vol. 83, no. 12, p. 2615–2625, 2017. <https://doi.org/10.1111/bcp.13394>.

ASHARA, Kalpesh; SONIWALA, Moinuddin; SHAH, Ketan. Review Article Emulgel : A novel drug delivery system. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, vol. 26 (3), no. October, p. 244-249., 2016. .

AULTON, Michael E.; TAYLOR, Kevin M. G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4 edição. [S. l.]: Elsevier Ltda, 2016.

BAGHERI, Hossein; GHASEMI, Faezeh; BARRETO, George E.; SATHYAPALAN, Thozhukat; JAMIALAHMADI, Tannaz; SAHEBKAR, Amirhossein. The effects of statins on microglial cells to protect against neurodegenerative disorders: A mechanistic review. **BioFactors**, vol. 46, no. 3, p. 309–325, 2020. <https://doi.org/10.1002/biof.1597>.

BALLESTERO-TÉLLEZ, M.; DOCOBO-PÉREZ, F.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; CONEJO, M. C.; RAMOS-GUELFO, M. S.; BLÁZQUEZ, J.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; PASCUAL, A. Role of inoculum and mutant frequency on fosfomicin MIC discrepancies by agar dilution and broth microdilution methods in Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 23, no. 5, p. 325–331, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.12.022>.

BANDOPADHYAY, Shantanu; BANDYOPADHYAY, Nabamita; DEB, Pran Kishore; SINGH, Chhater; TEKADE, Rakesh K. **Preformulation Studies of Drug Substances, Protein, and Peptides: Role in Drug Discovery and Pharmaceutical Product Development. Role in Drug Discovery and Pharmaceutical Product Development**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. DOI 10.1016/B978-0-12-814423-7.00012-5. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814423-7.00012-5>.

BARONE, Antonella; MENDES, Maria; CABRAL, Célia; MARE, Rosario; PAOLINO, Donatella; VITORINO, Carla. Hybrid Nanostructured Films for Topical Administration of Simvastatin as Coadjuvant Treatment of Melanoma. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 108, no. 10, p. 3396–3407, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.06.002>.

BEGUM, S. Gousia; CHETTY, C Madhusudan; PAVITHRA, B; AKHILA, B.; GAYATHRI, C.; RUKSAR, S.; SRAVANI, T.; VOLETI, Vijay Kumar. A Review on Emulgels - A Novel Approach for Topical Drug Delivery. **Asian Journal of**

Pharmaceutical Research and Development, vol. 7, no. 2, p. 70–77, 2019. <https://doi.org/10.22270/ajprd.v7i2.477>.

BHUIYAN, Mirza Mzu; MAKHUBELE, Hundzukani Dost. Primary Malignant Melanoma of the Breast: Mankweng Breast Oncology Experience. **Journal of Medical Research and Health Sciences**, vol. 3, no. 3, p. 900–902, 2020. <https://doi.org/10.15520/jmrhs.v3i3.185>.

BONA, Eliana Almeida Mira De; PINTO, Fabiana Gisele da Silva; FRUET, Thomas Kehrwald; JORGE, Tereza Cristina Marinho; MOURA, Alexandre Carvalho de. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, vol. 81, no. 3, p. 218–225, 2014. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001192012>.

BRASIL. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003.** [S. l.: s. n.], 2003.

BRASIL. Vocabulário Controlado de Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Embalagens de Medicamentos, 1ª Edição / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Brasília: Anvisa.** [S. l.: s. n.], 2011. p. 56.

BULAVIN, Leonid A. **Modern Problems of the Physics of Liquid Systems.** [S. l.: s. n.], 2018.

BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS. Laponite: performance additives. **LAPONITE Performance Additives**, , p. 22, 2014. Available at: https://www.byk.com/.../BYK_B-RI21_LAPONITE_EN.pdf.

CHAM, B. E. First in Man Topical Treatment of Melanoma with Solasodine Glycosides in a Formulation Curaderm: A Case Report. **Journal of Cancer Therapy**, vol. 11, no. 10, p. 617–630, 2020. <https://doi.org/10.4236/jct.2020.1110052>.

CHOUDHURY, Hira; GORAIN, Bapi; PANDEY, Manisha; CHATTERJEE, Lipika Alok; SENGUPTA, Pinaki; DAS, Arindam; MOLUGULU, Nagashekhara; KESHARWANI, Prashant. Recent Update on Nanoemulgel as Topical Drug Delivery System. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 106, no. 7, p. 1736–1751, 2017. DOI 10.1016/j.xphs.2017.03.042. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.042>.

CONVENTION, United States Pharmacopeial. **The United States**

Pharmacopeial. 42nd ed. [S. l.: s. n.], 2019.

COSMETIC INNOVATION. Ingrediente revigorado: Esqualano de alta qualidade, renovável, proveniente de cana de açúcar sustentável. 2018. **cosmetic innovation**. .

COSTA, Camila Moreira. **Análise e aperfeiçoamento de viscosímetro rotacional de campo através da reologia de fluidos de perfuração**. 2021. 224 f. PUC-Rio, 2021.

COSTA, EDNELSON DA SILVA. **Avaliação De Tensões Residuais Em Soldas Gmaw E Gmaw-Cw Por Birrefringência Acústica E Difração De Raio X**. 2017. 234 f. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ AVALIAÇÃO, 2017.

DAS, Sabya S.; NEELAM; HUSSAIN, Kashif; SINGH, Sima; HUSSAIN, Afzal; FARUK, Abdul; TEBYETEKERWA, Mike. Laponite-based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, vol. 25, no. 4, p. 424–443, Jun. 2019. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190402165845>.

DE MOURA, Elisana Afonso; TERTO, Márcio Vinícius Cahino; MENDONÇA, Elisângela Afonso de Moura; PROCÓPIO, José Valdilânio Virgulino; COSTA, Vicente Carlos de O.; FILHO, José Maria Barbosa; GUTIERREZ, Stanley Juan Chavez; TAVARES, Josean Fechine; MACEDO, Rui Oliveira; SILVA, Marcelo Sobral da. Solid-State form Characterization of Riparin I. **Molecules**, vol. 22, no. 1615, p. 13, 2017. .

DE OLIVEIRA, Marcelo A.; YOSHIDA, Maria I.; GOMES, Elionai C. L.; MUSSEL, Wagner N.; VIANNA-SOARES, Cristina D.; PIANETTI, Gérson A. ANÁLISE TÉRMICA APLICADA À CARACTERIZAÇÃO DA SINVASTATINA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS Marcelo. **Química Nova**, vol. 33, no. 8, p. 1653–1657, 2010. .

DOMINGUES, Beatriz; LOPES, Jose; SOARES, Paula; POPULO, Helena. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, vol. Volume 7, p. 35–49, 2018. <https://doi.org/10.2147/itt.s134842>.

DRUGBANK. Simvastatin. 2005. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00641>. Accessed on: 14 Dec. 2020.

DUARTE, Jaqueline Aparecida; DE BARROS, Andre Luis Branco; LEITE,

Elaine Amaral. The potential use of simvastatin for cancer treatment : A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 141, no. 111858, p. 9, 2021. DOI 10.1016/j.biopha.2021.111858. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111858>.

EICHNER, Adina; STAHLBERG, Sören; SONNENBERGER, Stefan; LANGE, Stefan; DOBNER, Bodo; OSTERMANN, Andreas; SCHRADER, Tobias E.; HAUSS, Thomas; SCHROETER, Annett; HUSTER, Daniel; NEUBERT, Reinhard H.H. Influence of the penetration enhancer isopropyl myristate on stratum corneum lipid model membranes revealed by neutron diffraction and ²H NMR experiments. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, vol. 1859, no. 5, p. 745–755, 2017. DOI 10.1016/j.bbamem.2017.01.029. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.029>.

ELSEVIER. SciVerse Scopus. 2021. Available at: <https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic#basic>. Accessed on: 15 Feb. 2021.

EMAMI, Arya; SHOJAEI, Shahla; DA SILVA ROSA, Simone C.; AGHAEI, Mahmoud; SAMIEI, Ehsan; VOSOUGHI, Amir Reza; KALANTARI, Forouh; KAWALEC, Philip; THLIVERIS, James; SHARMA, Pawan; ZEKI, Amir A.; AKBARI, Mohsen; GORDON, Joseph W.; GHAVAMI, Saeid. Mechanisms of simvastatin myotoxicity: The role of autophagy flux inhibition. **European Journal of Pharmacology**, vol. 862, no. July, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172616>.

FELESZKO, W.; MLYNARCZUK, I.; OLSZEWSKA, D.; JALILI, A.; GRZELA, T.; LASEK, W.; HOSER, G.; KORCZAK-KOWALSKA, G.; JAKÓBISIAK, M. Lovastatin potentiates antitumor activity of doxorubicin in murine melanoma via an apoptosis-dependent mechanism. **International Union Against Cancer**, no. 100, p. 111–118, 2002. .

FELESZKO, W.; ZAGOZDZON, R.; GOŁĄB, J.; JAKÓBISIAK, M. Potentiated antitumour effects of cisplatin and lovastatin against MmB16 melanoma in mice. **European Journal of Cancer**, vol. 34, no. 3, p. 406–411, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)10034-X](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)10034-X).

FERREIRA, Kaline do Nascimento. **Estudo da liberação controlada de Sinvastatina utilizando nanofibras se PLA/PEG produzidas por fiação por**

- sopro em solução**. 2017. 90 f. Universidade Federal da Paraíba, 2017.
- GASKELL, Elsie; HAMILTON, Ashley. Antimicrobial clay-based materials for wound care. **Future Medicinal Chemistry**, vol. 6, no. 6, p. 641–655, 2014. .
- GAYATRI, Prima Abigail; KRISNAWATI; SAHLAN, Muhamad; PRATAMI, Diah Kartika; WIDAYATI, Retno. Stability of zoledronate gel emulsion in virgin coconut oil. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, vol. 11, no. September, p. 201–206, 2019. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019.v11s1.18204>.
- GEAR, Perme. Franz Cell – The Original. [s. d.]. **Perme Gear**. Available at: <https://permegear.com/franz-cells/>. Accessed on: 8 Sep. 2021.
- GENERALI, Joyce A.; CADA, Dennis J. Simvastatin: Multiple sclerosis. **Hospital Pharmacy**, vol. 50, no. 6, p. 464–466, 2015. <https://doi.org/10.1310/hpj5006-464>.
- GHADIRI, M.; CHRZANOWSKI, W.; ROHANIZADEH, R. Antibiotic eluting clay mineral (Laponite®) for wound healing application: an in vitro study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, vol. 25, no. 11, p. 2513–2526, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5272-7>.
- GOOGLE. Google acadêmico. 2021. .
- HAMILTON, A. R.; ROBERTS, M.; HUTCHEON, G. A.; GASKELL, E. E. Formulation and antibacterial properties of clay mineral-tetracycline and -doxycycline composites. **Applied Clay Science**, vol. 179, no. May, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105148>.
- HEENATIGALA PALLIYAGE, Gayathri; SINGH, Somnath; ASHBY, Charles R.; TIWARI, Amit K.; CHAUHAN, Harsh. Pharmaceutical Topical Delivery of Poorly Soluble Polyphenols: Potential Role in Prevention and Treatment of Melanoma. **AAPS PharmSciTech**, vol. 20, no. 6, 2019. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1457-1>.
- ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. [S. l.: s. n.], 2005.
- IQBAL, Babar; ALI, Javed; BABOOTA, Sanjula. Recent advances and development in epidermal and dermal drug deposition enhancement technology. **International Journal of Dermatology**, vol. 57, no. 6, p. 646–660, 2018. <https://doi.org/10.1111/ijd.13902>.

JENKINS, Russell W.; FISHER, David E. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 141, no. 1, p. 23–31, 2021. DOI 10.1016/j.jid.2020.03.943. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.03.943>.

JONES, Roger W. Infrared Technology. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, vol. 14, no. 1, p. 1–20, 2000. <https://doi.org/10.1002/0471238961.0914061810151405.a01>.

JUNIOR, Adalberto Enumo. **Desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose recobertas com quitosana contendo curcumina aplicadas em tratamentos cutâneos**. 2020. 169 f. Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.

KANFER, Isadore; RATH, Seeprarani; PURAZI, Potiwa; MUDYAHOTO, Nyengeterai Amanda. In vitro release testing of semi-solid dosage forms. **Dissolution Technologies**, vol. 24, no. 3, p. 52–60, 2017. <https://doi.org/10.14227/DT240317P52>.

KAROYO, Abdalla; WILSON, Lee. Physicochemical Properties and the Gelation Process of Supramolecular Hydrogels: A Review. **Gels**, vol. 3, no. 1, p. 1, 2017. <https://doi.org/10.3390/gels3010001>.

KIANFAR, F; NM, Dempster; EE, Gaskell; ROBERTS, M; GA, Hutcheon. Madridge Journal of Novel Drug Research Lyophilised Biopolymer-Clay Hydrogels for Drug delivery. **Madridge J Nov Drug Res.**, vol. 1, no. 1, p. 1–9, 2017. <https://doi.org/10.18689/mjndr.2017-101>.

KIMURA, Yujj; HARAGUCHI, Kazutoshi. Clay-Alcohol-Water Dispersions: Anomalous Viscosity Changes Due to Network Formation of Clay Nanosheets Induced by Alcohol Clustering. **Langmuir**, vol. 33, no. 19, p. 4758–4768, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00764>.

KOVÁČIK, Andrej; KOPEČNÁ, Monika; VÁVROVÁ, Katerina. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. **Expert Opinion on Drug Delivery**, vol. 17, no. 2, p. 145–155, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1713087>.

KOVÁČIK, Andrej; KOPEČNÁ, Monika; VÁVROVÁ, Kateřina. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. **Expert Opinion on Drug Delivery**, vol. 17, no. 2, p. 145–155, 2020. DOI

10.1080/17425247.2020.1713087. Available at:
<https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1713087>.

KURYK, Lukasz; BERTINATO, Laura; STANISZEWSKA, Monika; PANCER, Katarzyna; WIECZOREK, Magdalena; SALMASO, Stefano; CALICETI, Paolo; GAROFALO, Mariangela. From conventional therapies to immunotherapy: Melanoma treatment in review. **Cancers**, vol. 12, no. 10, p. 1–20, 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12103057>.

LEDEȚI, Ionuț; VLASE, Gabriela; VLASE, Titus; FULIAȘ, Adriana; ȘUTA, Lenuța Maria. Comparative thermal stability of two similar-structure hypolipidemic agents: Simvastatin and Lovastatin—kinetic study. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, vol. 125, no. 2, p. 769–775, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10973-015-5071-5>.

LEONARDI, Giulia C.; FALZONE, Luca; SALEMI, Rossella; ZANGHÌ, Antonino; SPANDIDOS, Demetrios A.; MCCUBREY, James A.; CANDIDO, Saverio; LIBRA, Massimo. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, vol. 52, no. 4, p. 1071–1080, 2018. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4287>.

LIU, Huan; WANG, Fang; DENG, Li; XU, Peng. Genetic and bioprocess engineering to improve squalene production in *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, vol. 317, no. July, p. 123991, 2020. DOI 10.1016/j.biortech.2020.123991. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123991>.

LOPES, Eva Maria Xavier; DE CASTILHO, Fábio Lopes Moreira; DE CASTRO, Victória Carolina Freire. Análises De Qualidade De Xampus De Cetoconazol 2% Manipulados Em Farmácias Magistrais De Porto Velho, Ro, Brasil. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, vol. 31, no. 3, p. 155–176, 2019. <https://doi.org/10.14450/2318-9312.v31.e3.a2019.pp155-162>.

LU, Wangding; RADES, Thomas; RANTANEN, Jukka; CHAN, Hak Kim; YANG, Mingshi. Amino acids as stabilizers for spray-dried simvastatin powder for inhalation. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 572, no. September, p. 118724, 2019. DOI 10.1016/j.ijpharm.2019.118724. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118724>.

MALVEY, Srilatha; RAO, J Venkateshwar; MUTHU, Arumugam.

TRANSDERMAL DRUG DELIVERY SYSTEM: A MINI REVIEW. **The Pharma Innovation**, vol. 8, no. 1, p. 181–197, 31 May 2019. DOI 10.21474/IJAR01/7109. Available at:

<http://www.journalijar.com/article/23597/transdermal-drug-delivery-systems:-a-mini-review/>.

MATTHEWS, Natalie H.; LI, Wen-Qing; QURESHI, Abrar A.; WEINSTOCK, Martin A.; CHO, Eunyoung. Epidemiology of Melanoma. **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy**. [S. l.]: Codon Publications, 2017. p. 3–22. DOI 10.15586/codon.cutaneoumelanoma.2017.ch1. Available at: <http://dx.doi.org/10.15586/codon.cutaneoumelanoma.2017.ch1>.

MILLER, Rachael; WALKER, Sophie; SHUI, Irene; BRANDTMÜLLER, Agnes; CADWELL, Kevin; SCHERRER, Emilie. Epidemiology and survival outcomes in stages II and III cutaneous melanoma: a systematic review. **Melanoma Management**, vol. 7, no. 1, p. 39–53, 2020. <https://doi.org/10.2217/mmt-2019-0022>.

NAGULA, Ruchika L.; WAIRKAR, Sarika. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. **Journal of Controlled Release**, vol. 296, no. December 2018, p. 190–201, 2019. DOI 10.1016/j.jconrel.2019.01.029. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.029>.

NAMJOSHI, Sarika; DABBAGHI, Maryam; ROBERTS, Michael S.; GRICE, Jeffrey E.; MOHAMMED, Yousuf. Quality by design: Development of the quality target product profile (QTPP) for semisolid topical products. **Pharmaceutics**, vol. 12, no. 3, 2020. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030287>.

NARAYAN, Suthar; MANUPRIYA, Choudhary. A REVIEW ON STABILITY STUDIES OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS. **International journal of Applied Pharmaceutical and Biological Research**, vol. 2, no. 3, p. 67–75, 2017. .

NEUMANN, B. S. Behaviour of a synthetic clay in pigment dispersions. **Rheologica Acta**, vol. 4, no. 4, p. 250–255, 1965. <https://doi.org/10.1007/BF01973660>.

OH, Luke; YI, Sojeong; ZHANG, Da; SHIN, Soo Hyeon; BASHAW, Edward. In Vitro Skin Permeation Methodology for Over-The-Counter Topical Dermatologic Products. **Therapeutic Innovation and Regulatory Science**,

vol. 54, no. 3, p. 693–700, 2020. DOI 10.1007/s43441-019-00104-3. Available at: <https://doi.org/10.1007/s43441-019-00104-3>.

PARCHEN, Gabriela Pereira; JACUMAZO, Joslaine; KOOP, Heidegrid Siebert; BISCAIA, Stelée Marcela Petris; TRINDADE, Edvaldo S.; SILVEIRA, Joana Léa Meira; DE FREITAS, Rilton Alves. Modulation of Epidermal Growth Factor Release by Biopolymer-Coated Liposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 109, no. 7, p. 2294–2301, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.04.004>.

PARHI, Rabinarayan; PADILAM, Suresh. In vitro permeation and stability studies on developed drug-in-adhesive transdermal patch of simvastatin. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, vol. 56, no. 1, p. 26–33, 2018. DOI 10.1016/j.bfopcu.2018.04.001. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2018.04.001>.

PATIL, P. B.; DATIR, S. K.; SAUDAGAR, R. B. A Review on Topical Gels as Drug Delivery System. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, vol. 9, no. 3, p. 989–994, 2019. .

PAUMGARTTEN, Francisco José Roma; DE OLIVEIRA, Ana Cecilia Amado Xavier. Off label, compassionate and irrational use of medicines in covid-19 pandemic, health consequences and ethical issues. **Ciencia e Saude Coletiva**, vol. 25, no. 9, p. 3413–3419, 2020. <https://doi.org/10.1590/1413-81232020259.16792020>.

PEÑALVER, Rosa; ARROYO-MANZANARES, Natalia; LÓPEZ-GARCÍA, Ignacio; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, Manuel. An overview of microplastics characterization by thermal analysis. **Chemosphere**, vol. 242, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125170>.

PERARO, Gustavo R.; DONZELLI, Eduardo H.; OLIVEIRA, Pollyanna F.; TAVARES, Denise Crispim; GOMES MARTINS, Carlos H.; MOLINA, Eduardo F.; DE FARIA, Emerson H. Aminofunctionalized LAPONITE® as a versatile hybrid material for chlorhexidine digluconate incorporation: Cytotoxicity and antimicrobial activities. **Applied Clay Science**, vol. 195, no. 105733, p. 1–13, 2020. DOI 10.1016/j.clay.2020.105733. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105733>.

PEREIRA, Marcos de Souza; RAU, Carina. A prática off label e os riscos

associados à terapia medicamentosa sem orientação médica. **8ª Mostra de Produção da Pós Graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, , p. 282–302, 2013.

PINTO, Juliana Munari Oliveira. **Desenvolvimento de sistemas supersaturados de liberação de candesartana cilexetila e hidroclorotiazida na forma de dispersões sólidas amorfas**. 2018. 176 f. Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.

POLOWSKY, P. J.; TANSMAN, G. F.; KINDSTEDT, P. S.; HUGHES, J. M. Characterization and identification of surface crystals on smear-ripened cheese by polarized light microscopy. **Journal of Dairy Science**, vol. 101, no. 9, p. 7714–7723, 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14712>.

RIBAS, Karla Giacomelli. **EBASTINA: Obtenção de novas formas cristalinas e caracterização no estado sólido**. 2015. 80 f. Universidade Federal de Santa Maria, 2015.

RIZVI, Syed Zaki Husain; SHAH, Fawad Ali; KHAN, Namrah; MUHAMMAD, Iftikhar; ALI, Khan Hashim; ANSARI, Muhammad Mohsin; DIN, Fakhar ud; QURESHI, Omer Salman; KIM, Kyoung Won; CHOE, Yeong Hwan; KIM, Jin Ki; ZEB, Alam. Simvastatin-loaded solid lipid nanoparticles for enhanced anti-hyperlipidemic activity in hyperlipidemia animal model. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 560, no. December 2018, p. 136–143, 2019. DOI 10.1016/j.ijpharm.2019.02.002. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.002>.

RODRIGUES, João. Miristato de isopropilo/molécula da semana. 2019. **Fciências**. Available at: <https://www.fciencias.com/2019/04/04/miristato-de-isopropilo-molecula-da-semana/>. Accessed on: 31 Jul. 2021.

ROY, Nimisha; AGRAWAL, Mehul; CHAUDHARY, Shubhangi; TIRKEY, Vipin; DHWAJ, Amar; MISHRA, Nidhi. Review Article on Permeation Enhancers: a Major Breakthrough in Drug Delivery Technology. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, vol. 8, no. 3, p. 1001–1011, 2017. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8\(3\).1001-11](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8(3).1001-11).

RUIZ, Maria Esperanza; MONTOTO, Sebastián Scioli. Routes of drug administration. **ADME Processes in Pharmaceutical Sciences**, , p. 97–133, 2018. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-99593-9_6.

RUZICKA, Barbara; ZACCARELLI, Emanuela. A fresh look at the Laponite phase diagram. **Soft Matter**, vol. 7, no. 4, p. 1268–1286, 2011. <https://doi.org/10.1039/c0sm00590h>.

SAITO, A.; SAITO, N.; MOL, W.; FURUKAWA, H.; TSUTSUMIDA, A.; OYAMA, A.; SEKIDO, M.; SASAKI, S.; YAMAMOTO, Y. Simvastatin inhibits growth via apoptosis and the induction of cell cycle arrest in human melanoma cells. **Melanoma Research**, vol. 18, no. 2, p. 85–94, 2008. <https://doi.org/10.3329/bjp.v7i3.11507>.

SAMEH, Nahla; F ALY, Usama; ABOU TALEB, Heba A; ABDELLATIF, Ahmed AH. Prospective Role of Simvastatin on Wound Healing: Review of the Literature. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, vol. 10, no. 2, p. 36–42, 2018. <https://doi.org/10.4172/0975-0851.1000375>.

SCHADENDORF, Dirk; VAN AKKOOI, Alexander C.J.; BERKING, Carola; GRIEWANK, Klaus G.; GUTZMER, Ralf; HAUSCHILD, Axel; STANG, Andreas; ROESCH, Alexander; UGUREL, Selma. Melanoma. **The Lancet**, vol. 392, no. 10151, p. 971–984, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9).

SHAKEEL, Ahmad; MAHMOOD, Hamayoun; FAROOQ, Ujala; ULLAH, Zahoor; YASIN, Saima; IQBAL, Tanveer; CHASSAGNE, Claire; MONIRUZZAMAN, Muhammad. Rheology of Pure Ionic Liquids and Their Complex Fluids: A Review. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, vol. 7, no. 16, p. 13586–13626, 2019. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02232>.

SHELLMAN, Yiqun G.; RIBBLE, Deborah; MILLER, Leslie; GENDALL, John; VANBUSKIRK, Kayleen; KELLY, Desiree; NORRIS, David A.; DELLAVALLE, Robert P. Lovastatin-induced apoptosis in human melanoma cell lines. **Melanoma Research**, vol. 15, no. 2, p. 83–89, 2005. <https://doi.org/10.1097/00008390-200504000-00001>.

SHESHALA, Ravi; ANUAR, Nor Khaizan; ABU SAMAH, Nor Hayati; WONG, Tin Wui. In Vitro Drug Dissolution/Permeation Testing of Nanocarriers for Skin Application: a Comprehensive Review. **AAPS PharmSciTech**, vol. 20, no. 5, 2019. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1362-7>.

SILVA, Ana Filipa Marques. **Uso Off-Label De Medicamentos : Um Tema Controverso**. 2018. 83 f. Universidade do Algarve (UAlg), 2018.

SILVEIRA, Marilusa Cunha da. **O uso Off Label de Medicamentos no Brasil**. 2019. 196 f. Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

SIMÕES, Susana M.N.; VEIGA, Francisco; TORRES-LABANDEIRA, Juan J.; RIBEIRO, Ana Cristina F.; CONCHEIRO, Angel; ALVAREZ-LORENZO, Carmen. Poloxamine-cyclodextrin-simvastatin supramolecular systems promote osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. **Macromolecular Bioscience**, vol. 13, no. 6, p. 723–734, 2013. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300017>.

SINGH, Deepinder; MITAL, Neeraj; KAUR, Gurpreet. **Topical Drug Delivery Systems: A Patent Review**. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. [S. l.: s. n.], 2015. <https://doi.org/https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1131267>.

SISTI, Andrea; SISTI, Giovanni; ORANGES, Carlo Maria. Topical treatment of melanoma skin metastases with Imiquimod: a review. **Dermatology Online Journal**, vol. 21, no. 2, p. 1–7, 2015. DOI <https://escholarship.org/uc/item/8rj4k7r6>. Available at: <https://escholarship.org/uc/item/8rj4k7r6>.

SOARES, Margarida; VITORINO, Carla; SOUSA, João; PAIS, Alberto. Permeação cutânea: desafios e oportunidades. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, vol. 36, no. 3, p. 337–348, 2015. .

SOCIETY, American Chemical. SciFinder-n. 2020. .

SOUZA, VIVIANE DA SILVA DE. **AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE FRENTE A AÇÃO MICROBIOLÓGICA EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS**. 2017. 45 f. Fundação Oswaldo Cruz, 2017. Available at: [https://gain.fas.usda.gov/Recent GAIN Publications/Agricultural Biotechnology Annual_Ottawa_Canada_11-20-2018.pdf%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.resourpol.2020.101869%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.06.039%0Ahttp://www.oecd.org/gov/regulatory-poli](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20Publications/Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Ottawa_Canada_11-20-2018.pdf%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.resourpol.2020.101869%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.06.039%0Ahttp://www.oecd.org/gov/regulatory-poli).

SPANOVA, Miroslava; DAUM, Günther. Squalene - biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. **European Journal of Lipid Science and Technology**, vol. 113, no. 11, p. 1299–1320, 2011. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100203>.

STEPHENS, Kristen; GURENLIAN, R. Jo-Ann. Ethical and Legal

Considerations of Off-Label Drug Use. **Decisions in Dentistry**, vol. 4, no. 3, p. 37–40, 2018. Available at: [https://decisionsindentistry.com/article/ethical-and-legal-considerations-of-off-label-drug-](https://decisionsindentistry.com/article/ethical-and-legal-considerations-of-off-label-drug-use/)

[use/%0Ahttp://decisionsindentistry.com/article/ethical-and-legal-considerations-of-off-label-drug-use/](https://decisionsindentistry.com/article/ethical-and-legal-considerations-of-off-label-drug-use/).

SUPE, Shibani; TAKUDAGE, Pooja. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. **Skin Research and Technology**, vol. 27, no. 3, p. 299–308, 2021. <https://doi.org/10.1111/srt.12968>.

SURINI, Silvia; AMIRTHA, Nurul Isti; LESTARI, Delly Chipta. Formulation and effectiveness of a hand sanitizer gel produced using Salam bark extract. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, vol. 10, no. Special Issue 1, p. 216–220, 2018. <https://doi.org/10.22159/ijap.2018.v10s1.48>.

TOMÁS, Helena; ALVES, Carla S.; RODRIGUES, João. Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications? **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, vol. 14, no. 7, p. 2407–2420, 2018. DOI 10.1016/j.nano.2017.04.016. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.04.016>.

TRUCILLO, P.; CAMPARDELLI, R.; REVERCHON, E. Antioxidant loaded emulsions entrapped in liposomes produced using a supercritical assisted technique. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 154, p. 1–8, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104626>.

TSAKOVSKA, Ivanka; PAJEVA, Ilza; AL SHARIF, Merilin; ALOV, Petko; FIORAVANZO, Elena; KOVARICH, Simona; WORTH, Andrew P.; RICHARZ, Andrea Nicole; YANG, Chihae; MOSTRAG-SZLICHTYNG, Aleksandra; CRONIN, Mark T.D. Quantitative structure-skin permeability relationships. **Toxicology**, vol. 387, no. March, p. 27–42, 2017. DOI 10.1016/j.tox.2017.06.008. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.008>.

UNTERMAN, Shimon; CHARLES, Lyndon F.; STRECKER, Sara E.; KRAMARENKO, Denis; PIVOVARCHIK, Dmitry; EDELMAN, Elazer R.; ARTZI, Natalie. Hydrogel Nanocomposites with Independently Tunable Rheology and Mechanics. **ACS Nano**, vol. 11, no. 3, p. 2598–2610, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06730>.

URBANOVA, Martina; STURCOVA, Adriana; KREDATUSOVA, Jana; BRUS, Jiri. Structural insight into the physical stability of amorphous Simvastatin dispersed in pHPMA: Enhanced dynamics and local clustering as evidenced by solid-state NMR and Raman spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 478, no. 2, p. 464–475, 2015. DOI 10.1016/j.ijpharm.2014.12.007. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.007>.

VALAND, Reema; TANNA, Sangeeta; LAWSON, Graham; BENGTSTRÖM, Linda. A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations. **Food Additives & Contaminants: Part A**, vol. 37, no. 1, p. 19–38, 2 Jan. 2020. DOI 10.1080/19440049.2019.1675909. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19440049.2019.1675909>.

VAN DE VEL, Elien; SAMPERS, Imca; RAES, Katleen. A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 59, no. 3, p. 357–378, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1371112>.

VANMEERT, Frederik; DE NOLF, Wout; DE MEYER, Steven; DIK, Joris; JANSSENS, Koen. Macroscopic X-ray Powder Diffraction Scanning, a New Method for Highly Selective Chemical Imaging of Works of Art: Instrument Optimization. **Analytical Chemistry**, vol. 90, no. 11, p. 6436–6444, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00240>.

VEERNALA, Induvahi; ROOPMANI, Purandhi; SINGH, Ruby; HASAN, Uzma; GIRI, Jyotsnendu. Cell encapsulated and microenvironment modulating microbeads containing alginate hydrogel system for bone tissue engineering. **Progress in Biomaterials**, vol. 10, no. June, p. 131–150, 2021. .

WITKOWSKA-BANASZCZAK, Ewa; MICHALAK, Anna; KĘDZIA, Anna. In vitro antimicrobial activity of Bronchosol. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, vol. 72, no. 2, p. 367–375, 2015. .

XIE, Shicong; SKOTHEIM, Jan M. A G1 Sizer Coordinates Growth and Division in the Mouse Epidermis. **Current Biology**, vol. 30, no. 5, p. 916-924.e2, 2020. DOI 10.1016/j.cub.2019.12.062. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.062>.

ZANFARDINO, Mario; SPAMPANATO, Carmine; DE CICCIO, Rosanna; BUOMMINO, Elisabetta; DE FILIPPIS, Anna; BAIANO, Salvatore; BARRA, Adriano; MORELLI, Franco. Simvastatin reduces melanoma progression in a murine model. **International Journal of Oncology**, vol. 43, no. 6, p. 1763–1770, 2013. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2126>.

ZGHAL, Nadia Smaoui; DERBEL, Nabil. Melanoma Skin Cancer Detection based on Image Processing. **Current Medical Imaging Formerly Current Medical Imaging Reviews**, vol. 16, no. 1, p. 50–58, 2018. <https://doi.org/10.2174/1573405614666180911120546>.

ZHENG, Zhihua; YANG, Min; WU, Junyan. Ethical off-label drug-use: Need for a rethink? **Indian Pediatrics**, vol. 54, no. 6, p. 447–450, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13312-017-1045-y>.

ZHOU, Xiang; LIU, Dong; BU, Hongling; DENG, Liangliang; LIU, Hongmei; YUAN, Peng; DU, Peixin; SONG, Hongzhe. XRD-based quantitative analysis of clay minerals using reference intensity ratios, mineral intensity factors, Rietveld, and full pattern summation methods: A critical review. **Solid Earth Sciences**, vol. 3, no. 1, p. 16–29, 2018. DOI 10.1016/j.sesci.2017.12.002. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sesci.2017.12.002>.

ZIDAN, Ahmed S.; KAMAL, Nahid; ALAYOUBI, Alaadin; SEGCEL, Mark; IBRAHIM, Sarah; RAHMAN, Ziyaur; CRUZ, Celia N.; ASHRAF, Muhammad. Effect of Isopropyl Myristate on Transdermal Permeation of Testosterone From Carbopol Gel. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 106, no. 7, p. 1805–1813, 2017. DOI 10.1016/j.xphs.2017.03.016. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.016>.

APÊNDICE A - Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por UV/Vis

1. METODOLOGIA

A metodologia analítica foi desenvolvida levando-se em conta os dados descritos na literatura e na Farmacopeia Brasileira (ANZILAGGO, 2017; CONVENTION, 2019). Para tal, utilizou-se um espectrofotômetro de absorção no Ultravioleta de duplo feixe no modelo Cary 50 da Varian (Califórnia, Estados Unidos da América) tendo como comprimento de onda selecionado para as análises de 238,5 nm.

A validação do método analítico foi realizado seguindo os parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão e precisão preconizados na Resolução RDC n° 166 de 24 de Julho de 2017 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017) e Q2R1 *Guideline International Conference on Harmonization* (ICH) (ICH, 2005).

1.1 Especificidade

A especificidade do método foi determinada através de uma varredura em modo SCAN de 200 a 400 nm de uma solução contendo 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de SIN e LAP em acetonitrila. Além disso, foi realizada a comparação da absorbância de uma solução A contendo 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de SIN em 50:50 metanol/água e uma solução B e C contendo 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de SIN em metanol/0,5% de LAP aquoso (50:50). A solução A e B teve o equipamento zerado com uma solução 50:50 metanol/água, enquanto a solução C teve o equipamento zerado com uma solução de metanol/0,5% de LAP aquoso (50:50).

1.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pela regressão linear através da construção de três curvas de calibração nas concentrações de 5, 10, 13, 15, 18 e 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ preparadas a partir de uma solução padrão de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de SIN. Para a solução padrão, pesou-se 10 mg de SIN que foi adicionada em balão volumétrico de 10 mL e dissolvida em acetonitrila. Alíquotas da solução padrão foram diluídas em balão volumétrico de 5 mL em acetonitrila e tendo as leituras analisadas em cubeta de 3 mL de quartzo com o caminho óptico de 1 cm.

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinadas a partir das equações 1 e 2:

$$LD = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (2)$$

onde σ é o desvio padrão do intercepto das curvas com eixo Y e S é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

1.3 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram calculadas através do coeficiente de variação (CV), também chamado de desvio padrão relativo (do inglês, *relative standard deviation*, RSD), no qual a precisão foi determinada pela repetibilidade (intradia) através da quantificação de seis amostras da F1:3 de mesma concentração de SIN ($15 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) realizadas no mesmo dia. A exatidão do método foi avaliada pelo ensaio de recuperação a partir da sextuplicada da amostra F1:3 na concentração teórica de $5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, no qual foi fortificado com $10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de padrão da SIN, obtendo uma concentração final de $15 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

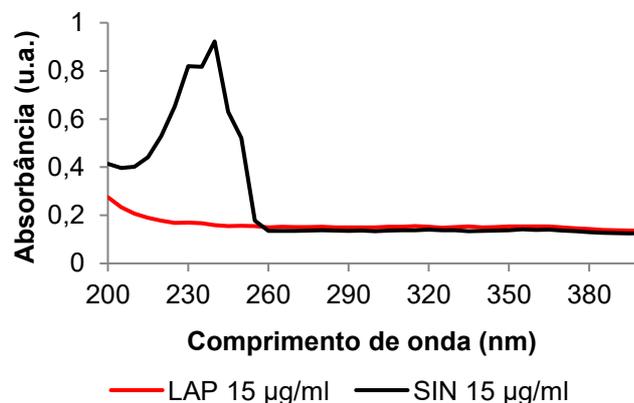
1.4 Robustez

A robustez do preparo de amostra foi realizado através da análise da estabilidade da amostra F1:3 e do padrão preparados em acetonitrila 72 horas após sua preparação em triplicata.

2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Primeiramente foi realizada uma varredura de uma solução de SIN e LAP em acetonitrila na mesma concentração ($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), conforme observado na Figura 28. A sinvastatina apresentou dois picos de absorção máximo, em 239,5 nm e outro em 230,1 nm. Assim, o comprimento de onda de 238,5 nm foi selecionado para quantificar a SIN conforme descrito na literatura (ANZILAGGO, 2017). Enquanto o Laponite[®] apresentou picos de absorção entre 200 a 350 nm, porém sem um pico de absorção máxima (Figura 30). A especificidade da SIN também foi realizada através da comparação da absorbância de três soluções: A, B e C conforme descrito no item 4.2.2. Os resultados se encontram na Tabela 13.

Figura 30. Especificidade do método a partir da análise em modo SCAN no espectrofotômetro de absorção no UV na faixa de 400 nm a 200 nm, no qual: a) linha preta: sinvastatina e b) linha vermelha: Laponite[®] na mesma concentração ($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Tabela 13. Comparação entre as absorbâncias da solução A, B e C que refere à solução contendo SIN em metanol/água (50:50), SIN em metanol/0,5% de LAP aquoso (50:50) e SIN em metanol/0,5% de LAP aquoso (50:50) com o equipamento zerado com uma solução de metanol/0,5% de LAP aquoso (50:50), respectivamente.

Solução	Absorbância (u.a.)
A	0,6122 ($\pm 0,0142$)
B	0,9361 ($\pm 0,0193$)
C	0,6009 ($\pm 0,0244$)

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Através da análise dos resultados obtidos na Tabela 13 pôde-se verificar a necessidade de considerar a absorvância do Laponite® no comprimento de onda selecionado para a quantificação da sinvastatina pelo método descrito.

A linearidade, LD, LQ, precisão, exatidão e a robustez do método analítico para a determinação da sinvastatina podem ser encontrados na Tabela 14.

Tabela 14. Linearidade, LD, LQ, precisão, exatidão e a robustez para validação do método proposto.

	Concentração $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média \pm desvio padrão)	CV (%)
Precisão	14,64 \pm 0,35	2,40
Exatidão	14,00 \pm 0,70	5,04
Robustez (padrão)	14,55 \pm 0,51	3,51
Robustez (amostra F1:3)	14,87 \pm 0,38	2,56
Linearidade	5-20	
Regressão Linear	$y = 0,057x - 0,0629$	
r	0,9998	
LD	0,74	----
LQ	2,25	----

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Conforme a resolução nº 166 de 24 de Julho de 2017 da ANVISA, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99, enquanto o valor máximo aceitável para a precisão e exatidão do método não pode ser superiores a 5% (ANVISA, 2017). Foi aplicado o teste t de *Student* no teste de robustez em relação a curva de calibração mostrando que são estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Portanto, o método proposto pode ser considerado linear, preciso, exato e robusto.

3. REFERÊNCIAS

ANVISA. RESOLUÇÃO RDC No 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. **Diário Oficial da União**, v. 1, p. 87, 2017.

ANZILAGGO, Daiane. **Sistemas Liquissólidos Como Uma Abordagem Tecnológica Para Melhorar O Perfil De Dissolução Da Sinvastatina**. 2017.

CONVENTION, United States Pharmacopeial. **The United States Pharmacopeial**. 42. ed. 2019.

ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. 2005.

APÊNDICE B - Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por CLAE

1. METODOLOGIA

A metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação da SIN teve como base na Farmacopeia Brasileira e os dados descritos na literatura (ANZILAGGO, 2017; CONVENTION, 2019). As análises foram desenvolvidas em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-10A, degaseificador DGU-14A, detector de luz UV SPD-10A em 238 nm e auto injetor SCL-10A. As condições cromatográficas incluem a utilização de uma coluna de fase reversa Phenomenex Luna® 5u C18 (250 x 4,6 mm) mantida à temperatura de 25 °C. A fase móvel foi composta por acetonitrila e água (85:15 v/v) com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. Os dados obtidos foram avaliados através do software CLASS-VP® V 6.14.

A validação do método analítico foi realizado seguindo os parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão e precisão preconizados na Resolução RDC n° 166 de 24 de Julho de 2017 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2017) e Q2R1 *Guideline International Conference on Harmonization* (ICH) (ICH, 2005).

1.1 Especificidade

A especificidade do método foi determinada através das análises comparativas das áreas e do perfil do pico das amostras fortificadas na concentração de 5 µg.mL⁻¹ de SIN na presença dos constituintes interferentes das formulações propostas e nos ensaios realizados. Assim, analisou a SIN na presença da pele após o contato com acetonitrila, para precipitação das proteínas presentes e após o contato com o meio receptor (tampão PBS pH 7,4 e etanol na proporção 70:30). Além disso, analisou-se a SIN na presença do LAP, ESQ e MIR a 1% diluído em fase móvel para garantir que os constituintes das formulações e do ensaio *ex vivo* não absorvessem no comprimento de onda selecionado para quantificar a SIN.

1.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pela regressão linear através da construção de três curvas de calibração nas concentrações de 0,30, 0,50, 1,00, 2,50, 5,00, 10,00 e 15,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ preparadas a partir de uma solução padrão de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de SIN. Para a solução padrão, pesou-se 10 mg de SIN que foi adicionada em balão volumétrico de 10 mL e dissolvida em acetonitrila. A partir da solução estoque padrão foi preparado em acetonitrila soluções contendo 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de SIN para facilitar as diluições. As diluições foram realizadas nos *vials* diretamente em fase móvel.

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinadas a partir das equações 1 e 2.

$$LD = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (2)$$

onde σ é o desvio padrão do intercepto das curvas com eixo Y e S é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

1.3 Precisão e Exatidão

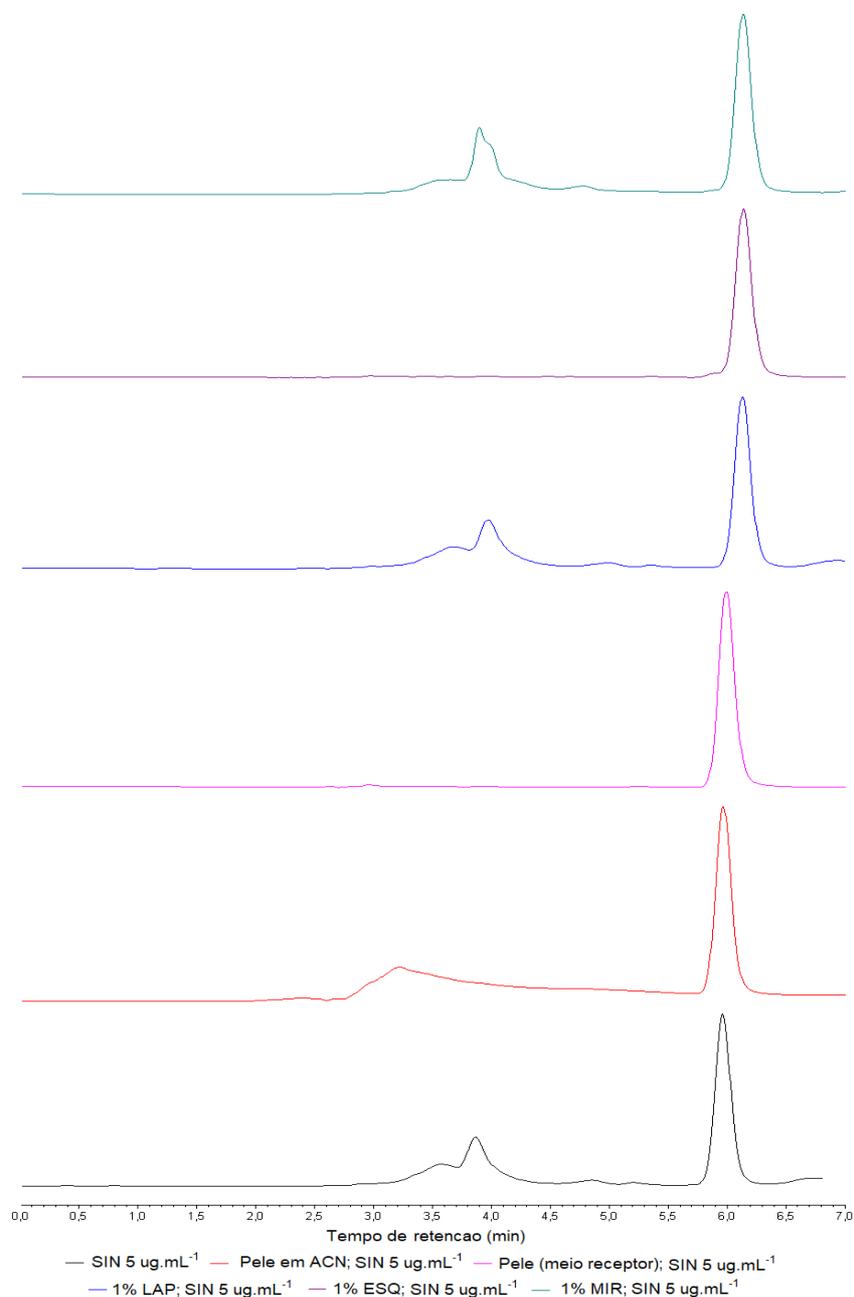
A precisão e a exatidão foram calculados através dos coeficientes de variação (CV), no qual a precisão foi determinada pela repetibilidade (interdia) através da quantificação de seis amostras de SIN (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A exatidão do método foi avaliada pelo ensaio de recuperação a partir da sextuplicada do doseamento do gel contendo 7,50 mg.mL^{-1} de SIN, 5% de MIR e 3% de LAP. Para tal, pesou-se aproximadamente 150 mg do gel com o auxílio de uma espátula (após homogeneização mecânica), adicionou-se 50 mL de acetonitrila e levou-se a um banho ultrassônico por 10 minutos. Após esse tempo, com auxílio de tubos falcon, uma parte da solução foi centrifugada por 15 min e diluída em fase móvel na proporção de 1:3 e quantificadas por CLAE.

2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.1 Especificidade

O ensaio de especificidade foi realizado com o intuito de garantir que os demais constituintes utilizados nas formulações e nos ensaios não interferissem na metodologia analítica desenvolvida para quantificar a SIN. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 31.

Figura 31. Especificidade do método desenvolvido por CLAE para análise de SIN na presença de: na pele em acetonitrila, na pele em meio receptor utilizado no ensaio de permeação, em fase móvel na presença de 1% de LAP, 1% de ESQ e 1% de MIR.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

As análises resultaram em um CV menor que 5%, garantido que os interferentes não são retidos no mesmo tempo que a SIN na fase estacionária sob as condições de análise proposta.

2.1 Linearidade

A linearidade, LD, LQ, precisão e exatidão do método proposto para a determinação da SIN podem ser encontradas na Tabela 15.

Tabela 15. Linearidade, LD, LQ, precisão e exatidão para validação do método por CLAE proposto.

	Concentração $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média \pm desvio padrão)	CV (%)
Precisão	4,71 \pm 0,18	3,90
Exatidão	5,86 \pm 0,07	1,13
Linearidade	0,30 a 15,00	----
Regressão Linear	$y = 60985x - 3007,8$	----
r	0,9999	----
LD	0,04	----
LQ	0,11	----

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Conforme a resolução RDC n° 166 de 24 de Julho de 2017 pela ANVISA, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99, enquanto o valor máximo aceitável para a precisão e exatidão do método não pode ser superiores a 5% (ANVISA, 2017). Portanto, o método proposto pode ser considerado linear, preciso e exato.

3. REFERÊNCIAS

ANVISA. RESOLUÇÃO RDC No 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. **Diário Oficial da União**, v. 1, p. 87, 2017.

ANZILAGGO, Daiane. **Sistemas Liquissólidos Como Uma Abordagem Tecnológica Para Melhorar O Perfil De Dissolução Da Sinvastatina**. 2017.

CONVENTION, United States Pharmacopeial. **The United States Pharmacopeial**. 42. ed. 2019.

ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. 2005.