

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Hudson Caetano Polonini

Permeação transdérmica de formulações tópicas contendo hormônios sexuais e ecotoxicidade aquática de micro e nanopartículas de titanato de bário

Juiz de Fora

2014

Hudson Caetano Polonini

Permeação transdérmica de formulações tópicas contendo hormônios sexuais e ecotoxicidade aquática de micro e nanopartículas de titanato de bário

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Saúde.

Orientador: Dra. Nádya Rezende Barbosa Raposo
Co-orientador: Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão

Juiz de Fora
2014

Caetano Polonini, Hudson.

Avaliação da permeação transdérmica de formulações tópicas e ecotoxicidade aquática de micro e nanopartículas / Hudson Caetano Polonini. -- 2014.

193 p. : il.

Orientadora: Nádia Rezende Barbosa Raposo

Coorientador: Marcos Antônio Fernandes Brandão

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2014.

1. Permeação transdérmica. 2. Modulação Hormonal Bioidêntica. 3. Nanoecotoxicidade aquática. 4. Titanato de bário. I. Rezende Barbosa Raposo, Nádia, orient. II. Fernandes Brandão, Marcos Antônio, coorient. III. Título.

Hudson Caetano Polonini

Permeação transdérmica de formulações tópicas contendo hormônios sexuais e ecotoxicidade aquática de micro e nanopartículas de titanato de bário

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Saúde.

Aprovada em 16 de abril de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Marcene Augusto Leal de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Geraldo Sérgio Farinazzo Vitral
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Michele Munk Pereira
Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora

Dra. Roberta Brayner
Université Paris Diderot – Paris 7

Dedico todo este projeto às mesmas pessoas às quais dedico toda a minha vida, pois são a razão dela existir, e a razão de eu seguir em frente: meu pai, minha mãe, minha irmã, meu irmão – meu princípio, meu meio e meu fim.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos anos de trabalho que resultaram nesta tese, foram muitas as pessoas e instituições me ajudaram, ensinando e apoiando – e considero-me de muita sorte, por ter conhecido e compartilhado momentos com todos. Sozinho eu não teria chegado até o final, e é por isso que agradeço, a todos e a cada um, de maneira muito especial.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, por ter acolhido meu projeto e ter fornecido as condições acadêmicas necessárias à sua realização.

Ao programa Ciência sem Fronteiras e à rede Nanobiotec/Embrapa pela concessão das bolsas de estudos que permitiram minha dedicação ao desenvolvimento deste projeto.

À professora orientadora Dra. Nádia Raposo, pelo privilégio concedido a mim de conviver e aprender com alguém cuja dedicação, eficiência, objetividade e generosidade são exemplos e motivos de admiração desde sempre – e por tantos outros motivos que a fazem ser minha fada-madrinha.

À pessoa que iniciou na pesquisa, seja pública ou privada, e que me educou como aluno, profissional e ser humano, Dr. Marcos Antônio Brandão.

Também no âmbito de iniciadores na pesquisa, Urias Vaz foi o primeiro a acreditar em mim e me fazer criar a coragem necessária para encarar todos os desafios que viriam, e por isso tenho gratidão e amizade eternas.

Ao Dr. Humberto Brandão, por ter sido tão solícito e prestativo em meu projeto com nanotecnologia, abrindo portas tão essenciais para meu crescimento.

À Dra. Roberta Brayner, por ter aberto os braços em acolhida em seu laboratório e ter me supervisionado e orientado de maneira tão doce e amigável durante todo meu estágio na *Université de Paris*.

Aos membros do NUPICS, minha primeira morada científica e meu alicerce para tudo o que viria a partir de então. A Karla Gonçalves, por ser a companheira de bancada/amiga/psicóloga que eu amei desde a primeira vez que a vi; a Michele Campos, pelo astral sempre tão elevado e verdadeiro, mesmo nos finais de semana e mesmo eu sendo ranzinza tantas vezes; a Pedro Soldati, que pacientemente me acompanhou pela jornada que foi desenvolver toda a parte de permeação; a Natália, Priscila, Stephane, Alexandre, Rebeca, Thamiris, Romário, Annelise, Edilene, Francislene, Fernandas, César, Camila, Érika.

Aos membros da Ortofarma, parceira científica e sede da construção de muito do meu conhecimento atual a respeito de muita coisa. A Shirley, Livia, Roberta, Juliana, Luís Cláudio, Rosana, Thalita, Gilson, Alex... À direção da mesma, na figura do MSc. Anderson

Oliveira, ao qual eu agradeço pela confiança depositada, pelos ensinamentos gerados, pela criatividade e genialidade cativantes. À equipe da Validação/HPLC, por ter me suportado com minhas urgências e meus trabalhos extras gerados. Ao Adelino, sempre tão prestativo na realização de muito trabalho com pouca matéria-prima. E aos meus amores Sharlene, Jacqueline, Larissa e Annelise, tão especiais e essenciais em minha vida.

Aos membros do laboratório ITODYS, por terem me auxiliado nos experimentos e por terem me proporcionado momentos tão agradáveis. Num primeiro momento, Alice da Rocha e Michele Munk foram essenciais ao meu treinamento e ambientação ao ambiente, idioma e pessoas tão singulares – além de esta última ter sido responsáveis por vários momentos mais que especiais em minha vida além-mar. Após, a Ludovic Mouton, que me aguentou e me tolerou com todas as toneladas (não literais) de material para microscopia. Por fim, a Marine, Nâdâ, Marion, Jennifer, Jonathan, Thomas... *Merci a tous!* E um lugarzinho especial no meu coração para a *chouchou* Cecilia Spedalieri, que me cativou e injetou ânimo e vida ao meu último mês no laboratório, através de nossas conversas musicais e nossos passeios gelados.

Aos amigos e familiares de Cachoeiro de Itapemirim, minha terra natal. Citar somente alguns seria desmerecer os demais, e citar todos seria escrever um capítulo inteiro.

Aos amigos que fiz na *Maison du Brésil*, principalmente a Felipe Cunha, companheiro de viagem e de todos os dias.

Aos três dos amigos que fiz em Paris que eu levo para a vida, onde quer que eu for: Stéphane, Gregory, Gregoire.

Aos professores parceiros que permitiram meu crescimento e meu desenvolvimento, sendo sempre tão prestativos e competentes: Marcone Oliveira, Adilson da Silva, Elizabeth Chicourel, Rita Vieira.

A Marcel, que possui o maior coração do mundo; a Leandro por tantas aventuras inesquecíveis e por junto ao Luciano manter minha felicidade basal e meu foco durante todo o período; a Natália, primeira amiga e primeiro amor pra vida toda de Juiz de Fora; a meu outro amor juizforano, Livia, apesar da crueldade que foi se mudar e me privar da sua cia e de nossas comilanças semanais; ao “Sir” Avner, tão doce e tão amigo; a Dimas, cuja generosidade e compreensão tanto me ajudam; a Tiago, pela nossa amizade singular – pelo cinema, pelos jogos, pelos livros.

Aos que provavelmente esqueci de nomear aqui: agradeço e peço desculpas pela falha.

E, sobretudo, a Deus, o centro da minha vida, que iluminou toda a minha longa caminhada e me carregou no colo quando me faltaram forças.

Muito obrigado a todos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”
Madre Teresa de Calcutá

“Ever tried. Ever failed. No matter.
Try again.
Fail again.
Fail better.”
Samuel Beckett

“There is an art, it says, or rather, a knack to flying.
The knack lies in learning how to throw yourself at the ground and miss.”
Douglas Adams

“Eu quase que nada sei. Mas desconfio de muita coisa.”
Guimarães Rosa

RESUMO

No capítulo primeiro, objetivou-se avaliar o desempenho de permeação do veículo transdérmico magistral Pentravan para sistemas de distribuição transdérmica contendo Progesterona (P), Estradiol (E2) e Estriol (E3), isoladamente ou em associação de E2 + E3 (Biest). Um modelo experimental de pele humana feminina excisada foi utilizado para prever a permeação e a retenção das substâncias ativas em todas as camadas da pele. Além disso, o processo de fabricação para as formulações foi avaliado quanto à uniformidade de conteúdo das emulsões. Os métodos analíticos *eco-friendly* desenvolvidos para quantificação de hormônios sexuais femininos em emulsões transdérmicas foram adequados aos objetivos, o que foi comprovado através da validação dos mesmos. A avaliação do processo de manipulação das emulsões revelou que as embalagens à vácuo atualmente utilizadas por farmácias magistrais foram adequadas ao uso, e a utilização de moinho de rolos desempenhou papel fundamental na uniformidade de conteúdo de E_{emuls} e Biest. As taxas de liberação *in vitro* dos fármacos a partir de suas formulações foram adequadamente altas, e todas as formulações seguiram cinética de pseudo-primeira ordem, típica de produtos semissólidos. O estudo de permeação *ex vivo* demonstrou que todas as formulações foram capazes de promover a absorção transdérmica dos hormônios em quantidades comparáveis às praticadas atualmente por produtos industrializados. No capítulo segundo, duas partículas de titanato de bário (BT), da ordem micrométrica e manométrica, foram avaliadas quanto ao seu impacto em ambientes aquáticos. Uma caracterização dos materiais foi realizada. A seguir, utilizou-se duas algas (*Chlorella vulgaris* e *Euglena gracilis*) e uma cianobactéria (*Anabaena flos-aquae*) como organismos-modelo para avaliação da toxicidade. Tanto BT MP (micropartícula) quanto BT NP (nanopartícula) se mostraram carregadas negativamente, facilmente agregáveis, com uma taxa de liberação de íons Ba^{2+} para os meios de cultura que não ultrapassa 1,5%. BT mostrou um efeito tóxico estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no crescimento e na viabilidade celular de *C. vulgaris* desde 1 ppm, o que parece ser mediado por um estresse oxidativo induzido pelas próprias partículas ou pelos íons Ba^{2+} liberados no meio de cultura. BT tem um efeito tóxico muito baixo no crescimento de *A. flos-aquae*, porém ambas partículas afetam a viabilidade celular desde a menor concentração testada, o que ocorre por efeito indireto das mesmas no estresse oxidativo das células. BT apresentou um efeito tóxico estatisticamente

significativo ($p < 0,05$) no crescimento e na viabilidade celular de *E. gracilis* desde 1 ppm, efeito relacionado à endocitose das partículas numa quantidade tal que levou a uma ruptura de suas membranas. BT induziu estresse em todos os organismos-teste, o que foi evidenciado pelo aumento na atividade da superóxido dismutase, pela diminuição da eficiência fotossintética e pela diminuição dos níveis intracelulares de ATP. O comportamento de BT em meios de cultura sintéticos e naturais são diferentes, sendo os efeitos tóxicos mais pronunciados quando o crescimento é dado em água do Rio Sena. O tamanho de BT parece não influenciar os efeitos produzidos sobre o crescimento dos micro-organismos – embora a inibição do crescimento tenha sido pronunciada com o nanomaterial.

Unitermos: Administração cutânea, Hormônios esteroides gonadais, Toxicologia.

ABSTRACT

In Chapter 1, we aimed to evaluate the performance of the transdermal permeation of Pentravan vehicle for transdermal delivery of compounded systems containing progesterone (P), estradiol (E2) and estriol (E3), alone or as a combination of E2 + E3 (Biest). An experimental model of female excised human skin was used to predict the permeation and the retention of the active substances in all skin layers. Moreover, the manufacturing process for formulations were evaluated for content uniformity of the emulsions. The eco-friendly methods developed for quantification of female sex hormones in transdermal emulsions were appropriate, which has been proven through validation studies. The evaluation of the compounding process for the emulsions showed that the vacuum packaging currently used by pharmacies are suitable for use, and the use of roll mill played a key role in the uniformity of content for E_{emuls} and Biest. The *in vitro* release rates of the drugs from their formulations were adequately high, and all formulations followed pseudo-first order kinetics, typical of semisolid product. The *ex vivo* permeation study showed that all the formulations were able to promote transdermal absorption of hormones comparable to those currently practiced by industrialized products. In chapter 2, two particles of barium titanate (BT), micro- and nanosized, were evaluated for their impact on aquatic environments. A detailed characterization of the materials was carried out. We used two algae (*Chlorella vulgaris* and *Euglena gracilis*) and a cyanobacterium (*Anabaena flos-aquae*) as model-organisms for assessing toxicity. Both BT MP (microparticle) and BT NP (nanoparticle) were negative, easily aggregated, with a release rate of Ba^{2+} ions to media that did not exceed 1.5%. BT has a statistically significant toxic effect on cell growth and viability of *C. vulgaris*, from 1 ppm, which appears to be mediated by oxidative stress induced by the particles themselves or by Ba^{2+} ions released into the culture medium. BT has a very low toxic effect on the growth of *A. flos-aquae*, but both particles affect cell viability since the lowest concentration tested, which occurs by indirect effect on the cells. BT has a statistically significant toxic effect on cell growth and viability of *E. gracilis*, from 1 ppm, related to the effect of endocytosed particles in such an amount that a rupture of their membranes was caused. BT was able to stress all test-organisms, which was evidenced by the increase in superoxide dismutase activity, decreased photosynthetic efficiency and the decreased intracellular ATP levels. The behavior of BT in means of synthetic and natural culture was different, and the most pronounced toxic effects occurred when growth was given in water from the River Seine. The size of BT did

not influence the effects on the growth of microorganisms - although growth inhibition has been more pronounced with the nanomaterial.

Keywords: Transdermal permeation, Sex hormones, Aquatic nanoecotoxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Camadas da pele	31
Figura 2 – Rotas de penetração de fármacos pela via transdérmica	35
Figura 3 – Desenho esquemático de célula de difusão vertical	45
Figura 4 – Cromatogramas obtidos utilizando-se os métodos desenvolvidos para quantificação dos hormônios em emulsões transdérmicas, evidenciando sua especificidade	68
Figura 5 – Sumário dos resultados de permeação e retenção cutânea de hormônios sexuais femininos transdérmicos	84
Gráfico 1 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> de hormônios sexuais femininos a partir de emulsões transdérmicas	77
Gráfico 2 – Perfis de permeação <i>ex vivo</i> de hormônios sexuais femininos a partir de emulsões transdérmicas	80

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Escala nanométrica dos materiais	107
Figura 2 – Diagrama esquemático das principais formas de nanomateriais	107
Figura 3 – Possíveis rotas de exposição para nanomateriais	110
Figura 4 – Interação de nanomateriais com células: alvos intracelulares e mecanismos nanotoxicológicos	111
Figura 5 – Estados e configurações que os nanomateriais podem assumir quando secos ou em dispersão líquidas	112
Figura 6 – Estrutura cúbica da perovskita titanato de bário	113
Figura 7 – Exemplo de cadeia alimentar de ecossistema aquático constituída por representantes de três níveis tróficos	118
Figura 8 – Difrátogramas de titanato de bário (A) micro e (B) nano	134
Figura 9 – Imagens de microscopia eletrônica de titanato de bário	134
Figura 10 – Isotermas de adsorção-dessorção de titanato de bário	135
Figura 11 – Potencial zeta de (A) BT MP em BB, (B) BT MP em MM, (C) BT MP em ARS, (D) BT NP em BB, (E) BT NP em MM e (F) BT NP em ARS	136

Figura 12 – Tamanho hidrodinâmico de A) BT MP em BB, (B) BT MP em MM, (C) BT MP em ARS, (D) BT NP em BB, (E) BT NP em MM e (F) BT NP em ARS	139
Figura 13 – Perfil de dissolução de pós de titanato de bário em termos de Ba ²⁺ lixiviado da superfície em função do tempo	140
Figura 14 – Difractogramas de resíduos de titanato de bário após 96 h em contato com BB, MM ou ARS e comparação com pós intactos	141
Figura 15 – Microscopias ópticas de <i>C. vulgaris</i> , <i>A. flos-aquae</i> e <i>E. gracilis</i>	143
Figura 16 – Contagem celular de <i>C. vulgaris</i> em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário	144
Figura 17 – Contagem celular de <i>A. flos-aquae</i> em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário	145
Figura 18 – Contagem celular de <i>E. gracilis</i> em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário	147
Figura 19 – Viabilidade celular em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário	148
Figura 20 – Micrografias por MEV e MET de <i>C. vulgaris</i> expostas a titanato de bário	150
Figura 21 – Micrografias por MEV e MET de <i>A. flos-aquae</i> expostas a titanato de bário	151
Figura 22 – Micrografias por MEV e MET de <i>E. gracilis</i> expostas a titanato de bário...	152
Figura 23 – Efeito de titanato de bário na agregação (tamanho hidrodinâmico) e carga de superfície (potencial Zeta) de <i>C. vulgaris</i> , <i>A. flos-aquae</i> e <i>E. gracilis</i> em função do tempo de exposição	154
Figura 24 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) de <i>C. vulgaris</i> , <i>A. flos-aquae</i> e <i>E. gracilis</i> em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário	156
Figura 25 – Eficiência fotossintética de <i>C. vulgaris</i> , <i>A. flos-aquae</i> e <i>E. gracilis</i> em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário	158
Figura 26 – Conteúdo intra-celular de ATP de <i>C. vulgaris</i> , <i>A. flos-aquae</i> e <i>E. gracilis</i> em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário.....	159

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Lista comparativa entre hormônios bioidênticos e não bioidênticos	24
Tabela 2 – Composição das emulsões transdérmicas contendo hormônios sexuais femininos	50
Tabela 3 – Fatores e níveis do planejamento composto central 2^3 para otimização dos métodos cromatográficos	51
Tabela 4 – Fatores e níveis do planejamento experimental 2^3 para estudo da robustez dos métodos	54
Tabela 5 – Composição dos meios receptores biorelevantes utilizados para estudos de permeação e liberação da droga	58
Tabela 6 – Planejamento composto central 2^3 para otimização do método analítico para emulsões transdérmicas contendo hormônios sexuais femininos	66
Tabela 7 – Condições cromatográficas definidas para cada emulsão contendo hormônios sexuais femininos	67
Tabela 8 – Resultados do estudo da especificidade dos métodos para quantificação de hormônios	67
Tabela 9 – Resultados do estudo de linearidade dos métodos para quantificação de hormônios	69
Tabela 10 – Resultados dos estudos de precisão e exatidão dos métodos para quantificação de hormônios	70
Tabela 11 – Fatores, níveis, coeficientes de contraste do planejamento experimental para o estudo da robustez e seus respectivos efeitos calculados	71
Tabela 12 – Resultados da avaliação da dose dispensada por embalagens para emulsões transdérmicas	73
Tabela 13 – Uniformidade de Conteúdo das emulsões transdérmicas contendo hormônios, embaladas na Embalagem 1	73
Tabela 14 – Resultados da solubilidade máxima dos hormônios nos meios receptores ..	74
Tabela 15 – Resultados do estudo de linearidade para emulsões diluídas em meio receptor	75
Tabela 16 – Modelos matemáticos para avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> de hormônios sexuais femininos a partir de emulsões transdérmicas	78

Tabela 17 – Modelos matemáticos para avaliação da cinética de permeação <i>ex vivo</i> de hormônios sexuais femininos a partir de emulsões transdérmicas	81
Tabela 18 – Balanço de massas da do estudo de permeação transdérmica de emulsões contendo hormônios sexuais	85

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Caracterização físico-química do Rio Sena	117
Tabela 2 – Composição do meio de cultura <i>Bold's Basal</i>	124
Tabela 3 – Composição do meio de cultura Mineral	125
Tabela 4 – Fatores e níveis do planejamento experimental misto 5 ² para avaliação do estado de agregação e da carga de superfície de suspensões aquosas de titanato de bário	127
Tabela 5 – Resultados da análise de espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) de resíduos de titanato de bário após 96 h em contato com BB, MM ou ARS	142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARS	Água do Rio Sena
ASB	Albumina Sérica Bovina
BB	<i>Bold's Basal</i>
Biest	Emulsão biestrogênio (estradiol + estriol)
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BT	Titanato de bário
cel.	Célula
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento dinâmico de luz)
DRX	Difração de raios-X
E2	Estradiol
E3	Estriol
EC	Etrato Córneo
E _{emuls}	Emulsão de estradiol
ELS	<i>Electrophoretic light scattering</i> (Espalhamento eletroforético de luz)
EPS	Exopolissacarídeo
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FCS	Fluido Corporal Simulado
FSII	Fotossistema II
HPCD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
ICP-OES	Plasma indutivamente acoplado a espectrometria de emissão óptica (tradução)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IPD	Índice de polidispersão
J_s	Fluxo em estado estacionário
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
T_L	Tempo de Latência
M	Molar
MeOH	Metanol
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MH	Modulação Hormonal
MM	Meio Mineral
NT	Nível trófico
P	Progesterona
P_{emuls}	Emulsão de progesterona
PAM	Fluorometria de amplitude de pulso modulado
PCC	Planejamento Composto Central
PPi	Pirofosfato inorgânico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
SHA	Suor Humano Artificial
SOD	Superóxido dismutase
TFS	Tampão fosfato-salino
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
t_R	Tempo de retenção
UAV	Ultra-alto vácuo
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
XO	Xantina oxidase
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (tradução)
ζ	Potencial Zeta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 MODULAÇÃO HORMONAL NA MULHER	21
2.1.1 Síndrome climatérica.....	21
2.1.2 Modulação Hormonal Bioidêntica Feminina	23
2.1.3 Formas farmacêuticas utilizadas na MHB.....	28
2.2 VIA TRANSDÉRMICA	30
2.2.1 Estrutura da pele	31
2.2.2 Vias de penetração de drogas	34
2.2.3 Fatores limitantes da penetração.....	36
2.2.4 Métodos químicos para otimização da permeação	38
2.2.5 Métodos físicos para otimização da permeação	40
2.2.6 Avaliação da performance de produtos transdérmicos.....	42
3 HIPÓTESE.....	47
4 OBJETIVOS	48
4.1 Geral	48
4.2 Específicos	48
5 MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1 REAGENTES E MATERIAIS.....	49
5.2 EMULSÕES TRANSDÉRMICAS	49
5.3 DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS POR CLAE.....	50
5.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS POR CLAE.....	51
5.4.1 Especificidade.....	52
5.4.2 Linearidade	52
5.4.3 Limites de Detecção e Quantificação	53
5.4.4 Precisão.....	53
5.4.5 Exatidão	53
5.4.6 Robustez	54
5.5 OTIMIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	56
5.6 SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E DE PERMEAÇÃO	57
5.7 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO IN VITRO	57
5.8 PELE HUMANA PARA PERMEAÇÃO EX VIVO	59
5.9 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO EX VIVO	60
5.10 RETENÇÃO DA DROGA NA PELE	61
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1 DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS POR CLAE.....	63
6.2 VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS POR CLAE.....	65

6.3 OTIMIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	70
6.4 SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E DE PERMEAÇÃO	74
6.5 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO IN VITRO	76
6.6 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO EX VIVO.....	79
6.7 RETENÇÃO DA DROGA NA PELE	82
6.8 DISCUSSÃO COMPLEMENTAR.....	85
7 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS	89

CAPÍTULO 2

1 INTRODUÇÃO	104
2 REVISÃO DA LITERATURA	106
2.1 NANOTECNOLOGIA.....	106
2.1.1 Conceitos	106
2.1.3 Aplicações potenciais	108
2.1.3 Exposição humana aos nanomateriais	109
2.1.4 Caracterização de nanomateriais para estudos toxicológicos.....	110
2.2 TITANATO DE BÁRIO	113
2.3 NANOECOTOXICOLOGIA	114
2.3.1 Nanoecotoxicologia aquática.....	116
2.3.2 Organismos-teste utilizados.....	119
3 HIPÓTESE.....	121
4 OBJETIVOS	122
4.1 Geral	122
4.2 Específicos	122
5 MATERIAL E MÉTODOS	123
5.1 REAGENTES E MATERIAIS.....	123
5.2 MEIOS DE CULTURA	123
5.3 ORGANISMOS-TESTE	125
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	126
5.4.1 Difração de raios-X	126
5.4.2 Observações morfológicas: composição, tamanho e forma	126
5.4.3 Área de superfície.....	127
5.4.4 Estado de dispersão e carga de superfície	127
5.4.5 Dissolução e análise química da superfície	128
5.5 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE.....	129
5.6 AVALIAÇÃO DOS FATORES LIGADOS À TOXICIDADE	129
5.6.1 Observação microscópica	129
5.6.2 Agregação e carga de superfície dos organismos.....	130
5.6.3 Estresse oxidativo.....	130
5.6.4 Eficiência fotossintética.....	131
5.8 Atividade mitocondrial	131
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	132

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	133
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	133
5.2 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE.....	142
5.3 AVALIAÇÃO DOS FATORES LIGADOS À TOXICIDADE	149
6 CONCLUSÃO.....	161
REFERÊNCIAS	162
APÊNDICE A – Produção Bibliográfica.....	170
APÊNDICE B – Resumos Publicados em Anais de Eventos	191
APÊNDICE C – Trabalhos Apresentados	192

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO TRANSDÉRMICA DE FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO HORMÔNIOS SEXUAIS

1 INTRODUÇÃO

A administração transdérmica de fármacos em formas farmacêuticas semi-sólidas é já há alguns anos uma opção terapêutica bem definida e de eficácia comprovada (BIRUSS; KÄHLIG; VALENTA, 2007). Suas vantagens incluem: (i) eliminação do metabolismo de primeira passagem no fígado após a ingestão, e metabolismo também relativamente baixo na pele; (ii) prevenção de pico e vales dos níveis séricos e capacidade de absorção gradual e constante; (iii) regime de doses menos frequentes (liberação sustentada); (iv) aumento da adesão do paciente, por ser não invasiva; e (v) facilidade de interrupção terapêutica em caso de efeitos adversos (PRAUSNITZ; LANGER, 2008; SONI; KUMAR; GUPTA, 2009; GUY, 2010; HEATHOUT *et al.*, 2010).

No entanto, apesar da atenção que a pele tem ganhado enquanto via terapêutica, apenas um pequeno número de fármacos são bons candidatos para a administração transdérmica, devido à baixa permeabilidade da camada mais externa da pele, o estrato córneo (EC) (PEREIRA *et al.*, 2002). Entre as drogas que são adequadas para esta forma farmacêutica estão os esteróides sexuais humanos, que são comumente usados como hormônios para a terapia de substituição para os sintomas do climatério ou hipogonadismo (GOODMAN, 2012). Estes medicamentos incluem progesterona (P), 17- β -estradiol (E2) e estriol (E3). Eles são bons candidatos para a via transdérmica pelas suas propriedades físico-químicas particularmente adequadas para a difusão através da pele humana, em particular o seu baixo peso molecular ($P = 314,46 \text{ g mol}^{-1}$, $E2 = 272,38 \text{ g mol}^{-1}$, $E3 = 288,38 \text{ g mol}^{-1}$) e a sua lipofilicidade adequada ($\log P_o/w = 3,87$ para P, 4,02 para E2 e 2,45 para a E3) (POLONINI *et al.*, 2014).

Por outro lado, um desafio para as formulações semi-sólidas é que elas têm geralmente de ser aplicadas em grandes áreas de superfície cutânea, para atingir a circulação sistêmica em quantidade suficiente para exercer as suas atividades biológicas (HEATHOUT *et al.*, 2010). Portanto, o uso de veículos transdérmicos novos que são mais eficientes em termos de absorção percutânea é altamente recomendável. Neste trabalho, um veículo amplamente utilizado por farmácias magistrais foi avaliado, já que há escassez de estudos sobre o mesmo.

Como não há estudo anterior que relate o desempenho de permeação de hormônios sexuais femininos em emulsões transdérmicas magistrais, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o desempenho de permeação do veículo magistral Pentravan para sistemas de distribuição transdérmica contendo P, E2 e E3, isoladamente ou em associação de E2 + E3,

a qual é conhecida como biestrogênio ou Biest (de amplo uso em clínica médica para a terapêutica dos sintomas da menopausa) (SOOD *et al.*, 2013).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MODULAÇÃO HORMONAL NA MULHER

2.1.1 Síndrome climatérica

A partir dos 35 anos de idade, a fertilidade feminina diminui paulatinamente. Em primeira análise, isto ocorre devido à progressiva diminuição da atividade ovariana, uma vez que esta é a glândula responsável pela secreção dos hormônios sexuais, em especial o estradiol, a estrona e o estriol (PEREIRA, 2004; ZAHAR *et al.*, 2005).

Nesse período, o ciclo menstrual pode começar a sofrer irregularidades, devido a variações abruptas nos níveis desses estrogênios, desde picos acima dos valores fisiológicos até a sua quase nulidade. Essa alternância nos níveis estrogênicos é o que gera os sinais e sintomas comuns observados nos quadros clínicos de pacientes nessa fase da vida: quando o estrogênio circulante se encontra aumentado, nota-se aumento de sensibilidade nas mamas acompanhada de inchaço e irritabilidade no local (DEEKS *et al.*, 2008; BUTSRIPOOM *et al.*, 2009); quando baixos, a mulher apresenta sintomas neurológicos como confusão, falta de concentração e dificuldade de memorização (JANOWSKY; CHAVEZ; ORWOLL, 2000; MORSE; RICE, 2005), secura vaginal (LEIBLUM *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2011) e fogachos, as ondas repentinas de calor pelo corpo (ENSRUD *et al.*, 2009; LERMER *et al.*, 2011; SAVARD *et al.*, 2011). Ao ocorrerem ciclos anovulatórios não haverá produção de progesterona, hormônio que normalmente contrabalança os efeitos estrogênicos e regulariza o ciclo. O efeito dessa deficiência progesterônica se reflete em meses sem sangramento vaginal e em outros com sangramento severo (DRUCKMANN, 2011; HARRIS; SCHLAFF, 2011; MAYBIN; CRITCHLEY, 2011). Outros sinais e sintomas surgem, em geral, devido às flutuações nos níveis de testosterona, hormônio importante também para as mulheres: perda acelerada de massa óssea (KULAK JUNIOR *et al.*, 2009), distúrbios psicológicos como perda de libido (NAPPI *et al.*, 2010; BASSON, 2010), insônia (BRUCE; RIMER, 2011) e modificação do perfil lipídico, como o aumento nas taxas de triglicérides e lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminuição nas de lipoproteína de alta densidade (HDL) (PEREIRA, 2004; D'ACAMPORA, 2004; LING; KOMESAROFF; SUDHIR, 2009; CORNOLDI *et al.*, 2010; RECKELHOFF; ROM, 2011).

O conjunto formado por todas estas mudanças biológicas constitui o que se chama de climatério, conceituado como a transição entre as fases reprodutiva e não-reprodutiva nas

mulheres, devido ao esgotamento dos folículos ovarianos e ao consequente declínio da produção de estrógenos – o que leva, ao final, à menopausa, compreendida como o ponto temporal em que se cessam completamente as menstruações (YASMIN; SULTANA; HABIB, 2007; PEET, 2009; PINES, 2009; WOODS, 2010).

A menopausa, por sua vez, é separada didaticamente em duas subfases: a peri e a pós-menopausa, além da menopausa propriamente dita. A perimenopausa é caracterizada pelo surgimento e continuidade de ciclos menstruais irregulares ou ciclos com propriedades diferentes das observadas durante a vida reprodutiva normal, apresentando uma duração de 5 a 10 anos anteriormente à menopausa (VERAS *et al.*, 2006).

Após a perimenopausa, tem-se a menopausa em si, a qual só pode ser definida com exatidão retrospectivamente, uma vez que ela compreende o ponto temporal após o qual a mulher fica por 12 meses sem ter nenhuma menstruação (BUEHLER, 2010). Nela, os níveis de hormônios estrogênicos se encontram tão baixos que não ocorre mais a preparação do útero para a gravidez, e conseqüentemente não há mais menstruações. Essa baixa hormonal constante se reflete na perpetuação dos sintomas anteriormente apresentados: aumento da frequência de fogachos, dificuldade de concentração e problemas com a memória, além da intensificação da secura vaginal, da perda de libido, da secura da pele, e da perda de humor e energia. Somando-se a isto, a perda de massa óssea nos primeiros cinco anos após a menopausa ocorre numa taxa nunca antes experimentada pela mulher (SANTORO, 2008; BRUCE; RYMER, 2009; DONATI *et al.*, 2009).

Cinco anos após a entrada na menopausa, tem-se o período conhecido como pós-menopausa, no qual o organismo se aclimata com os baixos níveis estrogênicos e os sintomas decorrentes e a perda óssea diminui, apesar de continuar a existir. Porém, outros problemas advindos da diminuição estrogênica permanecem, como o aumento das taxas de doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes e Alzheimer (EBELING; HAIKERWAL, 2007; PALACIOS *et al.*, 2009; KHOO *et al.*, 2010).

Com o objetivo de corrigir os transtornos da síndrome climatérica (conjunto de sinais e sintomas referidos anteriormente), utiliza-se na clínica médica a Terapia de Reposição Hormonal (TRH) ou Modulação Hormonal (MH), que consiste na administração exógena desses hormônios deficientes no organismo feminino, para se reestabelecer os níveis fisiológicos dos mesmos, tais quais existentes na juventude. Não há dados oficiais no Brasil a respeito da prevalência de mulheres no climatério, mas sabe-se que nos Estados Unidos da América (EUA) a estimativa é que em 2020 o número de mulheres nesta fase da vida seja de

46 milhões (LARIMORE, 2008), o que ratifica a relevância da MH para a mulher nesta fase da vida.

2.1.2 Modulação Hormonal Bioidêntica Feminina

Embora esteja disponível comercialmente há mais de seis décadas, a TRH ainda é um tema com algumas controvérsias, na medida em que estudos têm demonstrado a baixa segurança de seu uso em determinadas situações. Dois dentre os estudos mais importantes nessa área foram o *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) (CONTRERAS; PARRA, 2010) e o *Women's Health Initiative* (WHI) (ROUSSOW *et al.*, 2002), por terem sido estudos aleatorizados, multicêntricos com grandes duração e número de participantes.

Os pesquisadores do HERS concluíram que o tratamento com estrógenos equinos conjugados associados ao acetato de medroxiprogesterona, a associação mais consumida mundialmente à época, não reduzira a taxa global de doença coronariana, mas ao contrário, elevava as taxas de eventos tromboembólicos e de doenças renais (HULLEY *et al.*, 1998). Os resultados do WHI foram ainda mais alarmantes, o que levou a sua interrupção, devido à elevada taxa de risco de cânceres invasivos, principalmente o de mama, detectada entre as voluntárias do estudo que utilizavam o mesmo tratamento adotado no HERS, além do aumento do fator de risco para doença coronariana, infarto e eventos tromboembólicos (ROUSSOW *et al.*, 2002).

A partir destas publicações, seguiu-se uma onda de críticas à TRH e milhões de pacientes ao redor do mundo interromperam o tratamento e passaram a procurar alternativas eficazes e seguras aos fármacos tradicionalmente utilizados (SOOD *et al.*, 2011). A agência regulatória americana, *Food and Drug Administration* (FDA), indica que, em casos em que seja imprescindível seu uso, a terapia deve ser delimitada em cinco anos, após paciente e médico decidirem a adesão, a despeito de seus efeitos adversos (FDA, 2003).

Os hormônios bioidênticos têm assumido papel de destaque dentro deste cenário da MH, criando uma alternativa terapêutica conhecida como Modulação Hormonal Bioidência (MHB). Os hormônios bioidênticos possuem estrutura química igual à dos hormônios endógenos humanos. No caso dos hormônios sexuais, estes são obtidos a partir de síntese orgânica, por exemplo através da utilização da diosgenina isolada da raiz de *Dioscorea vilosa* L. (inhame selvagem mexicano ou yam mexicano). Esta substância é convertida em progesterona, a qual funciona como precursor para a síntese dos demais hormônios

bioidênticos, androgênios ou estrogênios (FRANCISCO, 2003; TAYLOR, 2001). As principais diferenças dos hormônios bioidênticos estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Lista comparativa entre hormônios bioidênticos e não bioidênticos.

<i>Hormônios bioidênticos</i>	<i>Hormônios não bioidênticos</i>
Estrutura química igual à dos hormônios naturais humanos	Estrutura química diferente à dos hormônios naturais humanos
Ligam-se aos receptores humanos de forma conhecida	Ligam-se aos receptores humanos de forma não completamente elucidada
Efeitos em outros tecidos são conhecidos	Efeitos em outros tecidos não são bem conhecidos
Não gera aumento dos fatores de coagulação (exceto estradiol por via oral)	Aumentam os fatores de coagulação
Benéficos ao coração	Menos benéficos ao coração
Doses individualizadas	Somente as doses comercializadas pelas indústrias farmacêuticas
Geralmente sintetizados a partir de yam mexicano	Normalmente sintetizados ou isolados de urina de éguas

Fonte: BUEHLER, 2010.

Os hormônios ditos bioidênticos não são, no entanto, um tema particularmente novo. Historicamente, tem-se o relato de mulheres idosas que consumiam a urina de mulheres jovens para preservar a juventude (SOOD *et al.*, 2011). Mesmo durante a realização do HERS e do WHI, estes hormônios já eram comercializados, tanto no âmbito das farmácias de manipulação quanto das grandes indústrias farmacêuticas. O fato de receberem menos destaque é devido, provavelmente, à impossibilidade de seu patenteamento pelas indústrias farmacêuticas – as quais optam pelo desenvolvimento de derivados sintéticos exclusivos.

Outro aspecto relevante referente à pequena utilização destas substâncias em detrimento das não bioidênticas é que as primeiras não são ativas por via oral, devido ao metabolismo hepático. Para contornar este problema, foram desenvolvidas as substâncias não bioidênticas. Porém, alterações radiculares nestas moléculas levam a um quadro de efeitos secundários de difícil previsão (LOOSE-MITCHEL; STANCEL, 2005).

Junto com a propagação da MHB, porém, muitos conceitos errados também foram disseminados por profissionais de saúde no afã de estabelecer no mercado, a começar pelo

próprio conceito de bioidentidade, já que bioidêntico e natural não são sinônimos. Os termos “sintético” e “natural” são relativos à fonte de obtenção dos hormônios, e não a sua natureza química. O termo “natural” se refere a produtos provenientes de plantas ou animais, ao invés de terem sido sintetizados em indústrias químicas. Dessa forma, é comum entre leigos a afirmação de que o yam mexicano possui estrógenos naturais, o que é uma inverdade (DWECK, 2006). O que ele possui é uma aglicona com estrutura similar, a diosgenina, que é empregada pela indústria farmacêutica como precursora de síntese para os estrogênios (YOON; KIM, 2008). Neste caso, portanto, pode-se dizer que o yam possui substâncias naturais com capacidade estrogênica, como também a soja possui suas isoflavonas (CEDERROTH; NEF, 2009; HOOPER *et al.*, 2009). Porém, estas moléculas não podem ser consideradas bioidênticas, pois não são encontradas em condições fisiológicas no organismo humano e nem são convertidas a hormônios propriamente ditos *in vivo* após a ingestão.

Outro mito se refere à divulgada ausência de efeitos adversos. Apesar de terem sabidamente um uso com perfil de segurança mais elevado, quando comparados às substâncias hormonais com estrutura química diferente dos hormônios endógenos, situações ou casos clínicos em que a dose não seja bem controlada (superdosagem) podem levar ao agravamento dos sinais e sintomas (SOOD *et al.*, 2011). Alguns efeitos adversos experimentados com a modulação estrogênica são, por exemplo, o aumento da sensibilidade da mama e o sangramento vaginal (BUEHLER, 2010). Mas cabe ressaltar que hormônios manipulados oferecem o mesmo grau de benefícios e riscos que os sintéticos, não podendo haver distinção entre a qualidade de ambos (UTIAN *et al.*, 2010).

Os níveis hormonais circulantes no paciente são usualmente quantificados no soro, mas há atualmente a alternativa de fazê-lo na saliva, a qual tem a vantagem de sua fácil coleta, de caráter não invasivo. A saliva possui composição similar a um ultrafiltrado plasmático e, portanto, os níveis salivares parecem ser indicadores dos níveis séricos de hormônios na forma livre, aptos a exercerem seus efeitos (WALKER, 2001). No sangue, os níveis medidos refletem tanto as moléculas livres quanto ligadas (MARDER; JOSHI; MANDEL, 1979; TAYLOR; TAYLOR, 2000). Contudo, um cuidado especial deve ser tomado, pois a concentração salivar de hormônios pode ser afetada por variáveis como o peso molecular de cada hormônio, sua lipossolubilidade e a taxa individual do fluxo salivar (VINING; MCGINLEY; SYMONS, 1983, VINING; MCGINLEY, 1987), além da escovação dos dentes, alimentação prévia, período do dia no qual foi realizada a coleta, entre outros (SOOD *et al.*, 2011).

Um aspecto relevante também é o ajuste da dose terapêutica pelo médico para que se atinjam níveis séricos compatíveis com a eficácia clínica comprovada. As análises laboratoriais, salivares ou séricas, são uma boa representação dos níveis hormonais circulantes na paciente. Porém, o médico deve ajustar a dose de fármaco prescrito a ser administrada através da combinação dos exames laboratoriais e da observação clínica, uma vez que duas pacientes com o mesmo nível hormonal podem apresentar efeitos biológicos diferentes (BOOTHBY; DOERING; KIPERSTOCK, 2004). Aliás, o FDA instrui que a dosagem dos hormônios repostos seja determinada com base, principalmente, na resposta sintomatológica da paciente (FDA, 2003).

As formulações de estrogênios podem ser produzidas individualmente (estradiol, estriol ou estrona) ou em associações, sendo dentre estas as mais conhecidas a “Biest” ou biestrogênio (estradiol + estriol, 20:80, m/m) e “Triest” ou triestrogênio (estradiol + estrona + estriol, 10:10:80, p/p/p). Estas proporções podem ser modificadas com base no perfil hormonal (salivar ou, principalmente, sérico) e nos sintomas apresentados (CIRIGLIANO, 2007; FRANCISCO, 2003).

Outro hormônio utilizado na MHB é a progesterona, que atua como adjuvante na melhoria da qualidade do sono (MONTPLAISIR *et al.*, 2001), e também possui efeitos calmante, elevador do humor (DE LIGNIERES, 1999) e diurético leve (BARRET-CONNOR *et al.*, 1997). Ela também não anula os efeitos benéficos dos estrogênios no perfil lipídico e dos níveis séricos de glicose (BARRET-CONNOR *et al.*, 1997), quando administrados concomitantemente, ao contrário do acetato de medroxiprogesterona. Além disso, o risco de desenvolvimento de câncer de mama ao se usar progesterona micronizada é menor do que o de outras progestinas (riscos relativos de 1,0 e 1,69, respectivamente) (FOURNIER; BERRINO; CLAVEL-CHAPELON, 2008).

Também há evidências de que a manutenção dos níveis fisiológicos de testosterona, tais quais encontrados durante a juventude, são desejáveis não somente para homens, mas também para mulheres, principalmente no que tange à manutenção da massa magra e da densidade óssea (BURGER *et al.*, 2000). Nas mulheres em idade fértil, cerca de 30% da testosterona é sintetizada nos ovários e o restante é derivado da transformação de precursores adrenais como a dehidroepiandrosterona (DHEA) e a androstenediona. Esses precursores, porém, também experimentam uma diminuição em seus níveis séricos com o avançar da idade e, após a menopausa, a produção ovariana corresponde a mais de 50% da produção total de testosterona. A queda de testosterona não é, portanto, abrupta como a de estradiol, mas gradativa, refletindo a diminuição da produção de DHEA.

Além destas substâncias mais utilizadas, a MHB abrange o uso de diversos outros hormônios ou precursores hormonais bioidênticos. Em relação a estas outras substâncias também importantes na MH citam-se, resumidamente:

- Hormônios tireoidianos: baixos níveis de hormônio estimulante da tireóide (TSH), liotironina (T3) e levotiroxina (T4) podem ser um problema de base que afeta o desempenho sexual e outros aspectos da vitalidade, pois estimulam e mantêm os processos metabólicos, como a modulação da síntese e degradação de proteínas e ácidos graxos em tecidos diversos (GERDES; IERVASI, 2010; LIFE, 2011; KOULOVRI *et al.*, 2011);

- Melatonina: derivado da serotonina, é produzida por vários tecidos como a glândula pineal, retina e trato gastrintestinal e está envolvida na percepção de tempo pelo organismo, já que sua produção é interrompida quando a retina capta a luz intensa (BUBENIK, 2008). Como seu ritmo de liberação sofre alterações deteriorativas com a idade, outros pulsos de liberação hormonais dependentes do ciclo circadiano também são afetados, contribuindo significativamente para o envelhecimento e o aumento da susceptibilidade a doenças (BUBENIK; KONTUREK, 2011). Outras funções atribuídas à melatonina que ratificam sua função no combate ao envelhecimento são: proteção do DNA e outras macromoléculas contra o dano causado por radicais livres (BENOT *et al.*, 1999) devido ao seu expressivo poder antioxidante (BUBENIK; KONTUREK, 2011). A melatonina também tem sido utilizada no tratamento de pacientes com insônia (CARDINALI *et al.*, 2012);

- DHEA: níveis baixos de DHEA estão ligados à diminuição da função sexual, da densidade óssea e da porcentagem de massa magra corporal (VILLAREAL; HOLLOSZY; KOHRT, 2000) e do desempenho cognitivo (DAVIS; PANJARI; STANCZYK, 2011). Essa substância tem seu declínio gradativo e lento desde a adolescência, o que parece estar associado aos declínios da função do sistema imune, da sensibilidade à insulina e dos níveis do fator de crescimento do tipo insulina-1 (IGF-1) (LABRIE, 2010; RITSNER, 2011).

- Hormônio do crescimento (GH): este é um hormônio polipeptídico produzido pela glândula pituitária no cérebro e, devido ao seu elevado peso molecular, não pode ser administrado pela via transdérmica passiva. Seus principais efeitos são: aumento de massa muscular, declínio de massa gorda e aumento da espessura da pele. Deve ser usado somente em casos de deficiência documentada e atestada, clínica e laboratorialmente (teste de intolerância à insulina, teste de estimulação do glucagon ou doseamento de IGF-1) (LIFE, 2011).

Historicamente, a via de administração mais comum de qualquer medicação é a via oral. Esta via é extremamente difundida por ser conveniente, uma vez que sua

administração é simples e rápida. Um outro fator que leva uma maior difusão da via oral é o fato de esta ser uma via clássica bastante estudada. Porém, a mesma apresenta problemas quando se tratam de hormônios sexuais, principalmente devido ao efeito de primeira passagem hepática. Os hormônios sexuais idênticos aos endógenos são, sem distinção, inativados no fígado (BUEHLER, 2010).

Isto posto, atualmente existem fármacos hormonais bioidênticos administrados por via transdérmica (adesivos, géis, cremes, pomadas), subcutânea (implantes ou injetáveis), endovenosa, sublingual, vaginal (emulsões ou óvulos) e mesmo oral (cápsulas ou comprimidos), tanto manipulados quanto industrializados (WEISENBACH, 2004; SITES, 2008; FILES; KO; PRUTHI, 2011). Portanto, considera-se a via oral uma forma inadequada para a MHB, sendo a via transdérmica a primeira escolha terapêutica.

2.1.3 Formas farmacêuticas utilizadas na MHB

Outro ponto importante, além do fato em si de se usar somente hormônio bioidêntico (forma não modificada), é a escolha da via de administração. Idealmente, a forma farmacêutica deve ser conveniente de se administrar, com tolerância e aceitação por parte do paciente e ser, na medida do possível, de baixo custo (BOULOUX, 2012).

Devido ao advento e à otimização de novas formas farmacêuticas, existem atualmente alternativas mais seguras e eficazes para a modulação hormonal em homens e mulheres que a necessitam. Dentre as novas formas farmacêuticas, destacam-se os géis e adesivos transdérmicos e as injeções de longa ação. Ambos são adequados para manter um platô constante de liberação de fármaco, capaz de mimetizar os níveis hormonais desejados e definidos pelo médico, de modo a alcançar as melhorias promovidas pela manutenção de níveis hormonais fisiológicos. Além disso, estas formas farmacêuticas aumentam a adesão do paciente à terapêutica, o que leva à melhoria crônica dos sinais e sintomas (GIAGULLI *et al.*, 2011). Ressalta-se, porém, que a escolha da forma farmacêutica deve ser resultado direto da resposta do paciente ao tratamento, uma vez que a mesma é influenciada por seu perfil (BOULOUX, 2012).

Dentre as outras formas farmacêuticas disponíveis, citam-se:

- *Implantes subcutâneos*: tem como desvantagem a necessidade de pequena incisão cirúrgica para implantá-los, sendo que sua retirada não é imediata, em caso de efeitos adversos severos (BOULOUX, 2012).

- *Formas farmacêuticas orais*: os hormônios tais quais secretados *in vivo* sofrem extensivamente metabolismo de primeira passagem hepática. No caso da testosterona, os derivados alquilados são ativos, mas hepatotóxicos (GIAGULLI *et al.*, 2011; HAMEED; BROTHWOOD; BOULOUX, 2003).

- *Injeções intramusculares*: utilizada por muitos anos, são de forma geral compostas por ésteres facilmente hidrolisáveis que liberam o hormônio na circulação logo após sua administração, porém sua farmacocinética é dependente do tamanho da cadeia carbônica destes ésteres (HAMEED; BROTHWOOD; BOULOUX, 2003). As injeções tradicionais levam a um pico plasmático em 72h após administração e duram entre 1 e 2 semanas, razão pela qual a adesão terapêutica é baixa (GIAGULLI *et al.*, 2011). Porém, moléculas mais recentes como o undecanoato de testosterona (1000 mg em veículo oleoso) propiciam um intervalo posológico de até 12 semanas sem flutuações nos níveis plasmáticos, sendo uma forma bem mais cômoda e segura (VON ECKARDSTEIN; NIESCHLAG, 2002).

- *Adesivos transdérmicos*: inicialmente desenvolvidos para aplicação de testosterona no escroto, o avanço da tecnologia farmacêutica permite que atualmente sejam aplicados em áreas menos incômodas como costas, braços e coxas. Usualmente contêm hormônios suficientes para manter um platô de absorção constante por 24h (SNYDER *et al.*, 2001). Têm a vantagem de serem uma forma farmacêutica de fácil administração e por isso seu uso está em expansão (CUNNINGHAM; TOMA, 2011).

- *Géis transdérmicos*: a aplicação diária de doses de 50-100mg de testosterona em gel transdérmico consegue proporcionar ao paciente níveis estáveis de testosterona, DHT e estradiol a partir do terceiro dia de uso contínuo (SWERDLOFF *et al.*, 2000). A aplicação de estrógenos por esta forma também é uma alternativa segura e eficaz para o controle dos sintomas do climatério (ARCHER *et al.*, 2012). Ao contrário do que prega o senso comum, 30 minutos após a aplicação, o produto não sai no banho (JOCKENHÖVEL, 2003) e nem é transferido para outrem por contato físico (ROLF *et al.*, 2002). Há algumas críticas em relação à constância da dose aplicada pelo paciente, porém atualmente já se dispõem de embalagens que dispensam quantidades controladas de géis e cremes, garantindo um tratamento feito com a quantidade exata de fármaco que o paciente necessita, de modo constante (CUNNINGHAM; TOMA, 2011).

- *Preparações sublinguais*: a administração de testosterona em base com hidroxilpropil- β -ciclodextrina (2,5-5,0 mg, três vezes ao dia) acarreta a liberação episódica de andrógenos em homens hipogonádicos. Sua absorção pela rota sublingual é rápida e não gera elevação substancial de DHT ou estrogênios (STUENKEL; DUDLEY; YEN, 1991).

- *Sistemas mucoadesivos*: apesar de ainda pouco inseridos na prática médica, estes sistemas podem se aderir à mucosa oral e liberar o fármaco de forma gradual e constante. Quando usados duas vezes ao dia, reestabelecem os níveis fisiológicos de testosterona de forma comparável aos géis e adesivos transdérmicos (DOBS *et al.*, 2004).

2.2 VIA TRANSDÉRMICA

A forma farmacêutica transdérmica pode ser compreendida como aquela em que se administra um medicamento topicamente e este, por sua vez, libera o fármaco que se difunde através das camadas da pele a uma velocidade controlada, atingindo a circulação sistêmica e se distribuindo pelos tecidos até alcançar seu sítio de ação (ABDOU; HANNA; MUHAMMAD, 2004). Compõem as formas farmacêuticas transdérmicas: adesivos, géis, pomadas, loções, cremes, géis-cremes, emplastos, unguentos e qualquer outra forma farmacêutica que permita que seu princípio ativo se permeie pelas camadas da pele, tanto para fins terapêuticos quanto cosméticos (ALLEVATO, 2007).

A tecnologia transdérmica ganhou força comercial na década de 70, quando começaram a se desenvolver polímeros que possibilitaram a confecção de sistemas eficazes na promoção da absorção de fármacos pela via cutânea. O desenvolvimento desta nova via ocorreu devido às limitações que as outras vias apresentavam, e cita-se como suas vantagens: não agressão do trato gastrointestinal ocasionada por certos fármacos; absorção a uma velocidade controlada, o que permite manter constantes os níveis plasmáticos dos princípios ativos com elevada potência; eliminação do efeito de primeira passagem hepático; aumento da adesão do paciente à terapêutica; utilização de substâncias que possuem um tempo de meia-vida muito curto; emprego de fármacos que exibem um baixo índice terapêutico; e interrupção do tratamento de forma imediata pela simples retirada do sistema da pele caso o paciente inicie a manifestação de efeitos adversos ou tóxicos (PRAUSNITZ; LANGER, 2008; SONI; KUMAR; GUPTA, 2009; GUY, 2010).

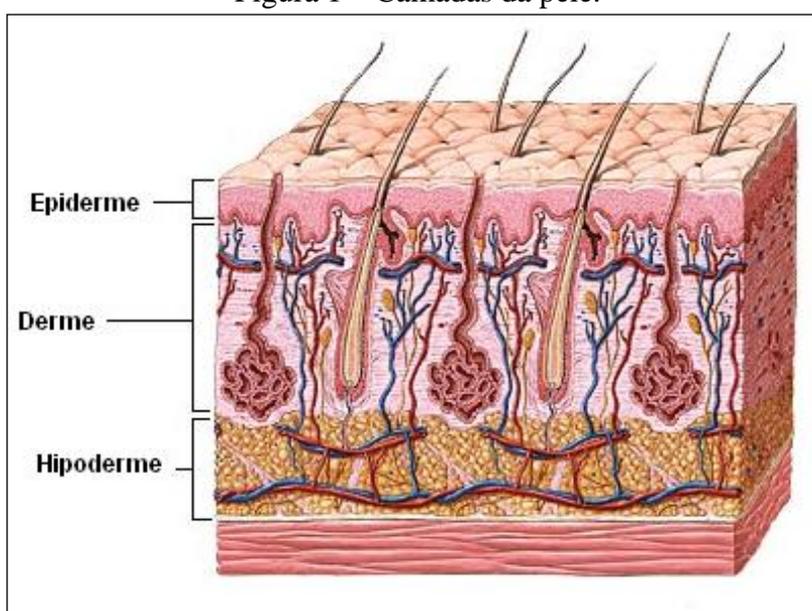
Há que se considerar, porém, algumas limitações destes sistemas: impossibilidade de administração de fármacos que requeiram altas doses (por exemplo, um adesivo mostra-se inadequado à medida que fica muito grande, tornando-se desconfortável para o paciente); dificuldade de previsão da fixação do sistema transdérmico (no caso de adesivos) e permeação do fármaco nos variados tipos de pele existentes; irritação da pele causada por algumas substâncias; e os preços ainda são relativamente elevados, quando comparados com formas mais usuais como as orais sólidas (BALL; SMITH, 2008; TANNER; MARKS, 2008).

Para que o medicamento provoque o efeito desejado, há a necessidade de que ele percorra um caminho tortuoso e de difícil transposição: primeiramente, o princípio ativo precisa se dissolver, ou seja, se dissociar dos demais componentes da formulação; após, deve se partilhar pela formulação até alcançar a superfície cutânea; difundir-se pelo estrato córneo, a camada mais superficial e mais resistente da pele; atravessar os estratos epidérmicos até chegar à derme; e, por fim, penetrar nos capilares sanguíneos ou difundir-se pelos tecidos subjacentes, de modo a ganhar a circulação sistêmica (VILLARINO; LANDONI, 2006). Para um maior entendimento, deve-se conhecer a fisiologia da pele.

2.2.1 Estrutura da pele

A pele recobre as superfícies corporais e constitui um dos maiores órgãos humanos, representando 16% do peso corporal. Ela tem estrutura complexa, sendo formada pela epiderme, de origem ectodérmica, e derme, de origem mesodérmica. Em contato com a derme encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo, que não faz parte da pele propriamente dita, apenas a une aos órgãos subjacentes. Complementando sua formação, há os pelos, unhas e glândulas, que são chamados de anexos (Figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 1 – Camadas da pele.



Fonte: SHETH, 2014.

As funções desempenhadas pela pele são múltiplas, sendo a principal a de proteção contra perda de água e contra o atrito. Ela também protege contra fatores ambientais,

como calor e frio, e microbiológicos; funciona como uma barreira seletiva para substâncias químicas; participa da termorregulação do organismo através de seus capilares sanguíneos, tecido adiposo e glândulas; colabora na excreção de substâncias pelo suor; protege contra os raios ultra-violeta, devido à melanina produzida localmente; aliada à radiação solar, transforma precursores sintetizados no organismo em vitamina D₃; e envia informações sensoriais sobre o ambiente para o sistema nervoso central (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; BARRY, 2001; VILLARINO; LANDONI, 2006).

2.2.1.1 *Epiderme*

A epiderme é a camada mais externa da pele e é constituída histologicamente por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. As células que a compõem podem ser divididas em corneócitos, também chamados de queratinócitos, e não-corneócitos. Os não-corneócitos são: os melanócitos, que produzem o pigmento melanina, que dá cor à pele; as células de Langerhans, que fazem parte do sistema imunológico na função de células apresentadoras de antígenos, tendo papel relevante nas reações imunológicas locais, além de conterem a proliferação dos corneócitos; e as células de Merkel, que funcionam como nociceptores, sendo responsáveis pelo tato e pela transmissão de impulsos nervosos de dor através de sua ligação com fibras nervosas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; VILLARINO; LANDONI, 2006).

Os corneócitos, por sua vez, são células achatadas, mortas, sem núcleo e que possuem citoplasma rico em queratina, que é uma proteína do filamento intermediário e amorfa que confere à epiderme sua grande resistência e impermeabilidade. De fato, eles são assim chamados porque são células que se diferenciaram com a função única de sintetizar queratina. Eles são as principais células da chamada camada córnea, ou mais comumente EC (ALBERTS *et al.*, 2004).

O EC é considerado como a principal barreira para a passagem de substâncias químicas para o interior do organismo, incluindo os fármacos. Um modelo proposto para elucidar sua estrutura é chamado de “modelo dos tijolos e cimento”, pois histologicamente esta camada assemelha-se a um muro. Neste modelo, os tijolos seriam os corneócitos e o cimento seria a chamada bicamada lipídica intercelular, que é composta por ceramidas, ácidos graxos, colesterol e ésteres de colesterol. Além desta bicamada, há ainda os corneodesmossomos, que unem os corneócitos e proporcionam estabilidade estrutural. Isto confere enorme força de coesão à estrutura, o que inviabiliza que a maior parte das moléculas,

independentemente de seu tipo, a atravesse (BARRY, 2001; PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004; VILLARINO; LANDONI, 2006).

Esta camada constitui o principal empecilho para a penetração efetiva de fármacos pela via transdérmica, visto que a tortuosidade de suas células e sua adesão são obstáculos de difícil transposição. Além disso, este é um estrato que é continuamente renovado, visto que há grande quantidade de células-tronco epiteliais na chamada camada basal da epiderme, que provê queratinócitos substitutos num período de duas a quatro semanas (ALBERTS, 2004; PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004; VILLARINO; LANDONI, 2006).

2.2.1.2 Derme

A derme é composta de tecido conjuntivo e serve de apoio para a epiderme, servindo como elo de união entre esta e o tecido subcutâneo, ou hipoderme. Ela é ricamente vascularizada e inervada e possui grande quantidade de vasos linfáticos. Além destas estruturas, é na derme que se encontram os folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, apesar de estes serem considerados anexos epidérmicos, por terem a mesma origem embriológica (VILLARINO; LANDONI, 2006).

Os folículos pilosos são formados de uma invaginação da epiderme e são onde se inserem os pêlos, que se projetam para a superfície externa do corpo. As glândulas sebáceas são glândulas holócrinas, ou seja, a formação da secreção advém da morte de suas células constituintes. Elas têm ductos que desembocam nos folículos pilosos e secretam uma mistura de lipídeos que contém triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e ésteres de colesterol. Já as glândulas sudoríparas são merócrinas, ou seja, liberam grânulos sem perda de outro material celular, e secretam a parte aquosa do suor, que contém também sódio, potássio, cloreto, uréia, amônia, ácido úrico e uma ínfima parte de proteína. Os ductos destas glândulas desembocam na superfície da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Por proverem uma comunicação entre a derme e a superfície corporal, evitando a transposição do estrato córneo, estes três anexos são considerados como vias alternativas para a absorção de fármacos transdérmicos (BARRY, 2001; PRAUSNITZ, MITRAGOTRI e LANGER, 2004; VILLARINO; LANDONI, 2006).

2.2.1.3 Hipoderme

A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo e é responsável pela união entre a derme e os tecidos e órgãos subjacentes, ainda que de maneira pouco firme. Por isso mesmo, permite certo deslizamento entre a pele e as estruturas nas quais ela se apóia. Por ser rica em tecido adiposo, dependendo da região do corpo em que se encontra, fornece proteção contra o frio e choques mecânicos, além de modelar o corpo de acordo com a quantidade de gordura que possua (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

2.2.2 Vias de penetração de drogas

Como dito, para que o medicamento provoque o efeito desejado, há a necessidade de que ele percorra um caminho tortuoso e de difícil transposição: primeiramente, o princípio ativo precisa se dissociar dos demais componentes da formulação; após, deve partilhar-se pela formulação até alcançar a superfície cutânea; difundir-se pelo EC; atravessar os estratos epidérmicos até chegar à derme; e, por fim, penetrar nos capilares sanguíneos ou difundir-se pelos tecidos subjacentes, de modo a ganhar a circulação sistêmica (VILLARINO; LANDONI, 2006; DANIELS, 2014).

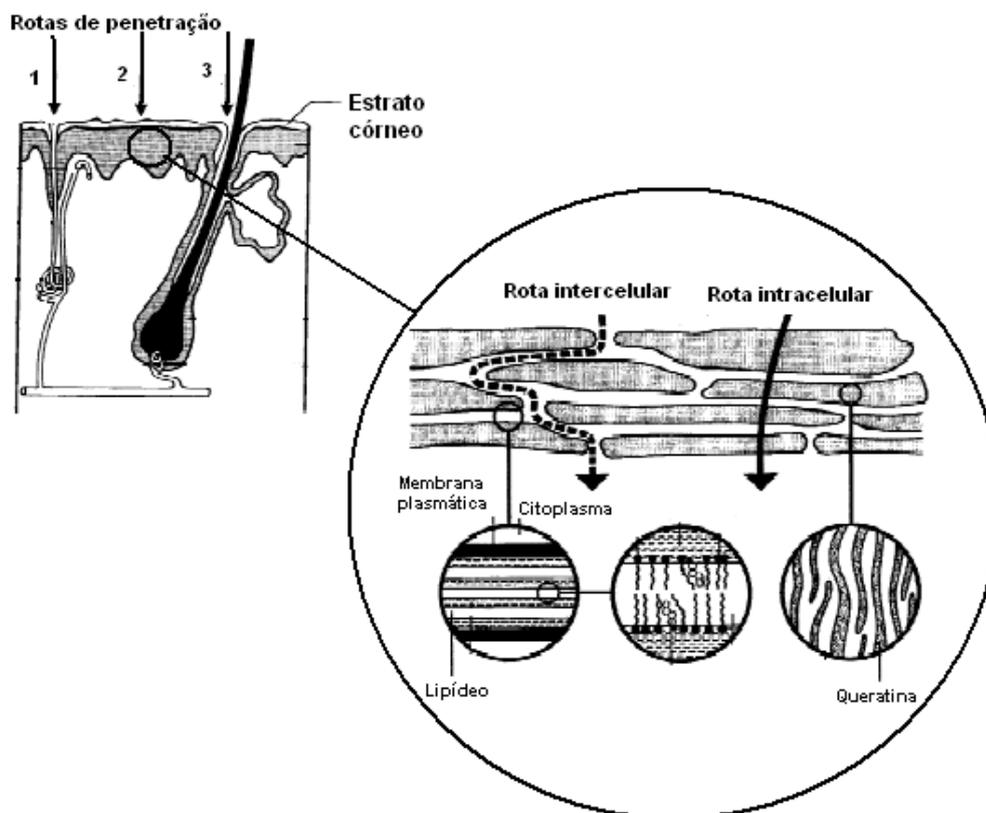
Em relação à velocidade do processo, há duas fases distintas: uma lenta transposição do EC e uma rápida difusão pelas camadas inferiores da epiderme e pela derme. Ademais, são consideradas três portas de entrada de substâncias transdérmicas como sendo as vias de penetração: as vias *intracelular*, *intercelular* e *anexial* (Figura 2). Considera-se que exista a via *mista* quando a substância utiliza mais de uma via para penetrar o organismo (VILLARINO; LANDONI, 2006).

A via intracelular constitui aquela na qual o fármaco se difunde célula a célula nas camadas da epiderme. O maior entrave a esta via é a camada córnea, que bloqueia a passagem da maioria das substâncias. Além disto, a queratina é hidrófila, o que diminui a possibilidade de absorção de substâncias apolares. Entretanto, como as células ocupam quase toda a área de superfície da pele, esta é a via mais importante, devendo-se recorrer a artifícios para que as moléculas transponham a barreira queratínica (RAMTEKE; DHOLE; PATIL, 2012).

Quando a molécula se difunde pelos espaços entre as células, como se seguisse por desvios, através do cimento celular, tem-se que a molécula está penetrando pela via intercelular. Porém, quando se considera a área total da pele, estes espaços somam apenas 1%

da superfície, diminuindo a probabilidade de absorção por esta via (BENSON; WATKINSON, 2011; HUZIL *et al.*, 2011).

Figura 2 – Rotas de penetração de fármacos pela via transdérmica.



- 1) através dos poros da pele; 2) através das células epiteliais; e 3) através dos folículos pilosos.
No detalhe, a possibilidade de se haver transporte intercelular e intracelular.
Adaptado de: BARRY (2001) e PRISTA (1996).

Outra possibilidade de rota de absorção é através dos anexos epidérmicos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas). Por esta via, podem penetrar fármacos de massa molecular mais elevada e íons, desde que tenham coeficiente de partição óleo/água adequado. Porém, a exemplo da via intercelular, a área para esta via é bastante reduzida, em torno de 0,1% do total epitelial. Além disso, há áreas mais ricas em anexos que outras, devendo-se considerar a área a se aplicar o medicamento quando se deseja absorção por esta rota (BARRY, 2001).

Apesar de uma maior concentração de folículos pilosos aumentar a probabilidade de absorção, os pelos podem funcionar como barreira física à passagem de substância. Regiões com grande densidade de pelos grossos apresentam baixo potencial de penetrabilidade (RIVIERE; PAPICH, 2001).

Para Meidan, Bonner e Michniak (2005), no entanto, o transporte transfolicular ainda deve ser melhor avaliado, devido à complexidade de fatores que modulam a natureza deste transporte. Como exemplo, cita-se o sebo sintetizado pelas glândulas sebáceas associadas ao pelo, do qual ainda não se sabe ao certo a magnitude da interação com os fármacos e se suas propriedades físico-químicas podem influir nesta rota de penetração.

2.2.3 Fatores limitantes da penetração

As propriedades físico-químicas dos fármacos determinam sua rota e grau de absorção, e dentre elas citam-se o pKa, o tamanho da molécula, sua estabilidade, a possibilidade de fazer ligações com componentes epidérmicos que encontre no caminho e o coeficiente de partição óleo/água. Sabe-se, por exemplo, que fármacos em sua forma não-iônica têm maior capacidade de permeação que os na forma dissociada. Desta afirmação, depreende-se que é necessário um caráter lipofílico maior que hidrofílico, embora moléculas anfipáticas sejam boas candidatas a serem permeadas prontamente (PRISTA *et al.*, 1996).

Moléculas de alto peso têm maior dificuldade em ser administradas por esta via. O tamanho ideal é discutível, tendo sido encontrado na literatura a indicação de que as substâncias devem ter um peso molecular menor que 400 Da (VILLARINO; LANDONI, 2006; ALLEVATO, 2007), 500 Da (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004) ou 600 Da (BARRY, 2001).

Outra condição que afeta diretamente a absorção se refere ao potencial termodinâmico do sistema. A condição ideal seria a de que o fármaco passasse de um sistema com maior potencial para um com potencial mais baixo, que, no caso, deve ser a pele. Este potencial, no medicamento, depende principalmente da *concentração ativa* do fármaco, que pode ser determinada multiplicando-se a concentração real pelo coeficiente de atividade da molécula no veículo utilizado. Portanto, o potencial pode ser controlado no momento da formulação (CASTENSSON, 2008).

O pH da formulação também interfere na permeabilidade. Isso porque, dependendo de seu valor, pode-se ter a ionização de ácidos e bases fracas, o que não é desejável uma vez que substâncias neutras apresentam maior facilidade de permeação (HAFGRAFT; VALENTA, 2000). Além do pH da formulação, o pH da pele (~6 em adultos) também interfere no grau de ionização do composto, ambos devendo ser levados em consideração (VILLARINO; LANDONI, 2006).

A pele é um tecido muito rico em enzimas, que podem metabolizar os fármacos durante seu percurso, já que catalisam reações tanto de fase I quanto de fase II. Isto pode ser considerado estrategicamente para se adicionar um pró-fármaco na formulação, de modo que este só se torne farmacologicamente ativo ao fazer sua travessia pela pele. Por outro lado, podem ocorrer reações não previstas que podem inativá-lo ou mudar sua ação pretendida (RAMACHANDRAN; FLEISHER, 2000).

Um fenômeno que merece atenção é o da acumulação das substâncias nos estratos epidérmicos. Isto ocorre com determinados fármacos que se acumulam no EC, formando complexos precipitados com a queratina, através da ligação desta molécula hidratada com grupos polares do fármaco. A partir destes reservatórios, parte do fármaco se libera e é absorvida lentamente. Este fenômeno pode ser perigoso, pois contraria uma das vantagens apontadas para estes sistemas, a de se poder retirar o sistema tão logo se notem efeitos indesejáveis (ŞENYIĞIT *et al.*, 2009).

Num processo em que não há formação de reservatórios de fármacos na camada córnea, a absorção do fármaco obedece às leis de difusão de Fick. Segundo a 1ª lei de Fick, a velocidade de difusão pode ser predita pela equação 1:

$$V = \frac{K \times P_C \times S \times dC}{dX} \quad (1)$$

na qual a velocidade de difusão (V) é diretamente proporcional ao coeficiente de difusão do fármaco em determinado veículo (K), ao coeficiente de partição entre a membrana e a formulação que contém a substância (P_C), à área de superfície da membrana (S) e à diferença de concentração do fármaco nos dois lados da membrana (dC) e inversamente proporcional à espessura da membrana (dX) (WU *et al.*, 2010).

Em algumas situações, o fármaco tem afinidade maior pela formulação do que pelo tecido cutâneo, sendo a absorção bastante lenta e não obedecendo às leis de Fick. Nestes casos, considera-se que a quantidade Q que atravessa a pele é proporcional à raiz quadrada do tempo (\sqrt{t}), seguindo o modelo cinético de Higuchi (KALIA; GUY, 2011).

Porém, os modelos matemáticos são ainda insuficientes para a absorção transdérmica, já que inúmeros outros fatores intrínsecos ao paciente e ao ambiente são responsáveis pelo processo de absorção. Dentre estes fatores, destacam-se a idade do paciente (a pele das crianças é a mais permeável, declinando a permeabilidade com a idade), a temperatura (ambientes quentes aumentam a circulação periférica, favorecendo a absorção), a

umidade relativa do ar (quanto maior a umidade, maior a permeabilidade), o sexo do paciente (a pele dos homens tem penetrabilidade diminuída quando comparada a das mulheres), a dieta seguida pelo paciente, o grau de hidratação cutânea, doenças de pele, a ingestão concomitante de medicamentos, o grau lipídico da pele, entre outros (SINGH; MORRIS, 2011).

As temperaturas do sistema transdérmico e da pele são fatores importantes para a permeação. Com o aumento da circulação periférica na região onde a formulação é aplicada, há a maior probabilidade de a molécula ser absorvida, pois os vasos subjacentes estarão dilatados e o fluxo sanguíneo incrementado. Além disso, a temperatura corporal tem ação sobre o grau de hidratação cutânea, que também influencia diretamente no fluxo de moléculas pela pele (AKOMEAH *et al.*, 2004).

2.2.4 Métodos químicos para otimização da permeação

2.2.4.1 Promotores químicos

Os promotores de absorção são substâncias adicionadas às formulações transdérmicas com o fim de aumentar o fluxo de fármaco através da pele, principalmente na camada córnea (BRAZIL, 2005; KARANDE *et al.*, 2005). Dentre as substâncias conhecidas que se utilizam para este fim, citam-se as mais importantes: água, hidrocarbonetos, sulfóxidos (principalmente dimetilsulfóxido - DMSO), ácidos graxos, amidas (como a ureia e seus derivados), óleos essenciais, terpenos e derivados, enzimas epidérmicas, azona e seus derivados, pirrolidonas, surfactantes, polióis, ésteres e álcoois (ASBILL; MICHNIAK, 2000; ASBILL *et al.*, 2000; BARRY, 2001; SINHA; KAUR, 2000).

O mecanismo de ação destas substâncias é bastante variável. O DMSO e o decilmetilsulfóxido, por exemplo, interagem com a queratina presente nos corneócitos e tornam sua estrutura mais frouxa, tornando a camada córnea mais permeável (KUMAR; JAIN; PRAJAPATI, 2011). Muitos solventes, por sua vez, alteram o ambiente químico do EC e alteram as características de solubilidade dos lipídeos, permitindo que uma segunda molécula se particione por ele mais facilmente, caso do propilenoglicol e do etanol (BARRY, 2001).

Várias destas substâncias, entretanto, podem causar irritação cutânea quando adicionadas em concentrações necessárias para exercer seu efeito de promoção da penetração (BRAZIL, 2005; KARANDE *et al.*, 2005; PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004). Desta forma, um promotor ideal é aquele que, além de promover a permeação de fármacos

através da pele, seja farmacologicamente inativo, atóxico e promova a hidratação da epiderme (BARRY, 2001).

Uma tendência futura é combinar múltiplos promotores em baixas concentrações, para um efeito sinérgico e uma redução dos efeitos tóxicos individuais (MITRAGOTRI, 2000; KARANDE; JAIN; MITRAGOTRI, 2004).

2.2.4.2 *Pró-fármacos*

Se o princípio ativo que se quer aplicar pela via transdérmica não apresentar as características físico-químicas ideais para tal forma farmacêutica, pode-se fazer o uso de pró-fármacos. Estas seriam substâncias farmacologicamente inativas derivadas do fármaco original, porém com mudanças em sua molécula que permitam seu transporte através das camadas epiteliais, otimizando a partição do fármaco. Após o processo de permeação, as enzimas ativariam o pró-fármaco através de reações que liberariam o fármaco original, convertendo-o em molécula ativa capaz de exercer o efeito desejado no organismo (BARRY, 2001).

2.2.4.3 *Pares iônicos*

Fármacos que consistem de moléculas carregadas eletronicamente não atravessam o EC prontamente. Uma estratégia que visa à permeação desses fármacos é a formação de pares iônicos através da adição de uma espécie carregada com carga contrária à do princípio ativo. O complexo neutro, sendo lipofílico, atravessaria o EC e se dissociaria nos tecidos mais profundos. Estudos práticos demonstram que o aumento da permeação é modesto, mas útil quando a adição de promotores químicos não é viável (MEGWA *et al.*, 2000; SMITH; IRWIN, 2000; ZHANG *et al.*, 2009).

2.2.4.4 *Sistemas eutéticos*

Alguns estudos sugerem que a utilização de misturas eutéticas nas formulações ocasionam aumento no fluxo do fármaco, como o de Kang *et al.* (2000), que mostrou que o sistema lidocaína-mentol se permeava através de pele de cobra, e o de Stott, Williams e Barry (2001), que investigou o aumento do fluxo de propranolol quando associado a ácidos graxos saturados ou poli-insaturados.

2.2.4.5 Lipossomas e análogos

Lipossomas são partículas líquidas que têm a capacidade de envolver moléculas farmacologicamente ativas e as liberar na pele. Contudo, nota-se que seu alcance é periférico e o efeito dos fármacos liberados é local, pois são partículas grandes para atravessar a epiderme intacta (TANNER; MARKS, 2008).

No entanto, pode-se adicionar aos lipossomas substâncias tensoativas, como o colato de sódio, que dão origem à partícula chamada de transfersoma. Estas vesículas são ultradeformáveis, podendo se esticar através de poros do EC e permear a epiderme. Para isto, é necessário que se trabalhe em condições não-oclusivas, pois os transfersomas atuam sob gradiente de hidratação: ao serem aplicados sob a pele, a água começa a evaporar e eles, então, seguem o fluxo da superfície seca da pele para os tecidos aquosos internos (ROTHER *et al.*, 2007; KULKARNI *et al.*, 2011).

Outras partículas lipossomais modificadas também podem ser usadas para melhorar o fluxo de moléculas pela pele. É o caso dos etossomas, lipossomas com alto conteúdo de etanol que liberam fármacos para regiões profundas da pele ou para ações sistêmicas, e dos niossomas, que utilizam tensoativos não-iônicos para formar vesículas (TOUITOU *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2010).

2.2.5 Métodos físicos para otimização da permeação

2.2.5.1 Iontoforese

Esta técnica utiliza um campo elétrico para movimentar moléculas carregadas e não-carregadas pelo corpo. Utilizando correntes da ordem de miliampéres, o sistema terapêutico possui um eletrodo, sendo o circuito completado por um outro eletrodo posicionado em outra região da pele. Desta forma, a corrente gerada impulsiona a molécula a penetrar a pele, sem causar dor ou irritação (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004; PIKAL, 2001).

Os possíveis mecanismos para o efeito alcançado são três: a força eletroforética, segundo a qual as moléculas carregadas são repelidas da forma farmacêutica pela interação direta da corrente gerada pelo eletrodo; a força eletrosmótica, que é responsável pelo transporte de moléculas não-carregadas e peptídeos maiores, que são “sugados” pelo fluxo de proteínas que se forma no organismo; e o aumento da permeabilidade cutânea gerada pela

voltagem aplicada, o que não é completamente compreendido (BARRY, 2001; PRAUSNITZ, MITRAGOTRI; LANGER, 2004; PIKAL, 2001).

2.2.5.2 Método Acústico (sonoforese)

Aliada à aplicação tópica do fármaco, via adesivo transdérmico ou outras formas farmacêuticas tópicas, pode-se fazer uso de um aparelho de ultrassom, pelo método conhecido como sonoforese. As ondas ultrassônicas de baixa frequência causam perturbações nos lipídeos das membranas celulares dos corneócitos. Assim, formam-se as microcavidades que ajudam no fluxo do fármaco para os estratos mais profundos da epiderme. Sua limitação está no fato de ser específico para uso em consultório médico, devido à necessidade de uma fonte de ultrassom (MITRAGOTRI; KOST, 2000; RAO; NANDA, 2009).

2.2.5.3 Eletropermeabilização

A aplicação de rápidos pulsos elétricos de, aproximadamente, $100-1000 \text{ V cm}^{-1}$ de pele leva à formação de microporos aquosos transitórios nas membranas das células epiteliais, o que consiste em atalhos para que os fármacos não precisem atravessar diretamente a camada córnea (WEAVER, 2000). Moléculas sintéticas e pequenas macromoléculas ($< 10 \text{ kDa}$) são particularmente promissoras para serem transportadas por este método, como evidenciado por Wallace *et al.* (2001).

2.2.5.4 Magnetoforese

Apesar de pouco estudados, há a probabilidade de que campos magnéticos estáticos consigam transportar materiais diamagnéticos através da pele (MURTHY, 1999), o que ocorre pela provável modulação do EC por estes campos magnéticos (KRISHNAN *et al.*, 2010; MURTHY; SAMMETA; BOWERS, 2010). Na prática, a formulação possui partículas de magnetita homogeneamente dispersas de modo a formar magnetolipossomas, os quais são dirigidos para o tecido alvo à medida em que as vesículas são repelidas pelo campo magnético gerado na superfície da pele (ARRUEBO *et al.*, 2007).

2.2.5.5 Sistema de microagulhas

Este método envolve o uso de agulhas, maciças ou ocas, em escala micrométrica. As microagulhas são geralmente dispostas em arranjos, sendo usadas de diversas formas a fim de potencializar o transporte transdérmico de substâncias através da formação de microporos na pele. No caso das microagulhas sólidas, os medicamentos ficam contidos em adesivos e podem ser absorvidos a nível local ou sistêmico, diferente das microagulhas ocas, com as quais é feita a injeção direta do fármaco na pele do paciente (ROXHED, 2007; WERMELING *et al.*, 2008).

Elas penetram a pele superficialmente e portanto não atingem estruturas nervosas e por isso não causam dor como na injeção hipodérmica, além de apresentarem como vantagens a possibilidade de produção em larga escala e o relativo baixo custo. Entretanto, podem apresentar taxa de infusão insuficiente, sendo necessários arranjos maiores para promover a correção, o que aumentaria o custo por unidade. Além disso, a interface entre a microagulha e o tecido, por ser extremamente flexível, poderia comprometer a eficiência da aplicação por promover microvazamentos. Este *déficit* é quase inexistente, porém, nas microagulhas de abertura lateral (ROXHED, 2007; WERMELING *et al.*, 2008).

2.2.6 Avaliação da performance de produtos transdérmicos

As formas farmacêuticas transdérmicas devem seguir um processo rigoroso de fabricação e seu produto acabado deve passar por testes que assegurem a uniformidade das doses e a liberação do fármaco no tempo esperado. Isso é importante porque esta é uma forma farmacêutica na qual a liberação do fármaco na pele é fruto de múltiplas variáveis, principalmente concernentes à formulação empregada, na qual pequenas mudanças podem mudar completamente o perfil de liberação do princípio ativo (AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007).

Segundo a *United States Pharmacopeia* (USP, 2014), os testes que podem ser executados para o controle de qualidade de produtos transdérmicos semi-sólidos são:

- Descrição: exame visual que identifique mudanças na coloração, separação de fases, cristalização, etc;
- Identificação: teste que estabeleça a identidade do fármaco presente no produto, como a espectroscopia de infravermelho;

- Doseamento: teste que determine o conteúdo de fármaco no produto, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou técnicas correlatas;
- Impurezas: determinação de impurezas de processo, subprodutos de síntese, impurezas associadas aos veículos da formulação, solventes residuais, metais pesados e outras impurezas orgânicas ou inorgânicas que possam estar presentes, utilizando métodos adequados a cada caso, como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS);
- Uniformidade de doses (UD): aplicado para adesivos transdérmicos e produtos semissólidos dispensados em doses individuais;
- Conteúdo de água: teste que deve ser avaliado caso-a-caso para determinar a necessidade de sua execução;
- Limites microbianos: determinação da contagem de micro-organismos aeróbios totais e da contagem de fungos e leveduras totais;
- Conteúdo de preservativos antimicrobianos: determinação da quantidade de agentes antimicrobianos adicionados a produtos de dispensação multi-dose;
- Conteúdo antioxidante: determinação da quantidade de antioxidantes adicionados a produtos de dispensação multi-dose;
- Esterilidade: a ser determinada em produtos para uso oftálmico ou produtos para queimaduras;
- pH: a ser determinado no momento de fabricação e em intervalos regulares de tempo, a fim de se monitorar a estabilidade da formulação;
- Tamanho de partícula: deve ser determinado primariamente para as matérias-primas utilizadas, mas também pode ser utilizada para verificar alterações durante o armazenamento do produto após manipulação (mudanças na forma, tamanho e estado de agregação);
- Viscosidade aparente: medida da resistência da formulação ao fluxo de escoamento, como medida das propriedades reológicas do produto;
- Uniformidade de conteúdo (UC): determinação da homogeneidade do produto contido em embalagens multi-dose.

Destes testes referidos, o presente estudo realizará os ensaios de Identificação, Uniformidade de Doses e Uniformidade de Conteúdo, testes essenciais para monitoramento do processo de manipulação adotado, já que o foco aqui é a avaliação da performance de permeação dos hormônios sexuais femininos aplicados topicamente.

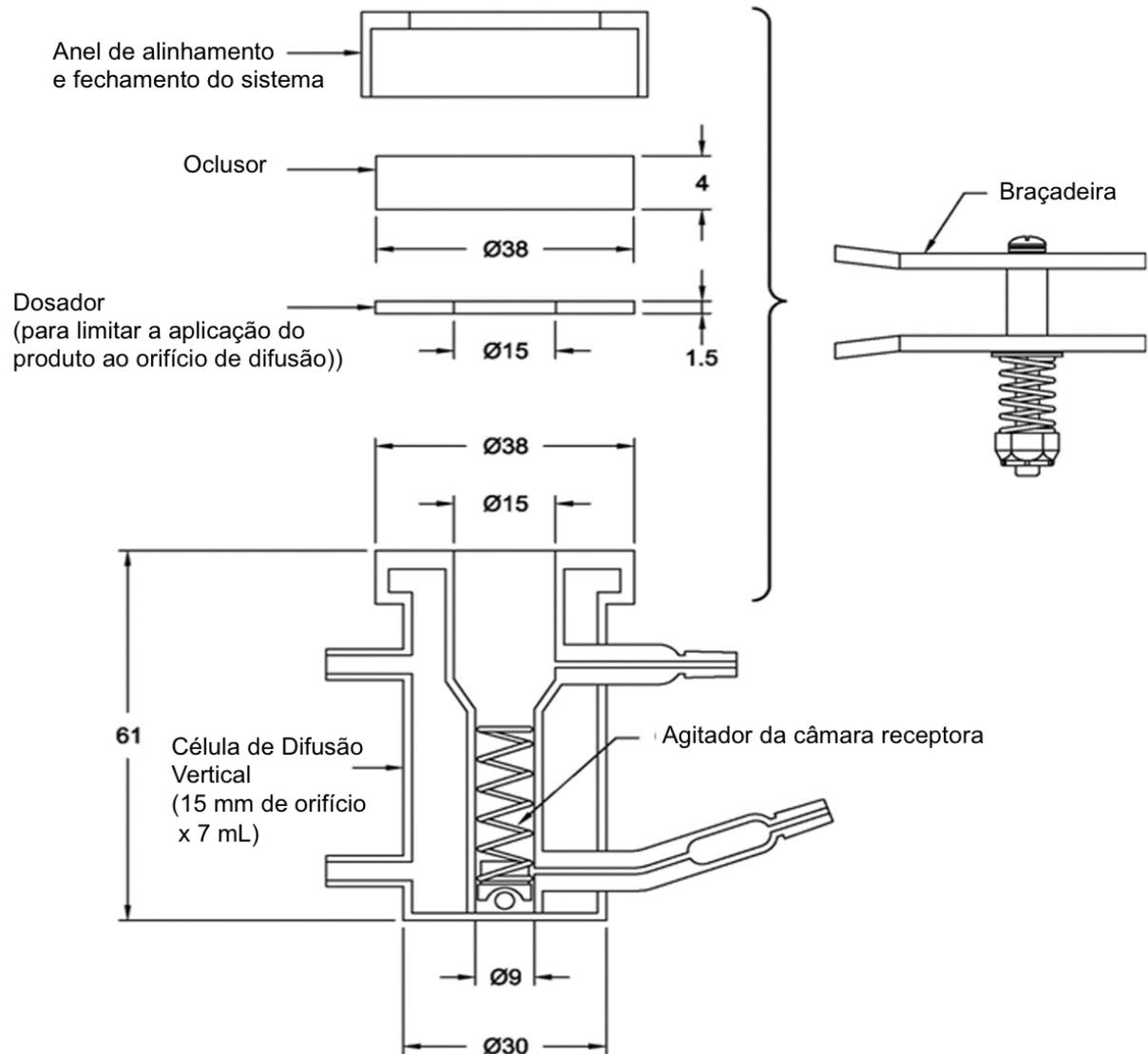
Neste contexto, há duas maneiras essenciais para se avaliar a performance de formulações transdérmicas. Primeiro, deve-se medir a dissolução do fármaco em seus veículos, para se liberar dos veículos semissólidos, sendo esta etapa conhecida como Teste de Liberação de Drogas (*Drug Release*, no original em inglês). Após, deve-se determinar a capacidade que o sistema transdérmico tem de permitir a difusão do princípio ativo pela pele, sendo este o Estudo de Permeação Transdérmica propriamente dito, também conhecido como teste de absorção percutânea.

O primeiro, de liberação, tornou-se a partir de 2012 um teste farmacopeico, na USP (2014). Ele é um teste *in vitro* capaz de medir a capacidade que o fármaco tem de se libertar dos polímeros que compõem a formulação (CSÓKA *et al.*, 2005; AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007; TIRNAKSIZ; YUCE, 2005). Pode também detectar mudanças *in vitro* que eventualmente possam afetar a performance *in vivo*, devido a alterações físico-químicas da formulação. Por isso, é o teste de escolha para avaliar a estabilidade de produtos semissólidos e o impacto que pequenas alterações nas formulações ou no processo de fabricação (como mudanças nos equipamentos utilizados na manipulação) podem gerar na constância da qualidade de produtos com eficácia já comprovada (USP, 2014; FDA, 1997).

No entanto, o Teste de Liberação não tem a capacidade de prever a performance *in vivo*, já que o principal fator que afeta biodisponibilidade e desempenho clínico de produtos transdérmicos é a barreira fornecida pelo epitélio para a entrada de substâncias (USP, 2014). Após a verificação de quanto do princípio ativo se libera da formulação, deve se determinar a capacidade que este tem, junto de seus veículos, de se difundir efetivamente pelos estratos da epiderme. Este teste é chamado de Teste de Permeação, para o qual existem alguns modelos diferentes de aparatos que podem ser utilizados, sendo a célula de difusão vertical, ou célula de Franz, o mais difundido (CSÓKA *et al.*, 2005; AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007; TIRNAKSIZ; YUCE, 2005).

A célula de difusão vertical, a qual deve ser composta de vidro borossilicato e ser volumétrica e devidamente calibrada (Figura 3), tem princípio de funcionamento relativamente simples: possui duas câmaras, uma doadora e uma receptora, que são separadas por uma camada de pele (humana ou animal) ou outra membrana artificial equivalente. A formulação é aplicada na câmara doadora. Após o tempo pré-estipulado do teste, realiza-se a coleta de uma alíquota do meio receptor e procede-se ao doseamento de quanto do fármaco conseguiu se difundir para o mesmo, o que funciona como um modelo para prever a permeação do princípio ativo no organismo humano (JACOBI *et al.*, 2005; VILLARINO; LANDONI, 2006; MUKHERJEE *et al.*, 2005).

Figura 3 – Desenho esquemático de célula de difusão vertical (dimensões em mm).



Adaptado de: USP, 2014.

O modelo experimental da célula de difusão é um meio confiável e reproduzível de se avaliar produtos transdérmicos, os quais devem se difundir da formulação e através da membrana utilizada e para a câmara receptora. No caso do Teste de Liberação, a membrana tem como objetivo manter o produto separado da câmara receptora, e por isso deve ser inerte e altamente permeável para não ser um limitador do fluxo de passagem dos ativos para o meio receptor (USP, 2014). Para o Teste de Permeação, no entanto, a membrana deve ser o máximo possível representativa da realidade de aplicação do produto e é por isso que a pele humana é a membrana de escolha para tanto, apesar de pele de orelha de porco ser bastante utilizada por sua maior facilidade de obtenção e por sua similaridade com a epiderme humana. Por ser um

método que utiliza membrana biológica excisada de seres vivos, é considerada uma técnica *ex vivo* (BALAGUER-FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2007).

Para a exata correlação *ex vivo* – *in vivo*, no entanto, há algumas limitações, como a manutenção de um mesmo grau de hidratação durante todo o ensaio – o que pode afetar a bicamada lipídica – e não conseguir mimetizar as condições fisiológicas como mudanças de pH e temperatura e descamação do EC. Apesar disto, este ainda é o principal equipamento utilizado para medir a penetração transepitelial de substâncias (NOKHODCHI *et al.*, 2002; WARNER; STONE; BOISSY, 2003) e foi o modelo utilizado neste estudo.

Atualmente, a realização deste teste se tornou exigência, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para o desenvolvimento de novos produtos cuja via de administração seja tópica ou transdérmica. Assim, segundo a RDC n. 48, de 6 de outubro de 2009 (BRASIL, 2009), a determinação do fluxo cutâneo de fármacos através de estudos de permeação cutânea é obrigatória no campo da pesquisa e desenvolvimento de produtos tópicos e transdérmicos.

3 HIPÓTESE

O desenvolvimento de formulações transdérmicas inovadoras que utilizem tecnologia magistral (Pentravan como veículo) propicia uma fluxos de permeação cutânea de fármacos utilizados em modulação hormonal bioidêntica (progesterona, estradiol e estradiol + estriol) comparáveis aos medicamentos comerciais de referência.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar pela primeira vez os perfis de liberação e de permeação dos hormônios sexuais femininos progesterona, estradiol e estriol incorporados em um veículo transdérmico de ampla utilização mundial, em emulsões contendo somente progesterona, ou somente estradiol, ou uma associação entre estradiol e estriol.

4.2 Específicos

- Verificar a adequabilidade das técnicas analíticas farmacopeicas atuais para o doseamento de formas farmacêuticas transdérmicas contendo hormônios bioidênticos;
- Desenvolver e otimizar novos métodos analíticos ou adequar os já existentes para as necessidades específicas do presente estudo e validá-los;
- Otimizar o processo de manipulação das emulsões transdérmicas contendo hormônios sexuais femininos, em termos de uniformidade de doses dispensadas e uniformidade de conteúdo;
- Otimizar os meios receptores para cada emulsão, para execução de estudos de liberação e de permeação transdérmica;
- Avaliar a liberação dos hormônios de suas formulações por meio de técnica *in vitro*.
- Avaliar a permeação transdérmica dos hormônios de suas formulações por meio de técnica *ex vivo*, utilizando modelo experimental com pele humana.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REAGENTES E MATERIAIS

O etanol (EtOH) utilizado na preparação de fases móveis foi grau CLAE, (Sigma-Aldrich, EUA). Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), sulfato de magnésio (MgSO₄), cloreto de magnésio (MgCl₂), sulfato de sódio (Na₂SO₄), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), acetona, acetonitrila, clorofórmio, éter etílico, metanol (MeOH), albumina sérica bovina (ASB) e hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPCD) foram todos obtidos do mesmo fornecedor. P, E2, E3, etoxidiglicol (2-(2-ethoxyethoxy)ethanol) e Pentravan para manipulação das emulsões foram gentilmente doados por Fagron (Brasil). Os padrões de referência foram todos provenientes da *United States Pharmacopeia* (USP) (EUA). Água ultrapura obtida em um sistema AquaMax-Ultra 370 Series (Young Lin, Coreia) (18,2 MΩ cm de resistividade a 25 °C e < 10 ppb de carbono orgânico total) foi utilizada em todos os experimentos. Todas as fases móveis foram filtradas à vácuo em filtros de celulose de 0,45 μm (Sartorius, Alemanha) e degaseificadas utilizando ultrassom (Cristófoli, Brasil) por 30 min antes do uso. Toda a vidraria utilizada foi previamente calibrada de acordo com a Rede Brasileira de Calibração (RBC).

5.2 EMULSÕES TRANSDÉRMICAS

As emulsões transdérmicas, nomeadas P_{emuls}, E_{emuls} e Biest de acordo com o princípio ativo contido (P, E2 e E2 + E3, respectivamente), foram manipuladas de acordo com as formulações descritas na Tabela 2. Os princípios ativos foram exatamente pesados (balança analítica digital AY220, Shimadzu, Japão), transferidos para um cadinho de ágata, levigadas gota a gota com etoxidiglicol e então homogeneizadas geometricamente com o veículo transdérmico, Pentravan. Este foi considerado o processo de partida para a obtenção das emulsões transdérmicas, mas o mesmo foi otimizado quanto à embalagem de dispensação e à uniformidade de conteúdo (UC) após os métodos para quantificação dos hormônios por CLAE terem sido validados. As concentrações de princípios ativos foi definida de modo a refletir a realidade do que é mais utilizado atualmente por pacientes em reposição hormonal.

Tabela 2 – Composição das emulsões transdérmicas contendo hormônios sexuais femininos.

Formulação	Componente				
	P (mg)	E2 (mg)	E3 (mg)	Etoxidiglicol (mL)	Pentravan (q.s.p.)
P _{emuls}	50,0	-	-	0,05	1,0 g
E _{emuls}	-	0,5	-	0,01	1,0 g
Biest	-	1,0	4,0	0,03	1,0g

q.s.p.: quantidade suficiente para.
P: progesterona; E2: 17- β -estradiol; E3: estriol.

5.3 DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS POR CLAE

As análises por CLAE foram realizadas em um sistema cromatográfico qualificado e calibrado Young Ling (Coreia) composto por: bomba quaternária (YL 9110), detector de arranjo de fotodiodo (PDA) (YL 9160), injetor automático (YL 9150), compartimento de coluna com forno (YL 9130) e *software* de controle (Clarity). As separações cromatográficas foram obtidas utilizando colunas de octadecilsilano (C18) – 250 x 4,6 mm, partículas de 5 μ m (para P_{emuls}), ou 125 x 4,6 mm, partículas de 5 μ m (para E_{emuls} e Biest), todas da Phenomenex (EUA). As colunas foram conectadas ao sistema através de pré-colunas (C18, 4,0 x 3,0 mm, 5 μ m) do mesmo fabricante. Para minimizar as interferências analíticas, foram utilizadas colunas ditas “dedicadas”, ou seja, cada coluna era de uso exclusivo de uma determinada emulsão.

As soluções-padrão utilizadas para quantificação, ditas soluções na concentração de trabalho, a 100%, foram obtidas a partir da pesagem exata (balança descrita anteriormente) dos padrões, os quais foram dissolvidos e diluídos nos solventes apropriados (P = EtOH, E2 e E3 = MeOH) a fim de se obter soluções nas seguintes concentrações, ditas concentrações de trabalho: P = 50 μ g mL⁻¹, E2 = 20 μ g mL⁻¹, E3 = 80 μ g mL⁻¹. As soluções-amostra foram obtidas a partir das emulsões transdérmicas, diluindo-as da mesma maneira e nas mesmas concentrações de seus respectivos padrões.

Para minimizar o tempo de análise e o consumo de reagentes, bem como otimizar algumas condições cromatográficas, um planejamento experimental estrela, com três fatores, dois níveis principais, seis níveis axiais e triplicata no ponto central, totalizando 17 experimentos, foi realizado (MONTGOMERY, 2005). As variáveis consideradas foram: (i) porcentagem de EtOH nas fases móveis; (ii) tempo de ultrassom para dissolução das emulsões; e (iii) temperatura das colunas cromatográficas. Os fatores e os níveis estão descritos na Tabela 3, e suas faixas foram definidas previamente em experimentos de triagem.

Outras condições experimentais como volume de injeção fixo em 20 μL ; fluxo de fase móvel a 1,2 mL min^{-1} ; e detecção por UV em comprimentos de onda definidos (254 nm para P_{emuls} e 205 nm para E_{emuls} e Biest, definidos por corridas cromatográficas dos padrões, com detecção por PDA) foram mantidos constantes. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória, para minimização de distorções estatísticas dos resultados.

Tabela 3 – Fatores e níveis do planejamento estrela para otimização dos métodos cromatográficos.

Fatores	Níveis codificados e reais				
	-1,68	-1	0	1	1,68
P_{emuls}					
X_1	52	55	60	65	68
X_2 (min)	3	10	20	30	37
X_3 ($^{\circ}\text{C}$)	18	25	35	45	52
E_{emuls}					
X_1	43,4	44	45	46	46,6
X_2 (min)	22	25	30	35	38
X_3 ($^{\circ}\text{C}$)	18	25	35	45	52
Biest					
X_1	22	25	30	35	38
X_2 (min)	3	10	20	30	37
X_3 ($^{\circ}\text{C}$)	18	25	35	45	52

X_1 : porcentagem de etanol na fase móvel. X_2 : tempo de dissolução da amostra em ultrassom.
 X_3 : temperatura da coluna cromatográfica

5.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS POR CLAE

Os métodos desenvolvidos foram validados após sua otimização, conforme a Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003, que regulamenta a validação de métodos analíticos e bioanalíticos no Brasil. Os testes específicos para a validação também seguiram as diretrizes do *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005) e do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2010). Os testes realizados foram:

5.4.1 Especificidade

A especificidade foi determinada pela comparação das áreas dos picos cromatográficos ($n = 3$) dos hormônios puros (padrões) e dos mesmos junto a seus veículos (amostras, ou seja, hormônios + Pentravan + etoxidiglicol), nas concentrações de trabalho ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para P, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para E2-E_{emuls} e E2-Biest e $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ para E3-Biest). Através destas determinações, foi calculado o grau de discrepância entre as áreas utilizando a equação 2.

$$\%_{\text{discrepância}} = \frac{D_{P+V} - D_P}{D_P} \times 100 \quad (2)$$

na qual D_{P+V} é a média das áreas do padrão + veículo e D_P é a média das áreas do padrão. O critério de aceitação foi definido como uma porcentagem de discrepância inferior a 2%.

Adicionalmente, a especificidade do método foi obtida pela comparação qualitativa dos cromatogramas dos padrões puro e com seus veículos, para demonstração de que os picos cromatográficos são provenientes somente dos hormônios.

5.4.2 Linearidade

Para determinação da linearidade, três curvas analíticas foram plotadas a partir de cinco concentrações dos fármacos ($n = 3$ para cada nível de concentração), no intervalo de 70% a 130% da concentração de trabalho: 35, 42,5, 50, 57,5 e 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para P em P_{emuls}; 14, 17, 20, 23 e 26 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para E2 em E_{emuls} e em Biest; e 56, 68, 80, 92 e 104 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para E3 em Biest. As curvas foram plotadas com o objetivo de avaliar a relação linear entre a concentração dos analitos e as áreas cromatográficas obtidas. Para tanto, os dados de cada faixa de concentração de cada hormônio foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA).

5.4.3 Limites de Detecção e Quantificação

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) dos métodos foram determinados como média, a partir de três curvas analíticas das amostras, e foram calculados a partir das equações 3 e 4 a seguir:

$$LD = S \frac{3}{a} \quad (3)$$

$$LD = S \frac{10}{a} \quad (4)$$

nas quais S é o desvio padrão do intercepto com o eixo de y da curva analítica e a é o coeficiente angular da curva analítica.

Os LD e LQ foram confirmados a partir da injeção de soluções da amostra nos respectivos limites teóricos calculados.

5.4.4 Precisão

O teste de precisão teve o intuito de avaliar o grau de dispersão entre a série de medidas obtidas por um mesmo analista (precisão intra-ensaio, repetibilidade) e entre dois analistas (variações intra-laboratório, precisão intermediária), para soluções de P a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, E2 a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (em E_{emuls} e Biest) e E3 a $80 \mu\text{g mL}^{-1}$. A repetibilidade foi determinada pela análise de seis replicatas de forma consecutiva por um único analista em um único dia. A precisão intermediária também foi determinada pela análise de seis replicatas, mas em dois dias e por dois analistas diferentes ($n_{\text{total}} = 24$). Séries de injeções com coeficiente de variação menor que 5% foram consideradas satisfatórias.

5.4.5 Exatidão

Para avaliação da exatidão, utilizou-se o método da adição de padrão. Um único analista realizou a injeção ($n = 3$) de soluções das amostras (emulsões finais) puras e das mesmas com a adição de quantidades conhecidas de seus respectivos padrões, em concentrações de 80, 100 e 120% de suas concentrações de trabalho. A área do pico cromatográfico a ser atribuída somente aos padrões foi calculada como a diferença entre a

área do padrão + emulsão e somente a da emulsão. Esta área calculada foi comparada à sua área teórica, obtida através da equação analítica plotada em 5.4.2 Linearidade, e este resultado foi denominado como taxa de recuperação do método (área teórica / área “real”, calculada \times 100). Taxas de recuperação entre 98 e 102% foram consideradas satisfatórias.

5.4.6 Robustez

Para avaliação da significância que variações deliberadas em alguns parâmetros dos métodos exercem, um planejamento fatorial com oito experimentos (2^3) e triplicata no ponto central foi conduzido, num total de 11 experimentos realizados em ordem aleatória, para cada formulação (X_1 : porcentagem de EtOH nas fases móveis; X_2 : temperatura da coluna cromatográfica; X_3 : fluxo da fase móvel). Os fatores e seus níveis estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Fatores e níveis do planejamento experimental 2^3 para estudo da robustez dos métodos.

Fatores	Níveis codificados e reais		
	-1	0	+1
P_{emuls}			
X_1 (%)	63	65	67
X_2 (°C)	43	45	47
X_3 (mL min ⁻¹)	1,0	1,2	1,4
E_{emuls}			
X_1 (%)	43	45	47
X_2 (°C)	23	25	27
X_3 (mL min ⁻¹)	1,0	1,2	1,4
B_{iest}			
X_1 (%)	33	35	37
X_2 (°C)	42	45	47
X_3 (mL min ⁻¹)	1,0	1,2	1,4

X_1 = porcentagem de etanol na fase móvel. X_2 = temperatura da coluna cromatográfica.
 X_3 = fluxo da fase móvel.

A partir dos resultados de cada experimento, os coeficientes para a determinação do modelo estatístico de previsão foram calculados segundo Neto, Scarminio e Bruns (2010), de acordo com a equação 5:

$$b = X^t X^{-1} X^t y \quad (5)$$

na qual b é a matriz de coeficientes do modelo e X e y são a Matriz X e o Vetor y , respectivamente. Para escrever a equação do modelo ajustado, foram calculados os erros-padrão dos coeficientes através da equação 6:

$$\varepsilon b = \overline{X^t X^{-1} \cdot \sigma^2} \quad (6)$$

na qual εb é a matriz cuja diagonal principal representa os erros-padrões dos estimadores do modelo (b_i) e σ^2 é a variância populacional dos experimentos, que pode ser estimada como s^2 , utilizando as replicatas no ponto central, a partir da equação 7:

$$s^2 = \frac{x_i - \bar{x}}{n-1}^2 \quad (7)$$

Os efeitos foram calculados matricialmente pelo produto $X^t y$, no qual y é o vetor coluna contendo os resultados médios dos ensaios.

Para a estimativa do erro-padrão de um efeito foi calculada a raiz quadrada do valor obtido na equação 8 e para o erro-padrão da média a raiz quadrada do valor obtido na equação 9.

$$V_{efeito} = \frac{s^2}{2} \quad (8)$$

$$V_{média} = \frac{s^2}{n} \quad (9)$$

Com a estimativa dos erros-padrão, construiu-se intervalos de confiança para os valores dos efeitos usando a distribuição t de Student, com 95% de confiança, pela equação 10.

$$\eta - t_v \times S_{efeito} < \eta < \eta + t_v \times S_{(efeito)} \quad (10)$$

na qual η representa o verdadeiro valor de um efeito (valor populacional); η representa o valor obtido a partir dos ensaios realizados no experimento; t_v a distribuição de Student; e $S_{(efeito)}$ o erro-padrão de um efeito.

5.5 OTIMIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Após definição dos métodos mais adequados para cada hormônio e de suas respectivas validações, otimização no preparo das formulações transdérmicas foi realizada, ainda utilizando as composições descritas na Tabela 2.

A partir do processo inicial de manipulação dos produtos já mencionada, duas variáveis concernentes ao preparo foram avaliadas: (i) a exatidão da dose liberada pelas embalagens de dispensação de doses individuais, e (ii) a UC das emulsões propriamente ditas. Para o primeiro objetivo, duas marcas diferentes de embalagens com acionamento a vácuo por êmbolo foram testadas (Embalagem 1 = SlimLock, Emphasys, Brasil; Embalagem 2 = Pump Control, Vepakum, Brasil), utilizando uma abordagem volumétrica. Este tipo de embalagem foi escolhido por propiciar o armazenamento direto das emulsões durante sua manipulação, através de um processo que usa a força de extrusão para otimizar a formação de micelas e a consequente encapsulação das drogas. As densidades de todos os produtos foram determinadas, e então as embalagens (volume total = 30 mL) foram preenchidas com as emulsões ($n = 6$, para cada embalagem). Cada embalagem teve três doses dispensadas em béqueres, e o peso foi transformado para volume usando a densidade, para verificar se as embalagens dispensavam exatamente 1 mL. Um teste t de Student (valor de referência = 1,0 mL) foi utilizado para tanto, com 95% de confiança.

Após a escolha da melhor embalagem em termos de exatidão da dose, um teste de uniformidade de conteúdo (UC) foi realizado baseado no capítulo geral da *United States Pharmacopoeia* <905> (USP, 2014), para determinar se a utilização de um moinho de rolos (Fagron, Brasil) interferiria na homogeneidade e no tamanho das partículas das emulsões. Dez unidades para cada formulação foram doseadas individualmente, e os resultados foram expressos como dose liberada. O valor de aceitação (VA) foi calculado a partir da equação 11:

$$M - X + ks \quad (11)$$

na qual X é a média dos conteúdos individuais ($\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_n$), expressa como porcentagem do valor rotulado/teórico; $M = X$, se $98,5\% \leq X \leq 101,5\%$; ou $M = 98,5\%$, se $X < 98,5\%$; ou $M = 101,5\%$, se $X > 101,5\%$; k é a constante de aceitabilidade (= 2,4, para 10 unidades); e s é o desvio padrão da amostra. O valor de aceitação máximo foi considerado como 15 (USP,

2014). Os processos com melhores resultados (melhor VA) foram então utilizados para os estudos de permeação.

5.6 SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E DE PERMEAÇÃO

Uma vez que o processo de manipulação das emulsões se encontrava otimizado, iniciou-se a etapa prévia aos estudos de liberação e permeação: a escolha do meio receptor. Como cada substância apresenta um perfil de solubilidade particular, diferentes meios receptores biorelevantes foram testados para se determinar quais os mais adequados a cada hormônio. O método de preparação dos meios foi adaptado de Baert *et al.* (2010), e a composição dos mesmos é dada na Tabela 5.

A solubilidade das substâncias foi determinada nos meios descritos na Tabela 5, e também nos mesmos acrescidos de ASB ou HPCD, totalizando 9 meios diferentes. Uma solução de MeOH e H₂O (70:30, v/v) foi utilizada como meio receptor padrão.

Alíquotas de 10 mg de cada hormônio foram exatamente pesadas e transferidas para 10 tubos de ensaio de 10 mL, os quais foram preenchidos com os diferentes meios. Os tubos foram agitados mecanicamente por 10 min, levados a ultrassom por 30 min e então deixados em banho-maria (32 °C) por 12 h. Os tubos foram então centrifugados a $20.000 \times g$ e o sobrenadante foi então transferido para *vials* de CLAE para quantificação utilizando os respectivos métodos.

Os meios mais adequados foram definidos como os que apresentaram maior solubilização de cada hormônio. Para estes, novas curvas analíticas foram plotadas utilizando as mesmas concentrações descritas em 5.4.2 Linearidade.

5.7 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Para a verificação da liberação dos hormônios a partir de suas formulações, foram utilizadas células de difusão vertical volumétricas (células de Franz) de 7 mL e área de difusão total de 1,86 cm², com coleta automática, prateleira agitadora com capacidade para agitação calibrada de 6 células simultaneamente e banho de aquecimento com a mesma capacidade, para aquecer as células através de seu sistema de camisa-de-água (Microette Plus, Hanson Research, EUA).

Tabela 5 – Composição dos meios receptores biorelevantes utilizados para estudos de permeação e liberação da droga.

<i>Componente</i>	0.01 M tampão fosfato salino 0,01 M, pH 7,4 (mM)	Suor humano artificial (mM)	Fluido corporal simulado (mM)
NaCl	138,00	49,96	136,80
KCl	2,70	-	3,00
CaCl ₂	-	0,15	2,50
MgSO ₄	-	1,00	-
MgCl ₂	-	-	1,50
Na ₂ SO ₄	-	-	0,50
NaHCO ₃	-	-	4,20
KH ₂ PO ₄	1,43	7,50	1,00
Na ₂ HPO ₄	8,57	-	-

NaCl: cloreto de sódio. KCl: cloreto de potássio. CaCl₂: cloreto de cálcio. MgSO₄: sulfato de magnésio. MgCl₂: cloreto de magnésio. Na₂SO₄: sulfato de sódio. NaHCO₃: bicarbonato de sódio. KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico. Na₂HPO₄: fosfato de sódio dibásico.

Ao compartimento doador foram adicionadas as formulações de hormônios (n=6 para cada formulação) e o compartimento receptor foi preenchido completamente com os meios receptores adequados, certificando-se de que não houvesse ar entre o meio e as membranas utilizadas, as quais foram posicionadas entre os dois compartimentos. Tais membranas consistiram de discos circulares de polisulfona de 25 mm de diâmetro (Tuffryn, Pall Corporation, EUA), as quais foram previamente lavadas com água ultrapura para remoção de possíveis aditivos ou contaminantes e saturadas com meio receptor por 30 min antes dos experimentos. Os meios receptores permaneceram em agitação constante a 600 rpm por meio de uma barra magnética, exceto nos períodos de coleta, e mantidos a 32 ± 2 °C durante todo o experimento. Uma dose infinita das preparações semissólidas (300 mg) foi aplicada na superfície da pele utilizando uma pipeta de deslocamento positivo Pos-D MR-110 (Rainin, EUA). As preparações foram então espalhadas homogeneamente por toda a superfície das peles utilizando bastão de vidro e aplicando uma pressão sobre a pele que não excedesse 200 mg cm^{-2} . As células foram então fechadas para manutenção de oclusão por todo o experimento, com auxílio de uma braçadeira. Alíquotas do meio receptor (1 mL) foram coletadas em intervalos regulares de tempo (0,5, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 h após a aplicação dos produtos) diretamente em *vials* para CLAE, e as células de difusão foram

imediatamente repostas com o mesmo volume de meio, na mesma temperatura. A tubulação do sistema era rinsada com 1,5 mL de meio 30 segundos antes cada coleta para evitar interferência de coletas anteriores, período no qual a agitação era interrompida. As concentrações de hormônios foram devidamente corrigidas em cada coleta em relação às diluições ocasionadas pela rinsagem e pela reposição do meio. A concentração de hormônios em cada tempo de coleta foi determinada utilizando CLAE, sendo a quantidade permeada de hormônio no tempo t ($Q_{real,t}$) calculada usando a equação 12.

$$Q_{real,t} = C_{mensurado,t} \cdot V_r \cdot V_a \cdot n^{-1} C_a \quad (12)$$

na qual $C_{mensurado,t}$ é a concentração calculada no tempo t , V_r é o volume da célula de difusão, V_a é o volume da alíquota coletada e C_a é a concentração da alíquota. Quantidades cumulativas de hormônios (μg) permeadas por unidade de área de superfície (cm^2) foram plotadas em função do tempo (h) para determinação dos perfis de liberação. Modelos matemáticos foram aplicados para determinação da cinética de liberação. Quantidades cumulativas de hormônios liberada por área ($\mu\text{g cm}^2$) *versus* tempo (h) foram plotadas para avaliar se a permeação seguia cinética de ordem zero; quantidades cumulativas de hormônios liberada por área ($\mu\text{g cm}^2$) *versus* a raiz quadrada do tempo (\sqrt{t}) para cinética de pseudo-primeira ordem (modelo de Higuchi); e o log das quantidades cumulativas de hormônios liberada por área ($\mu\text{g cm}^2$) *versus* tempo (h) para cinética de primeira ordem. Coeficientes de determinação maiores que 0,99 foram considerados lineares. Para estes, o fluxo em estado estacionário (J_s) foi determinado a partir do coeficiente linear da curva plotada para a quantidade cumulativa de hormônio *versus* tempo. O tempo de latência (T_L) representa o tempo necessário para que se atingisse o fluxo em estado estacionário.

5.8 PELE HUMANA PARA PERMEAÇÃO *EX VIVO*

Peles humanas foram excisadas da região abdominal de três pacientes do sexo feminino que realizaram cirurgia de abdominoplastia, com idade média igual a 46 ± 3 anos e sem doenças cutâneas prévias. O procedimento cirúrgico foi realizado pelo cirurgião plástico Cristiano Dias da Silveira Ramos (CRM 31.949) no Hospital Monte Sinai (Juiz de Fora, MG). As peles foram coletadas imediatamente após as cirurgias e checadas visualmente para a garantia de que estavam íntegras a olho nu e inalteradas pelas condições de remoção

cirúrgica. Para transporte, cuja duração foi inferior a 30 min, foram mantidas em recipiente isotérmico a 4 °C. Ao chegar ao laboratório do NIQUA, a gordura subcutânea e o tecido conectivo foram imediatamente removidos utilizando bisturi. As peles foram então lavadas com água corrente, embrulhadas em Parafilm (Pechiney Plastic Packaging Company, EUA) e papel alumínio e armazenadas a -80 °C até sua utilização (período de armazenamento inferior a 1 mês).

Para os experimentos, as peles foram utilizadas íntegras em sua espessura (full thickness). Elas foram retiradas do *freezer* 10 minutos antes do uso para descongelarem, e então foram cortadas em discos circulares de 25 mm de diâmetro. Elas foram posicionadas sobre as células de maneira aleatória. Estudos de integridade cutânea foram realizados antes e após os experimentos, através da avaliação da perda de água trans-epidermal (*trans-epidermal water loss*, TEWL) utilizando vapômetro (Delfin, EUA).

Este protocolo seguiu o Código de Ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsinki) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo n. 151.275)/

5.9 ESTUDOS DE PERMEACÃO *EX VIVO*

Os estudos de permeação foram realizados no mesmo equipamento descrito no item 5.8. Todo o experimento foi desenhado de modo a mimetizar as condições reais de uso dos produtos em humanos. Os discos de pele foram posicionados entre os compartimentos doador e receptor com o EC superiormente, e assegurando que não fossem formadas bolhas de ar entre a pele e o meio receptor. O compartimento receptor foi preenchido completamente com o meio receptor adequado, o qual permaneceu em temperatura constante de 32 ± 2 °C e agitação constante a 600 rpm, exceto no período de coleta. As peles ficaram 30 minutos em contato com o meio receptor para equilíbrio da temperatura, e após este período de tempo uma dose finita das preparações semissólidas foi aplicada na superfície da pele utilizando uma pipeta de deslocamento positivo Pos-D MR-110 (Rainin, EUA). As quantidades aplicadas foram 9,3 mg para P_{emuls} , 40,0 mg para E_{emuls} e 55,8 mg para Biest. As preparações foram então espalhadas homogêneas por toda a superfície das peles utilizando bastão de vidro e aplicando uma pressão sobre a pele que não excedesse 200 mg cm^{-2} . Os bastões (espalhadores) foram postos em béqueres contendo MeOH, para posterior doseamento da quantidade de formulação que ficou retida nos mesmos. As células foram mantidas abertas durante todo o experimento, de modo que o compartimento doador contendo as emulsões

ficasse em contato com o ambiente. Braçadeiras foram utilizadas para manter os sistemas fixos.

Alíquotas do meio receptor (1 mL) foram coletadas em intervalos regulares de tempo (1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 40 e 48h após a aplicação dos produtos) diretamente em *vials* para CLAE, e as células de difusão foram imediatamente repostas com o mesmo volume de meio, na mesma temperatura. A tubulação das células era rinsada com 1,5 mL de meio 30 segundos antes cada coleta para evitar interferência de coletas anteriores, período no qual a agitação era interrompida. As concentrações de hormônios foram devidamente corrigidas em cada coleta em relação às diluições ocasionadas pela rinsagem e pela reposição do meio. A concentração de hormônios em cada tempo de coleta foi determinada utilizando CLAE, e cada experimento foi realizado em réplicas de seis. A quantidade permeada de droga no tempo t ($Q_{real,t}$), foi calculada usando a equação 12.

Quantidades cumulativas de hormônios (μg) permeadas por unidade de área de superfície (cm^2) foram plotadas em função do tempo (h) para determinação dos perfis de permeação. Modelos matemáticos foram aplicados para determinação da cinética de permeação. Quantidades cumulativas de hormônios permeada por área ($\mu\text{g cm}^2$) *versus* tempo (h) foram plotadas para avaliar se a permeação seguia cinética de ordem zero; quantidades cumulativas de hormônios permeada por área ($\mu\text{g cm}^2$) *versus* a raiz quadrada do tempo (\bar{t}) para pseudo-primeira ordem (modelo de Higuchi); e o log das quantidades cumulativas de hormônios permeada por área ($\mu\text{g cm}^2$) *versus* tempo (h) para cinética de primeira ordem. Coeficientes de determinação maiores que 0,99 foram considerados lineares. Para estes, o fluxo em estado estacionário (J_s) foi determinado a partir do coeficiente linear da curva plotada para a quantidade cumulativa de hormônio *versus* tempo. O tempo de latência (T_L) representa o tempo necessário para que se atingisse o fluxo em estado estacionário.

5.10 RETENÇÃO DA DROGA NA PELE

Após os experimentos de permeação, cada disco de pele foi retirado das células de difusão para análise da quantidade de hormônio retido em suas camadas. Para tanto, os discos foram enrolados em Parafilm[®] e transportados imediatamente ao Laboratório de Patologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os discos foram então desembalados, congelados instantaneamente a -30°C utilizando meio de incorporação de tecidos (Slee Technik, Alemanha) e então 10 cortes horizontais de 100 μm cada foram realizados utilizando micrótomo criostato (Hyrax C25, Zeiss, Alemanha). Cada corte foi

colocado individualmente em tubos cônicos de polipropileno com capacidade para 1,5 mL (Eppendorf, Alemanha) preenchidos previamente com 1 mL de MeOH. O restante de cada disco de pele foi colocado em tubos do mesmo material (mesmo fabricante) contendo 5 mL do mesmo solvente. Todos os tubos foram agitados mecanicamente de forma vigorosa e levados a ultrassom por 1 h. O conteúdo líquido de cada tubo foi então individualmente filtrado em filtros de celulose de 0,45 μm e transferido para *vials* de CLAE para quantificação dos hormônios em solução. As concentrações de hormônios foram corrigidas para as diluições realizadas. Através de análise histológica prévia das amostras de pele, classificou-se cada camada de 100 μm de pele da seguinte forma: camada 1 (100 μm de profundidade) – EC; camada 2 (100-200 μm de profundidade) – epiderme viável; camadas 3-5 (300-500 μm de profundidade) – derme superficial; camadas 6-10 (600-1000 μm de profundidade) – derme profunda; e camada 11 (> 1100 μm de profundidade) – derme profunda + início do tecido subcutâneo (hipoderme).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS POR CLAE

O primeiro passo para se desenvolver uma formulação que possua qualidade comprovada é dado pelo estabelecimento de métodos seguros e confiáveis para o seu controle de qualidade. Uma vez definido um método adequado e devidamente validado para os fins propostos, a determinação da qualidade dos produtos pode ser realizada com maior confiança. Portanto, iniciou-se o presente trabalho pelo desenvolvimento de um método cromatográfico cujos LD e LQ fossem suficientemente baixos para o emprego nos estudos de liberação e de permeação transdérmica.

Num primeiro momento, foi realizado o levantamento dos métodos farmacopeicos disponíveis para as formas farmacêuticas de interesse nas seguintes farmacopeias: Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010), *United States Pharmacopeia 37th ed.* (2014), *British Pharmacopoeia 2014* (2013), *Japanese Pharmacopoeia XV* (2006), *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª ed.* (2004) e *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (2005). Foi verificada escassez de método oficiais para os produtos de interesse: para E2 há monografia para creme vaginal por CLAE na USP; para E3 há monografia para creme, também por CLAE, na *British Pharmacopoeia*; e para P e E2 + E3 não há monografia para produtos transdérmicos.

Ao se estudar os dois métodos farmacopeicos existentes, verificou-se que ambos utilizam grande percentual de solventes orgânicos considerados tóxicos. No método da USP, a fase móvel é composta por uma mistura de acetonitrila e água (1:1, v/v), além de ser uma técnica para produtos destinados a aplicação em mucosa vaginal e que, portanto, possuem base para incorporação do ativo com componentes diferentes dos aqui utilizados. No método da *British Pharmacopoeia* para E3, a fase móvel é constituída de MeOH, acetonitrila e água (5 : 38 : 57, v/v/v). Isto posto, optou-se pelo desenvolvimento de métodos analíticos originais que, além de adequados para os objetivos propostos, fossem incluídos nos princípios da Química Verde, constituindo-se em métodos ecologicamente correndos (*eco-friendly*) ao utilizarem solventes menos agressivos ao meio ambiente, quando do seu descarte.

Como uma primeira etapa do desenvolvimento analítico, verificou-se a solubilidade das formulações em diferentes solventes. Para os matérias-primas (hormônios), a Farmacopeia Brasileira (2010) define o E2 como “praticamente insolúvel em água, solúvel

em acetona e dioxana, facilmente solúvel em etanol, ligeiramente solúvel em óleo vegetal e pouco solúvel em cloreto de metileno” e a progesterona como “praticamente insolúvel em água, solúvel em etanol, acetona e dioxana e pouco solúvel em óleos vegetais”. Como não há monografia para E3 na referida farmacopeia, utilizou-se como padrão o critério de solubilidade da USP (2014): o E3 é “solúvel em acetona, clorofórmio, dioxana, éter etílico, óleos vegetais, moderadamente solúvel em etanol e insolúvel em água”.

Portanto, dadas as citadas solubilidades dos fármacos, foram selecionados alguns solventes para verificação da solubilidade das formulações que os continham, e para tanto foram usados acetona, acetonitrila, clorofórmio, EtOH, éter etílico, MeOH e tetra-hidrofurano, numa concentração de 1 mg mL^{-1} , a qual seria suficiente para os objetivos deste trabalho. Como resultado, o veículo Pentravan foi completamente solúvel apenas em MeOH e EtOH, assim como as formulações P_{emuls} e E_{emuls} . A formulação Biest foi solúvel apenas em MeOH.

Uma vez que o MeOH apresenta um perfil de toxicidade alto para o analista e o ambiente, inclusive com possibilidade de causar cegueira (SANA EI-ZADEH; ZAMANI; SHADNIA, 2011) devido à formação de ácido fórmico *in vivo* e ao seu biacúmulo (TEPHLY, 1991), optou-se por se trabalhar com este solvente somente nas formulações contendo E3, por causa da impossibilidade de se trabalhar com EtOH. Esforços foram feitos no desejo de que este último, enquanto solvente orgânico não agressivo ao ambiente e ao analista através de contato pelo ar (SANDRA *et al.*, 2010), fosse então utilizado como o solvente padrão para constituição das fases móveis e para solubilização das amostras, a fim de se gerar técnicas *eco-friendly*.

Outra opção referente à fixação das condições cromatográficas foi o uso de coluna de sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilano (C18), por se tratar de uma coluna largamente empregada em rotina laboratorial, sendo seu custo relativamente menor quando comparado a colunas com outros recheios (BRANDÃO *et al.*, 2011). Trabalhou-se também com colunas dedicadas a cada formulação, para minimizar a interferência analítica. Além disso, uma coluna de fase reversa é condição desejável quando se trabalha com hormônios, dado seu caráter apolar.

Isto posto, ficaram assim definidas as condições cromatográficas iniciais para análise dos hormônios bioidênticos transdérmicos: coluna e pré-coluna C18 (5 μm) (colunas dedicadas); volume de injeção = 20 μL ; fluxo de fase móvel de 1,2 mL min^{-1} ; e detecção por varredura espectrofotométrica entre os comprimentos de onda de 190-900 nm (neste caso, respostas máximas foram obtidas em 254 nm para P e 205 nm para E2 e E3). As

concentrações de trabalho foram definidas de modo que se obtivessem as mesmas concentrações para as os padrões e para as amostras: para P_{emuls} , 1 dose (= 1 mL) em 100 mL de EtOH seguida por uma segunda diluição de 1 mL desta solução em 10 mL de EtOH ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$); para E_{emuls} , 1 dose em 25 mL de EtOH ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$); para Biest, 1 dose em 50 mL de MeOH ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de E2 e $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de E3).

Como fase móvel de partida, optou-se por uma mistura de água e etanol (50 : 50, v/v), por se tratar de uma concentração de solvente orgânico intermediária, de onde se poderia decidir por aumentá-la ou diminuí-la conforme a necessidade. A escolha dos dois solventes também se baseia no intuito de se dar um caráter *eco-friendly* aos métodos. Durante as corridas cromatográficas, no entanto, verificou-se que esta não é uma fase móvel adequada, visto que não permitiu a identificação de nenhum pico cromatográfico nas análises até 30 min. Este tempo foi selecionado para tornar as análises mais viáveis em rotina laboratorial de controle de qualidade, pois corridas cromatográficas muito longas aumentam os custos.

Neste contexto, um planejamento experimental do tipo estrela foi considerado para otimização das condições cromatográficas e de preparação do método. Para tanto, 17 experimentos foram conduzidos para cada formulação, de acordo com o exposto na Tabela 3. Anteriormente ao desenho do planejamento, corridas cromatográficas piloto foram realizadas, para se determinar as faixas de trabalho mais adequadas para cada formulação.

Os resultados destes experimentos se encontram na Tabela 6. Um balanço entre as melhores respostas para cada parâmetro foram escolhidas como as melhores condições, uma vez que um método ideal é aquele que provê boas respostas analíticas (teor/doseamento) e também é de fácil e rápida execução (tempo de retenção pequeno). Na Tabela 6, tais condições mais adequadas foram marcadas em cinza e foram sumarizadas na Tabela 7.

6.2 VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS POR CLAE

Utilizando as condições analíticas definidas na Tabela 7, os métodos foram validados para o doseamento de cada hormônio em sua formulação, seguindo os parâmetros da ANVISA (2003), ICH (2005) e INMETRO (2010).

Iniciou-se o processo de validação analítica pelo ensaio de especificidade dos métodos, a qual é a capacidade que os mesmos possuem de quantificar somente o composto de interesse, mesmo em presença de outros componentes. Neste trabalho, ela foi determinada como uma porcentagem de discrepância menor que 2% entre as áreas cromatográficas dos

hormônios separadamente e dos mesmos + veículos, em suas respectivas concentrações de trabalho. Os resultados estão expostos na Tabela 8. Sendo todos os valores inferiores a 2%, demonstra-se que não há diferença significativa entre a quantificação dos hormônios isoladamente ou incorporados em suas formulações. De fato, a análise qualitativa dos cromatogramas obtidos (Figura 4) confirmam a não interferência dos veículos na análise.

Tabela 6 – Planejamento composto central 2^3 para otimização do método analítico para emulsões transdérmicas contendo hormônios sexuais femininos.

Experimento	Matrix X			Vetores y *							
				P _{emuls}		E _{emuls}		E2-Biest		E3-Biest	
	X ₁	X ₂	X ₃	Teor	t _R	Teor	t _R	Teor	t _R	Teor	t _R
1	-1	-1	-1	104,00	11,6	102,43	13,3	nd	nd	98,40	14,5
2	1	-1	-1	97,35	7,0	105,47	11,9	88,53	23,6	96,57	4,0
3	-1	1	-1	98,86	11,8	99,05	13,1	nd	nd	97,80	14,2
4	1	1	-1	95,25	7,7	102,64	11,9	101,50	23,5	101,07	3,9
5	-1	-1	1	99,05	9,7	102,28	12,5	nd	nd	101,44	8,9
6	1	-1	1	103,33	5,9	112,44	12,0	103,21	14,9	99,88	3,2
7	-1	1	1	93,48	9,4	106,04	12,7	nd	nd	45,09	8,4
8	1	1	1	96,61	5,7	107,17	12,4	99,51	13,9	98,06	2,9
9	-1,68	0	0	104,57	12,6	104,20	11,2	nd	nd	94,43	16,8
10	1,68	0	0	96,40	6,1	102,31	12,1	115,01	12,7	nq	2,7
11	0	-1,68	0	96,48	8,5	102,51	10,9	103,02	41,1	102,99	5,7
12	0	1,68	0	98,93	8,2	107,22	9,8	87,94	41,2	84,68	5,7
13	0	0	-1,68	96,55	8,1	109,33	10,2	100,44	24,7	99,04	4,1
14	0	0	1,68	95,07	6,9	103,98	12,1	nd	nd	nq	8,3
15	0	0	0	107,45	7,5	102,55	7,6	99,78	40,0	101,64	5,6
16	0	0	0	105,65	7,5	101,89	7,6	99,89	40,0	101,10	5,6
17	0	0	0	106,69	7,5	100,75	7,6	100,41	40,0	99,63	5,6

* Teor como % e R_t (tempo de retenção) como min. nd: não detectável. nq: não quantificável. Todos os experimentos proveram bom fator capacidade das colunas cromatográficas (>2.0), simetria dos picos analíticos (>1.0) e eficiência das colunas (número de pratos teóricos/metro > 500).

X₁ = EtOH (%) na fase móvel [P_{emuls}: -1,68 (52), -1 (55), 0 (60), 1 (65), 1,68 (68); E_{emuls}: -1,68 (43,4), -1 (44), 0 (45), 1 (46), 1,68 (46,6); Biest: -1,68 (22), -1 (25), 0 (30), 1 (35), 1,68 (38)].

X₂ = dissolução da amostra no ultrassom (min) [P_{emuls}: -1,68 (3), -1 (10), 0 (20), 1 (30), 1,68 (37); E_{emuls}: -1,68 (22), -1 (25), 0 (30), 1 (35), 1,68 (38); Biest: -1,68 (3), -1 (10), 0 (20), 1 (30), 1,68 (37)].

X₃ = temperatura da coluna (°C) [P_{emuls}: -1,68 (18), -1 (25), 0 (35), 1 (45), 1,68 (52); E_{emuls}: -1,68 (18), -1 (25), 0 (35), 1 (45), 1,68 (52)].

A seguir, avaliou-se a linearidade dos métodos, ou seja, a capacidade dos mesmos em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração dos hormônios nas emulsões, dentro do intervalo especificado. Para tanto, curvas analíticas (x = µg mL⁻¹, y = mV) dos hormônios quantificados foram construídas (n=3, replicatas genuínas). A Tabela 9 apresenta os valores encontrados diretamente para as amostras (hormônios +

veículo). A relação linear foi verificada entre as concentrações e as respectivas áreas dos picos, e os dados foram submetidos a ANOVA.

Tabela 7 – Condições cromatográficas definidas para cada emulsão contendo hormônios sexuais femininos.

<i>Condição analítica</i>	<i>Formulação</i>		
	P_{emuls}	E_{emuls}	Biest
Diluyente	EtOH	EtOH	MeOH
Concentração de trabalho para amostra e padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	50	20	20 (E2) e 80 (E3)
Tempo de dissolução em ultrassom (min)	10	30	30
Coluna	C18 250 x 4,6 mm	C18 125 x 4,6 mm	C18 125 x 4,6 mm
Temperatura da coluna ($^{\circ}\text{C}$)	45	35	45
Fase móvel	EtOH:H ₂ O (65:35, v/v)	EtOH:H ₂ O (45:55, v/v)	EtOH:H ₂ O (35:65, v/v)
Fluxo da fase móvel (mL min^{-1})	1,2	1,2	1,2
Deteção (UV, nm)	254	205	205

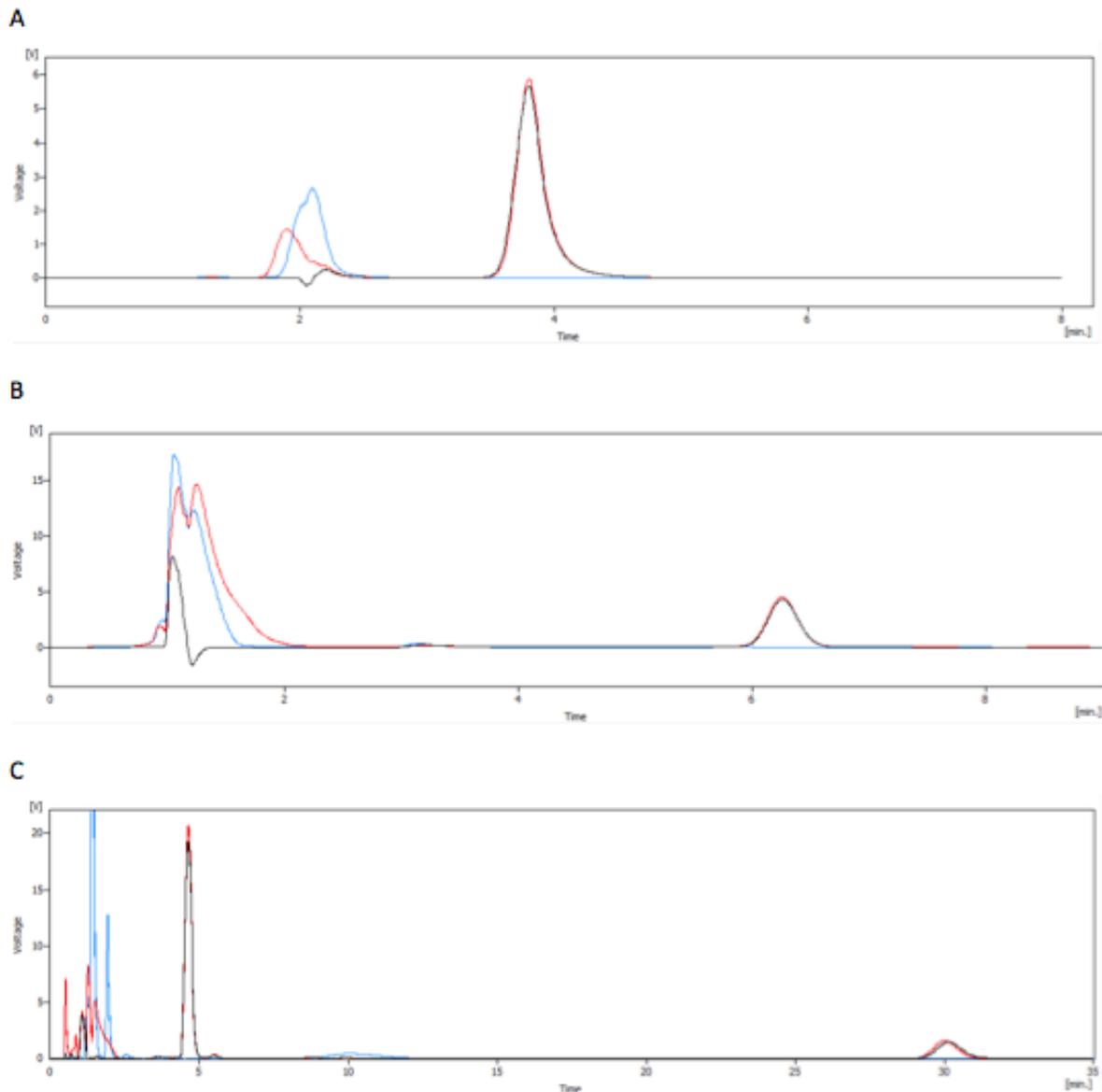
EtOH: etanol. MeOH: metanol.

Tabela 8 – Resultados do estudo da especificidade dos métodos para quantificação de hormônios.

<i>Hormônio</i>	<i>Área dos hormônios puros</i>	<i>Área dos hormônios + veículo</i>	<i>%discrepância</i>
P – P_{emuls}	1866737,33 $\pm 9748,29$	181131,64 $\pm 7652,98$	0,30
E2 – E_{emuls}	1577383,33 $\pm 55672,35$	1607322,46 $\pm 12144,64$	1,90
E2 – Biest	1309365,14 $\pm 7208,50$	1316888,06 $\pm 4921,52$	0,57
E3 – Biest	5057112,67 $\pm 55687,05$	4960697,67 $\pm 55169,99$	1,94

P: progesterona; E2: 17- β -estradiol; E3: estriol.

Figura 4 – Cromatogramas obtidos utilizando-se os métodos desenvolvidos para quantificação dos hormônios em emulsões transdérmicas, evidenciando sua especificidade.



A: progesterona, em P_{emuls} ; B: estradiol, em E_{emuls} ; e C: estradiol (esquerda) e estriol (direita), em Biest. As linhas vermelhas são provenientes de análises dos padrões, as pretas das emulsões e as azuis do meio receptor utilizado para o estudos de liberação e permeação (relatados a seguir).

A ANOVA mostra que a regressão da curva analítica não possui falta de ajuste, com 95% de confiança, dado que todas as curvas analíticas obtiveram $p > 0,05$ nesta análise. Para verificação da validade da ANOVA realizada, a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a homocedasticidade (teste de Cochran) dos resíduos foram testados. O teste de normalidade resultou em p -valores maiores que 0,05, e o teste de Cochran resultou em valores calculados menores que os críticos do teste, o que caracteriza que os pressupostos da linearidade não

foram violados, e portanto a análise pode ser considerada válida. Desta forma, os métodos podem ser considerados lineares para as respectivas faixas de concentração estudadas.

Tabela 9 – Resultados do estudo de linearidade dos métodos para quantificação de hormônios.

Emulsão	Curva analítica		ANOVA ^d	Normalidade ^e	Homoscedasticidade ^f
	Inclinação	Intercepto			
P _{emuls} ^a	48004 (±1333)	-110741 (±69288)	0,102	0,131	0,345
E _{emuls} ^b	82613 (±1837)	14027 (±37703)	0,133	0,470	0,351
E2-Biest ^b	68157 (±1102)	-39961 (±22667)	0,705	0,658	0,408
E3-Biest ^c	58308 (±921)	68722 (±75818)	0,213	0,682	0,478

n=3 (replicatas genuínas). MeOH: metanol. M_R: meio receptor.

Faixa (µg mL⁻¹): ^a(35-65); ^b(14-26); ^c(56-104)

^d ANOVA, nível de significância $p < 0,05$.

^e Teste da normalidade dos resíduos, ou teste de Shapiro-Wilk, nível de significância $p < 0,05$.

^f Teste da homogeneidade dos resíduos (teste de Cochran), valor crítico = 0,684.

A partir das curvas analíticas, os LD (em µg mL⁻¹) foram calculados como 1,68 para P em Pemuls, 0,64 para E2 em Eemuls, 3,18 para E2 em Biest e 6,15 para E3 em Biest. Os LQ por sua vez, foram (em µg mL⁻¹): 5,62 para P em Pemuls, 2,15 para E2 em Eemuls, 10,60 para E2 em Biest e 20,51 para E3 em Biest. O LD representa a menor quantidade de hormônio em solução que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ, por sua vez, é a menor quantidade de hormônio em solução que pode ser determinada com precisão e exatidão sob as mesmas condições. Para estudos de permeação, ambos são de grande importância, uma vez que as quantidades de substâncias que atravessam a pele são de forma geral baixas – e, portanto, é necessário não somente quantificar em concentrações baixas, mas também detectar se alguma substância consegue permear, mesmo que a quantidade seja tão baixa que seja impossível sua quantificação. Estes limites foram confirmados na prática pela injeção de soluções de hormônios nos LD e LQ calculados, confirmando que são observados sinais analíticos nestas concentrações.

A seguir, avaliou-se o grau de reprodutibilidade dos resultados gerados pelos métodos, através do estudo de precisão, e a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro, através de estudo de precisão. Os resultados de ambos os estudos se encontram na Tabela 10. Para precisão, todos os coeficientes de variação achados se encontravam dentro do limite de aceitação ($\leq 5\%$). Para exatidão, as recuperações médias (em %) também atenderam ao critério de aceitação de 98,0-102,0%.

Tabela 10 – Resultados dos estudos de precisão e exatidão dos métodos para quantificação de hormônios.

Hormônio	Precisão		Exatidão	
	CV (%) <i>Intra-dia</i> <i>Primeiro dia</i> ^a	CV (%) <i>Intra-dia</i> <i>Segundo dia</i> ^a	CV (%) <i>Inter-dias</i> ^b	<i>Recuperação</i> (%)
P – P _{emuls}	1,22	1,93	1,69	98,03
E2 – E _{emuls}	1,08	4,13	3,03	98,03
E2 – Biest	1,69	2,01	3,42	98,18
E3 – Biest	0,44	0,55	2,72	98,09

^a n = 12, 6 para cada analista. ^b n_{total} = 24, 12 para cada analista.

P: progesterona. E2: 17-β-estradiol. E3: estriol. CV = coeficiente de variação.

Por fim, avaliou-se o quão robustos os métodos desenvolvidos eram, realizando-se pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos e observando-se os efeitos causados na quantificação dos hormônios. A afirmação de que um método é robusto indica a confiança em sua utilização, mesmo que variações ocorram no decorrer das análises. Por outro lado, ao se constatar susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e monitoradas durante todas as análises. Os resultados se encontram na Tabela 11. A única variação que exerceu papel significativo no resultado do doseamento foi a temperatura do compartimento da coluna, para P_{emuls}, sendo este um efeito negativo (ou seja, ocasiona uma diminuição na resposta analítica). Os outros fatores não afetaram a quantificação dos hormônios, e os métodos para E_{emuls} e Biest não apresentaram variações significativas nos resultados a partir das variações realizadas nos parâmetros cromatográficos. Esses dados sugerem que os métodos são robustos para os fins pretendidos, inclusive para P_{emuls}, uma vez que a temperatura é um parâmetro facilmente ajustável e controlado com precisão pelo sistema cromatográfico. Portanto, de um ponto de vista prático, a partir da análise de todos os dados de validação, podemos afirmar que os métodos se encontram devidamente validados para os fins pretendidos.

6.3 OTIMIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Após validados os métodos, atenção foi dada ao processo de manipulação dos produtos finais que seriam utilizados para os estudos de liberação e de permeação. Como consideração prévia, cita-se que o utilizado, Pentravan, foi selecionado porque é amplamente utilizado em farmácias de manipulação mundialmente, além de ter uma vantagem prática de

ser fácil para os farmacêuticos preparem o produto final, por ser um veículo “pronto para incorporação” que possui adicionalmente boa estabilidade e grande capacidade de carga para os fármacos. Sua composição também permite a encapsulação rápida de fármacos ao se utilizar o processo de extrusão (LEHNAM; RANEY, 2012). Por exemplo, ele já foi utilizado com resultados positivos para a incorporação de testosterona (LEHNAM; RANEY, 2012), fármaco-modelo para estudos de permeação (BAERT *et al.*, 2010).

Tabela 11 – Fatores, níveis, coeficientes de contraste do planejamento experimental para o estudo da robustez e seus respectivos efeitos calculados.

Experimento	Matriz X								Vetores – Doseamento (%)			
	Média	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁₂	X ₁₃	X ₂₃	X ₁₂₃	P _{emuls}	E _{emuls}	E2-Biest	E3-Biest
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	103,98	102,43	87,29	97,40
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	98,38	105,17	0,00	98,40
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	98,86	99,05	101,50	101,7
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	96,39	102,64	0,00	97,80
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	99,03	102,28	103,21	99,88
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	103,31	112,44	0,00	101,44
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	93,48	106,04	97,02	96,43
8	1	1	1	1	1	1	1	1	96,61	107,17	0,00	96,42
9	1	0	0	0	0	0	0	0	107,45	112,55	95,55	101,64
10	1	0	0	0	0	0	0	0	105,65	107,89	104,54	101,10
11	1	0	0	0	0	0	0	0	106,69	107,75	100,41	99,63

Efeitos na quantificação				
Média	P _{emuls}	E _{emuls}	E2-Biest	E3-Biest
	100,90 ± 0,01	105,95 ± 0,82	62,68 ± 1,36	99,20 ± 0,31
<i>Efeitos principais</i>				
X ₁	-0,16 ± 0,03	4,41 ± 1,93	-97,26 ± 3,18	-0,18 ± 0,74
X ₂	-4,84 ± 0,03	-1,86 ± 1,93	2,00 ± 3,18	-1,35 ± 0,74
X ₃	-1,30 ± 0,03	4,66 ± 1,93	2,86 ± 3,18	-0,13 ± 0,74
<i>Interação de dois fatores</i>				
X ₁₂	0,49 ± 0,03	-2,04 ± 1,93	-2,00 ± 3,18	-1,46 ± 0,74
X ₁₃	3,87 ± 0,03	1,24 ± 1,93	-2,86 ± 3,18	0,96 ± 0,74
X ₂₃	-1,29 ± 0,03	1,10 ± 1,93	-5,10 ± 3,18	-2,88 ± 0,74
<i>Interação de três fatores</i>				
X ₁₂₃	-1,07 ± 0,03	-2,47 ± 1,93	5,10 ± 3,18	0,67 ± 0,74
t _v × S _{efeito}	2,74	8,31	13,69	3,17

Todos os experimentos proveram bom fator capacidade das colunas cromatográficas (>2.0), simetria dos picos analíticos (>1.0) e eficiência das colunas (número de pratos teóricos/metro > 500).

Colunas sombreadas indicam efeitos estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

X₁ = EtOH (%) na fase móvel

[P_{emuls}: -1 (63), 0 (65), 1 (67); E_{emuls}: -1 (43), 0 (45), 1 (47); Biest: -1 (33), 0 (35), 1 (37)].

X₂ = Temperatura da coluna (°C)

[P_{emuls}: -1 (43), 0 (45), 1 (47); E_{emuls}: -1 (33), 0 (35), 1 (37); Biest: -1 (42), 0 (45), 1 (47)].

X₃ = Fluxo da fase móvel (mL min⁻¹)

[P_{emuls}: -1 (1,0), 0 (1,2), 1 (1,4); E_{emuls}: -1 (1,0), 0 (1,2), 1 (1,4); Biest: -1 (1,0), 0 (1,2), 1 (1,4)].

Mesmo utilizando um veículo reconhecido na literatura, optou-se pela avaliação do processo de manipulação das emulsões. Isso porque uma das críticas direcionadas às preparações semissólidas, hormonais ou não, manipuladas ou não, é que, apesar da performance clínica eficiente, da menor incidência de irritação cutânea quando comparada a adesivos transdérmicos e à boa aceitação dos pacientes, o controle da dose aplicada é pouco precisa (LEICHTNAM, 2006). Para superar esta questão, uma validação do processo de manipulação foi realizada, a fim de se assegurar a reprodutibilidade e exatidão das doses. O primeiro passo nesse sentido foi garantir que a embalagem primária utilizada para dispensação das doses era adequada. Tais embalagens são desenhadas para que dispensem doses fixas, garantindo reprodutibilidade do tratamento do paciente. Duas embalagens de dois fornecedores distintos foram testadas, ambas com capacidade de dose de 1 mL, utilizando uma abordagem volumétrica para verificação da dose dispensada. Adicionalmente, os produtos foram passados ou não por moinho de rolos, para avaliar se esta etapa afeta a dose liberada pela embalagem. Os resultados se encontram na Tabela 12, e um teste *t* de Student comparando-se as médias obtidas com o valor de referência (1 mL) foi realizado para assegurar que as embalagens dispensavam a quantidade de emulsão designada pelos fabricantes.

O teste *t* retornou p-valores acima de 0,05 para ambas as embalagens, independentemente de as emulsões contidas terem sido passados pelo moinho de rolos ou não, o que sugere que ambas embalagens poderiam ser utilizadas. A embalagem denominada Embalagem 1 foi escolhida para os próximas etapas por ter apresentado menores coeficientes de variação.

O segundo passo foi a investigação da UC das emulsões, parâmetro mais relacionado à manipulação do que ao acondicionamento. Os resultados estão expostos na Tabela 13. Como pode ser visto, as formulações que passaram pelo moinho apresentaram maior UC do que as que não passaram, exceto por E_{emuls} . Isso indica que cada formulação deve ser estudada separadamente quanto a sua preparação, pois variações na qualidade do produto final podem ser detectadas caso se utilize um único processo geral. No caso de E_{emuls} e Biest, o moinho possui papel importante no processo de preparação e deve ser utilizado para se garantir a qualidade adequada dos produtos ao paciente.

Tabela 12 – Resultados da avaliação da dose dispensada por embalagens para emulsões transdérmicas.

Amostra (n=3)	Não passou pelo moinho ($d = 0,979214$)		Passado pelo moinho ($d = 0,922778$)	
	Embalagem 1	Embalagem 2	Embalagem 1	Embalagem 2
1	0,984	0,977	0,994	0,916
2	0,969	0,920	1,009	0,993
3	0,972	0,997	1,013	1,037
4	0,985	0,979	1,005	1,000
5	0,928	0,918	0,986	0,947
6	1,004	0,990	1,064	0,958
Média	0,973	0,963	1,012	0,975
Desvio padrão	0,026	0,035	0,027	0,043
CV (%)	2,647	3,672	2,701	4,436
Normalidade ^a	0,415	0,062	0,104	0,957
Teste t^b	0,053	0,052	0,339	0,218

CV = coeficiente de variação.

^a Teste da normalidade dos resíduos, ou teste de Shapiro-Wilk, nível de significância $p < 0,05$.^b p -valor do teste t de Student, nível de significância $p < 0,05$.

Tabela 13 – Uniformidade de Conteúdo das emulsões transdérmicas contendo hormônios, embaladas na Embalagem 1.

Unidade (%)	P - P _{emuls}		E2 - E _{emuls}		E2 - Biest		E3 - Biest	
	Passagem pelo moinho							
	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
1	88,94	90,55	95,17	84,76	120,00	95,65	80,24	91,09
2	88,26	88,68	97,15	78,71	74,00	91,46	99,23	91,28
3	86,19	88,54	100,27	79,39	99,48	99,44	100,42	98,50
4	83,31	91,49	100,31	81,51	101,75	94,27	86,25	93,45
5	80,34	95,81	102,96	70,63	86,56	95,52	111,89	94,35
6	90,70	96,00	98,36	81,14	112,28	98,12	100,21	95,44
7	88,27	94,22	98,64	84,04	101,67	97,23	117,25	95,62
8	84,11	94,76	107,43	82,18	94,70	99,25	92,44	97,10
9	80,73	96,98	97,53	82,99	96,70	93,32	97,42	89,85
10	89,47	88,14	101,01	84,60	95,29	91,12	94,93	92,99
Média	86,03	92,52	99,88	81,00	98,24	95,54	98,05	93,97
DP	3,71	3,42	3,45	4,18	12,67	3,00	10,91	2,77
VA	21,36	14,20	8,28	27,54	30,66	10,17	26,63	11,18

DP: desvio padrão. VA: valor máximo de aceitação = 15 (USP, 2014)

Os resultados conjuntos dos dois testes garantem que as doses utilizadas serão constantes ao longo dos demais testes, e que a uniformidade dos produtos é suficiente.

6.4 SELEÇÃO DO MEIO RECEPTOR PARA ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E DE PERMEAÇÃO

Para execução dos ensaios de liberação e permeação, a solubilidade dos hormônios em diferentes meios receptores foi testada, a fim de se determinar qual o mais adequado. Os resultados se encontram na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados da solubilidade máxima dos hormônios nos meios receptores.

<i>Meio receptor</i>	<i>Solubilidade média ($\mu\text{g mL}^{-1}$, $n = 3$)</i>		
	Progesterona	17- β -Estradiol	Estriol
TFS	30,52 \pm 2,31	20,64 \pm 1,45	190,86 \pm 23,32
TFS + 5% ASB	150,85 \pm 12,43	10,77 \pm 4,33	270,20 \pm 30,21
TFS + 0,5% HPCD	360,49 \pm 15,54	60,82 \pm 7,78	560,40 \pm 31,12
SHA	80,36 \pm 13,10	10,69 \pm 4,54	220,15 \pm 15,21
SHA + 5% ASB	210,12 \pm 20,98	30,57 \pm 9,21	300,27 \pm 27,55
SHA + 0.5% HPCD	270,84 \pm 10,21	20,98 \pm 6,76	550,87 \pm 30,08
FCS	60,80 \pm 10,36	10,67 \pm 3,01	190,49 \pm 19,92
FCS + 5% ASB	170,32 \pm 21,12	20,15 \pm 7,32	230,89 \pm 23,31
FCS + 0,5% HPCD	70,71 \pm 17,33	10,30 \pm 2,76	190,30 \pm 18,88
MeOH : H ₂ O (70:30, v/v)	905,78 \pm 101,78	664,78 \pm 57,71	815,74 \pm 89,76

TFS: tampão fosfato salino 0,01 M, pH 7,4. SHA: suor humano artificial. FCS: fluido corporal simulado. ASB: albumina sérica bovina. HPCD: hidroxipropil- β -ciclodextrina. MeOH: metanol. H₂O: água ultrapurificada.

Colunas sombreadas indicam as maiores solubilidades.

Como pode ser visto, a solubilidade foi de maneira geral baixa, quando comparada à solução de referência MeOH:H₂O, a qual foi utilizada por teoricamente ser capaz de solubilizar toda a quantidade de hormônio adicionada. Porém, o uso de tal solução como meio receptor não é praticável, uma vez que solventes orgânicos não são biocompatíveis para o estabelecimento de relações *in vitro* – *in vivo* (BAERT *et al.*, 2010). Além disso, foi verificado na prática que meios com alta concentração de solventes orgânicos danificam a pele durante os experimentos. Como uma concentração de 50 g L⁻¹ é aceita como a concentração média de albumina no sangue humano (VEERING *et al.*, 1990), 5% de ASB foi adicionada em todos os meios receptores de partida, a fim de dar um caráter mais

biorelevante aos mesmos. Como uma alternativa, 0,5% de HPCD foi adicionada ao invés de ASB, pela sua capacidade de formar micelas que ajudariam na solubilizações dos hormônios.

Apesar de menor que em MeOH:H₂O, as solubilidades ainda foram altas o suficiente para não serem um limitante dos processos de difusão do fármacos pelas membranas utilizadas nos estudos de liberação da droga e de permeação – uma vez que a quantidade de substância que permeia por hora é baixa, quando comparada às concentrações aqui testadas.

A partir da seleção do meio receptor mais adequado (no caso, TFS + 0,5% HPCD para todas as emulsões), novas curvas analíticas foram plotadas e nova avaliação da linearidade realizada, com o intuito de se verificar possíveis alterações nos parâmetros a serem utilizados para quantificação. Os resultados se encontram na Tabela 15, na qual se verifica que as curvas analíticas geradas podem ser utilizadas com segurança para quantificação dos hormônios nos meios receptores, uma vez que a ANOVA demonstra não haver falta de ajuste nos modelos lineares encontrados. Ainda com o objetivo de se avaliar a adequação dos métodos para emprego em estudos de liberação e permeação, corridas cromatográficas do meio receptor foram realizadas, e verificou-se que não há interferência do mesmo no pico cromatográficos dos hormônios. Desta forma, prosseguiu-se com os ensaios utilizando os métodos já validados.

Tabela 15 – Resultados do estudo de linearidade para emulsões diluídas em meio receptor.

Emulsão	Curva analítica		ANOVA ^d	Normalidade ^e	Homoscedasticidade ^f
	Inclinação	Intercepto			
P _{emuls} ^a	47559 (±964)	-126471 (±50105)	0,163	0,091	0,532
E _{emuls} ^b	76937(±1338)	83053 (±27450)	0,712	0,500	0,393
E2-Biest ^b	69845 (±1647)	-64646 (±33828)	0,390	0,589	0,355
E3-Biest ^c	59722 (±1001)	-68482 (±82377)	0,118	0,632	0,607

n=3 (replicatas genuínas). MeOH: metanol. M_R: meio receptor.

Faixa (µg mL⁻¹): ^a(35-65); ^b(14-26); ^c(56-104)

^d ANOVA, nível de significância $p < 0,05$.

^e Teste da normalidade dos resíduos, ou teste de Shapiro-Wilk, nível de significância $p < 0,05$.

^f Teste da homogeneidade dos resíduos (teste de Cochran), valor crítico = 0,684.

6.5 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Antes de se proceder aos ensaios de permeação propriamente ditos, realizou-se o teste de liberação. O teste de liberação de drogas (*drug release*, em inglês) é uma forma internacionalmente reconhecida para avaliar a liberação de fármacos de sistemas semissólidos e, portanto, prever o absorção percutânea destes produtos aplicados topicamente, mas ativos sistemicamente (BABY *et al.*, 2009). Ele é um teste que verifica a taxa de transferência de fármacos através de uma membrana sintética que simula a porosidade da pele humana, e é útil no estudo da cinética deste processo, além de funcionar como parâmetro de qualidade para o controle lote-a-lote dos produtos tópicos/transdérmicos. Porém, as aplicações não são limitadas a isso, porque ele também permite a caracterização e diferenciação de formulações, a verificação da qualidade dos produtos, e a avaliação comparativa de produtos inovadores com os já existentes no mercado (BABY *et al.*, 2009). Por exemplo, mudanças na formulação de um produto ou nas propriedades termodinâmicas das drogas contidas nele podem modificar a liberação do fármaco de sua matriz/veículo o que, por sua vez, afeta diretamente a permeação e a biodisponibilidade do produto (FDA, 1997). Comparativamente mais fácil e rápido que o teste de permeação cutânea, funciona também como um poupador de tempo, pois permite uma triagem das formulações antes de as submeter à permeação.

Os experimentos realizados neste trabalho foram desenhados de modo a prover dados cinéticos completos, e para isso três pré-requisitos foram respeitados: (i) dosagem infinita; (ii) uso de membrana sintética que não limite o fluxo dos hormônios para o compartimento receptor das células de difusão vertical; e (iii) uso de meio receptor que não somente mimetize as condições fisiológicas, mas também atue como um meio que garanta as condições *sink* necessárias para os hormônios (GUY; HAFGRAFT, 1990; REICHLING *et al.*, 2006).

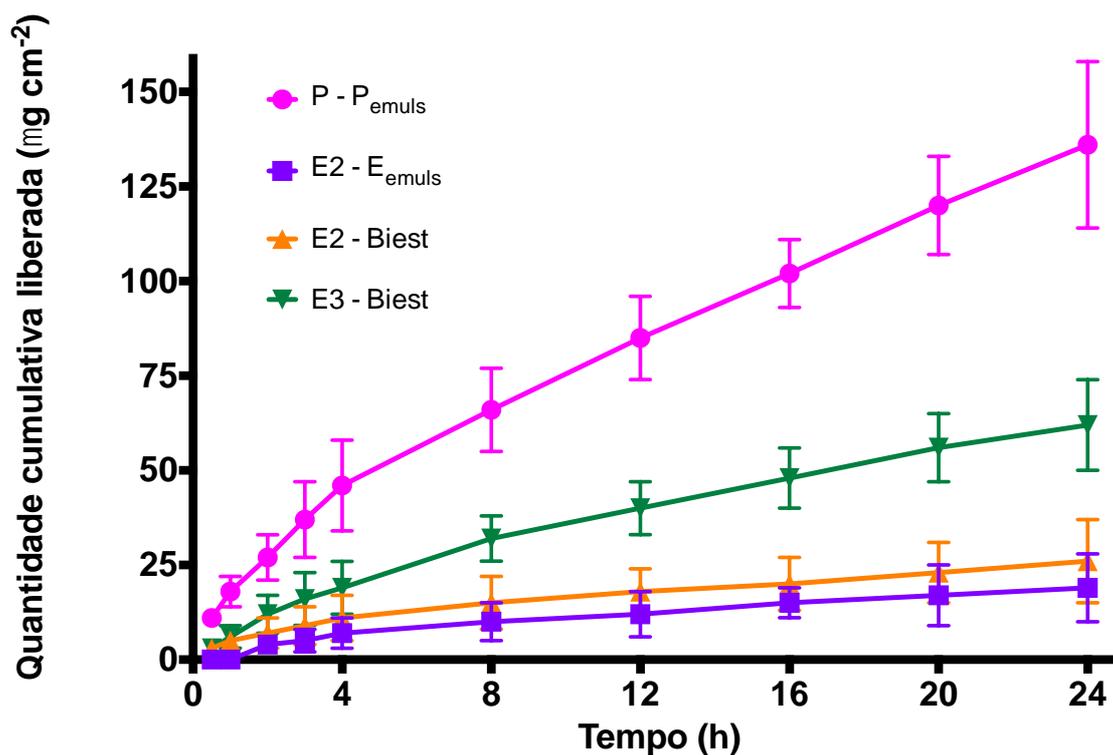
A dosagem infinita consiste na utilização de uma grossa camada de produto (usualmente acima de 200 mg, e neste estudo se utilizou 300 mg) para que haja um excesso de emulsão na câmara doadora e, desta forma, não haja limitação no fluxo dos hormônios (USP, 2013).

Especificamente sobre a utilização da membrana sintética, sua grande utilidade para a avaliação da cinética de liberação de fármacos de formulações semissólidas reside no fato de permitirem uma determinação da taxa de liberação máxima que os fármacos possuem a partir de suas formulações específicas (BABY *et al.*, 2009). O modelo da membrana sintética é o mais adequado para determinação da cinética de liberação porque as membranas

não são influenciadas pelo pH da formulação, o coeficiente de partição entre a droga e a pele ou fatores inerentes à fonte de obtenção de peles, incluindo sexo, idade e local de excisão (SHA; TOJO; CHIEN, 1992).

Partindo-se do desenho experimental proposto, os perfis *in vitro* de liberação dos hormônios a partir do veículo Pentravan foram construídos e se encontram no Gráfico 1. Os resultados obtidos foram então tratados matematicamente para determinar a cinética de liberação, empregando o modelo de regressão linear. Os dados foram modelados para modelos cinéticos, para verificar qual o mecanismo exato de liberação (Tabela 16). Estes modelos auxiliam na predição da taxa de liberação dos fármacos e também o comportamento durante a difusão dos mesmos a partir das formulações, o que é útil para o entendimento da física envolvida no fenômeno de transporte (SHARMA; WALKER; PATHAK, 2011).

Gráfico 1 – Perfis de liberação *in vitro* de hormônios sexuais femininos a partir de emulsões transdérmicas.



P: progesterona. E2: 17- β -estradiol. E3: estriol.

A partir da Gráfico 1, pode-se verificar que os perfis de liberação não foram lineares. De fato, os dados da Tabela 16 confirmam que a liberação segue mais um modelo de pseudo-primeira-ordem, também conhecido como modelo de Higuchi, ou seja, o mecanismo de liberação destes hormônios é um processo de difusão que obedece à lei de Fick, e é dependente da raiz quadrada do tempo – o que é típico de produtos do tipo matriciais. Nestes

casos, após um curto tempo de latência o fluxo de liberação momentâneo acompanha a profundidade da penetração do gradiente que se forma na emulsão durante o processo. A partir do momento em que a resistência gerada pela membrana se torna o fator dominante da cinética de liberação, a quantidade de hormônio liberada torna-se diretamente proporcional à \bar{t} . No gráfico, verifica-se que há um aumento lento e gradual na taxa de liberação até que um pico discreto é notado, seguido por uma liberação relativamente sustentada.

Tabela 16 – Modelos matemáticos para avaliação da cinética de liberação *in vitro* de hormônios sexuais femininos a partir de emulsões transdérmicas.

<i>Hormônio</i>	<i>Modelo cinético</i>	<i>Equação da reta</i>	R^2	J_s ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	T_L (<i>h</i>)
P (P_{emuls})	Ordem-zero	$y = 5,14x + 18,25$	0,983		
	Higuchi	$y = 29,36x - 13,10$	0,990	29,36	0,20
	Primeira-ordem	$y = 0,04x + 1,34$	0,819		
E2 (E_{emuls})	Ordem-zero	$y = 0,66x + 3,70$	0,981		
	Higuchi	$y = 4,21x - 1,99$	0,997	4,22	0,22
	Primeira-ordem	$y = 0,03x + 0,67$	0,884		
E2 (Biest)	Ordem-zero	$y = 0,89x + 5,52$	0,957		
	Higuchi	$y = 5,18x - 0,14$	0,997	5,18	0,01
	Primeira-ordem	$y = 0,03x + 0,76$	0,789		
E3 (Biest)	Ordem-zero	$y = 2,47x + 6,99$	0,972		
	Higuchi	$y = 14,2x - 8,39$	0,999	14,24	0,35
	Primeira-ordem	$y = 0,04x + 0,90$	0,737		

J_s : fluxo estacionário. T_L : tempo de latência. Resultados expressos como a média de seis réplicas.
P: progesterona. E2: 17- β -estradiol. E3: estriol.

Com relação à quantidade total liberada após as 24 h de experimentação, elas foram: 135,75 $\mu\text{g cm}^{-2}$ para P-Pemuls, 18,97 $\mu\text{g cm}^{-2}$ para E2-Eemuls, 25,52 $\mu\text{g cm}^{-2}$ para E2-Biest e 62,05 $\mu\text{g cm}^{-2}$ para E3-Biest.

Os dados foram complementados com a determinação do fluxo de liberação (J_s , $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) e do tempo de latência (T_L , h), parâmetros também expostos na Tabela 16. Dentre as formulações testadas, P (P_{emuls}) foi a que exibiu maior fluxo de liberação, o que

pode ser atribuído à natureza da molécula de progesterona e portanto à sua maior solubilidade na matriz/veículo, o que facilitaria a sua liberação da rede 3D da emulsão para o meio receptor. O fluxo de liberação é o parâmetro formulação-específico que pode ser usado para monitorar a qualidade dos produtos.

De maneira interessante, os tempos de latência foram todos próximos (12 – 21,6 min), com exceção de E2 em Biest, que foi extremamente baixo por comparação (0,6 min). Isso pode ter acontecido devido à maior concentração de E2 em Biest que em E_{emuls} e também a um efeito sinérgico entre E2 e E3 na formulação Biest.

De forma geral, entretanto, os resultados demonstram que o veículo Pentravan é um bom veículo para a administração transdérmica dos hormônios esteroidais femininos aqui estudados, uma vez que os libera em taxas altas. Partindo-se destes resultados positivos, foram realizados os ensaios de permeação utilizando os produtos transdérmicos sem necessidade de alteração nas formulações.

6.6 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *EX VIVO*

O protocolo utilizado para os estudos de permeação deste projeto diferem em alguns aspectos do protocolo padrão adotado para este tipo de estudo e dos estudos de liberação previamente realizados. Por exemplo, optou-se por realizar os experimentos com uma duração de 48 h, e não as convencionais 24 h. Essa opção foi tomada baseada na hipótese de que os pacientes, de maneira geral, têm utilizado atualmente superdosagem hormonal – e, portanto, partiu-se do princípio de que mantendo-se a dose, mas as espaçando 1 dia entre as aplicações, fosse uma alternativa plausível. Outra variação reside no fato de ter-se usado pele íntegra, *full thickness*. Isso foi selecionado porque a espessura da pele afeta sobremaneira o resultado de experimentos de permeação (KLANG *et al.*, 2012), então a utilização de pele sem dermatomização ajuda a mimetizar as condições fisiológicas de aplicação, um dos cerne de nosso desenho experimental. Para aferição da manutenção da função barreira da pele, foram feitas avaliações pré e pós-experimentos da TEWL. Os resultados pré-estudo demonstram que os discos possuíam boa homogeneidade de hidratação entre si ($41,4 \pm 1,2 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para o teste com P_{emuls} , $38,5 \pm 0,8 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para o teste com E_{emuls} e $43,6 \pm 1,6 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para o teste com Biest). Os resultados pós-estudo mantiveram a uniformidade ($45,7 \pm 2,1 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para o teste com P_{emuls} , $43,1 \pm 2,8 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para o teste com E_{emuls} e $49,1 \pm 3,4 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para o teste com Biest) e não diferiram estatisticamente dos resultados pré-estudo, com 95% de significância, o que sugere a manutenção da viabilidade da pele durante todo o

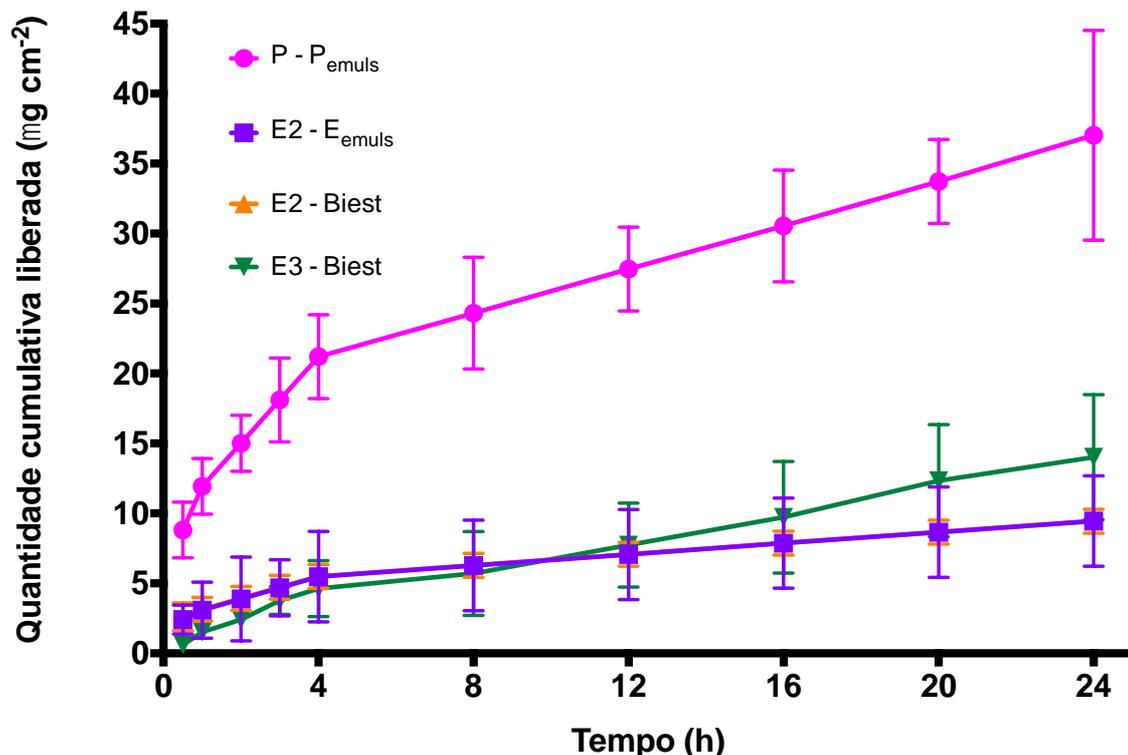
experimento. Isto ocorreu possivelmente porque a pele foi utilizada *full thickness*, uma vez que é esperado que a pele dermatomizada a 500 μm perca sua viabilidade após um experimento de 48h.

A dosagem finita foi optada porque é a mais recomendada para a permeação de sistemas semissólidos (GILLET *et al.*, 2011), e a quantidade exata utilizada foi determinada com base nas respostas que cada formulação gerava por CLAE, visto que é essencial que se consiga quantificar os fármacos em todos os tempos de coleta.

Finalmente, foi optado pela não oclusão do sistema, o que é arriscado do ponto de vista analítico por normalmente elevar o desvio padrão dos resultados, especialmente para experimentos de dose finita como é o caso em questão, mas a literatura indica que o fluxo de permeação média e a quantidade cumulativa permeada média não sofrem alteração (KLANG *et al.*, 2012).

Em suma, portanto, o protocolo seguiu o que seria o mais próximo das condições de uso *in vivo* das formulações. Tudo isso levado em consideração, os experimentos foram realizados, e os perfis de permeação podem ser vistos na Gráfico 2 e os dados cinéticos na Tabela 17.

Gráfico 2 – Perfis de permeação *ex vivo* de hormônios sexuais femininos a partir de emulsões transdérmicas.



P: progesterona. E2: 17- β -estradiol. E3: estriol.

Tabela 17 – Modelos matemáticos para avaliação da cinética de permeação *ex vivo* de hormônios sexuais femininos a partir de emulsões transdérmicas.

<i>Hormônio</i>	<i>Modelo cinético</i>	<i>Equação da reta</i>	R^2	J_s ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	T_L (h)	<i>Quantificado após 48 h</i> (μg % <i>da dose aplicada</i>)*
P (P _{emuls})	Ordem-zero	$y = 0,55x + 12,48$	0,946			
	Higuchi	$y = 4,55x + 5,28$	0,997	4,55	1,07	68,85 32,75
	Primeira-ordem	$y = 0,01x + 1,11$	0,826			
E2 (E _{emuls})	Ordem-zero	$y = 0,14x + 3,27$	0,947			
	Higuchi	$y = 1,15x + 1,45$	0,997	1,15	1,12	17,60 53,66
	Primeira-ordem	$y = 0,01x + 0,53$	0,837			
E2 (Biest)	Ordem-zero	$y = 1,34x + 3,35$	0,952			
	Higuchi	$y = 1,13x + 1,57$	0,997	1,13	1,18	17,57 44,48
	Primeira-ordem	$y = 0,01x + 0,54$	0,853			
E3 (Biest)	Ordem-zero	$y = 2,18x - 2,17$	0,975			
	Higuchi	$y = 0,27x + 1,10$	0,994	0,27	2,00	26,07 13,90
	Primeira-ordem	$y = 0,02x + 0,22$	0,787			

R^2 : coeficiente de determinação. J_s : fluxo estacionário. T_L : tempo de latência.
Resultados expressos como média de seis réplicas.

*Quantidade acumulada no meio receptor após as 48 h de experimento.

Com base nos resultados, pode-se notar que todos os hormônios atravessaram a pele humana, cada um em um fluxo diferente. P foi a droga com maior permeação ($37,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ no final do experimento – quantificado após 48 h, dado exposto da Tabela 17, dividido pela área de permeação das células de difusão vertical, igual a $1,86 \text{ cm}^2$). E2 e E3 em Biest alcançaram aproximadamente 4 vezes menos ($9,44 \mu\text{g cm}^{-2}$ para E2-Biest e $14,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ para E3-Biest). Além disso, os perfis de E2 em E_{emuls} e Biest foram aproximadamente os mesmos ($9,46 \mu\text{g cm}^{-2}$ para E2-E_{emuls}). Estes dados se encontram de acordo com a concentração hormonal em cada formulação.

Todas as formulações seguiram cinética de pseudo-primeira ordem (modelo de Higuchi), corroborando os resultados dos testes de liberação da droga. Utilizando a equação gerada por este modelo, os perfis de permeação foram complementados com a determinação do fluxo de permeação steady-state (J_s , $\mu\text{g cm}^{-1} \text{h}^{-1}$) e o tempo de latência (T_L , h), os quais variaram entre 1,07 (para P) e 2,00 (para E3).

De maneira geral, a difusão de substâncias através da pele é diretamente dependente de sua interação com os lipídeos intercelulares, bem como seu peso molecular, ou seja, quanto maior a interação com os lipídeos, menor a difusão através da pele. Interessante, ao se comparar o fluxo de permeação das formulações (de 0,27 em E3-Biest para 4,55 em P- P_{emuls}), verifica-se que os mesmos não podem ser compreendidos levando-se em conta somente estes dois fatores. O peso molecular foi inversamente proporcional ao fluxo, ou seja, as drogas mais leves tiveram maior fluxo ($E2 < E3 < P$). Quanto à lipofilicidade, nenhuma relação direta foi observada.

Outra observação a ser feita é a diminuição substancial que os fluxos sofreram de sua taxa de liberação *in vitro* para sua permeação *ex vivo*. Os fluxos máximos caíram na ordem de 3,7 vezes no caso de E2-Eemuls a até 52,7 vezes para E3-Biest. Estes fluxos *in vitro* são de fato esperados a serem maiores do que quando se utiliza pele humana de espessura total como membrana.

Geralmente se assume que a resistência à difusão do EC seja o único fator a ser vencido pelas drogas para se atingir a circulação sistêmica, mas no caso de substâncias lipofílicas como os hormônios esteroidais, a droga deve também ter a habilidade de escapar do ambiente confortável do EC para a epiderme viável abaixo, de natureza muito mais aquosa que a primeira (LEICHTNAM, 2006). A epiderme viável é nesse caso considerada então como limitante do fluxo por causa do fenômeno de *partitioning out* que afeta as substâncias lipofílicas. Este fenômeno pode explicar o fluxo baixo dos hormônios aqui detectados.

6.7 RETENÇÃO DA DROGA NA PELE

Considera-se como a quantidade real de droga que permeia a pele não somente aquela quantificada no meio receptor, mas também toda a quantidade de fármaco que ficou retida na derme – isso porque *in vivo* a derme é vascularizada, e portanto a droga que a atinge é capaz de chegar à circulação sanguínea (COLIPA, 1997). Como a pele *ex vivo* tem sua microcirculação obliterada, esta camada epitelial acaba por reter compostos que *in vivo* estariam na circulação sanguínea (OECD, 2004), o que é de particular importância para substâncias lipofílicas como os hormônios (BRONAUGH; STEWART, 1984).

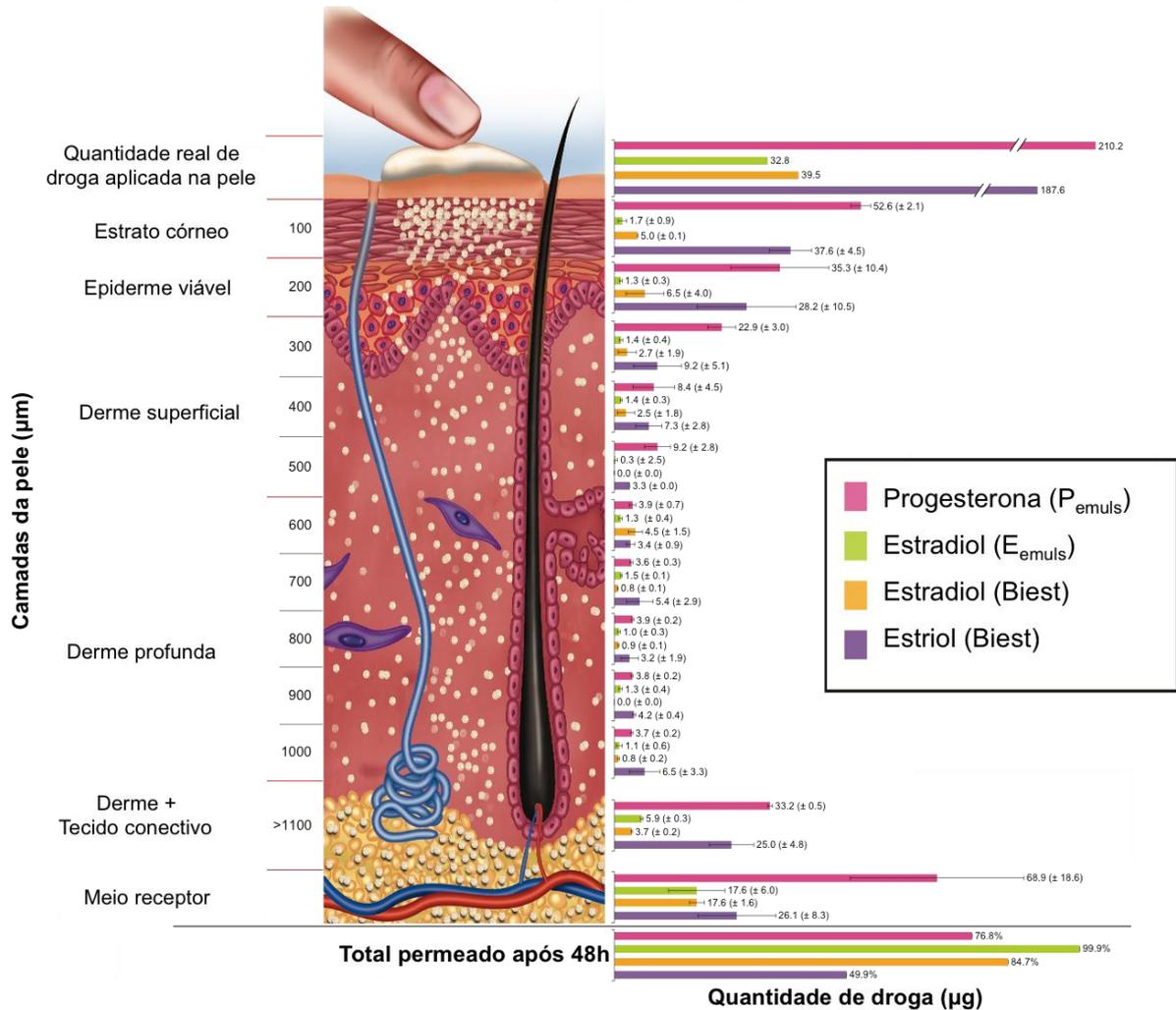
A epiderme *in vivo*, por sua vez, é constantemente renovada “de dentro para fora”, por um processo que envolve proliferação de células germinativas na camada basal, diferenciação das mesmas na camada espinhosa até atingir seu grau de funcionalização na camada granulosa, a partir da qual as células perdem seus núcleos quando chegam à camada

córnea, de onde acontece a descamação. Por causa desta renovação celular ininterrupta que ocorre na epiderme, o fármaco que se encontra na mesma após um experimento de permeação não pode ser considerado como permeado (ANDREWS *et al.*, 2013), pois o mesmo seria perdido *in vivo* via descamação ou até mesmo via secreção sebácea ou sudorese (OECD, 2004). Em outras palavras, é até possível que alguma parte da droga encontrada na epiderme possa vir a atingir a circulação sistêmica, mas este não é um evento que pode ser dado como certo.

A diferenciação entre o potencial *in vivo* das drogas na epiderme e na derme é uma das razões pelas quais optou-se pela utilização de uma técnica mais sofisticada que o *tape stripping* para determinar a retenção cutânea das drogas. O *tape stripping* é uma técnica conhecida e padronizada na área dermatológica que permite separar o EC da epiderme viável e da derme. A técnica utilizada neste trabalho tem a vantagem de separar estas duas camadas, e portanto fornece um painel mais completo do processo. Uma desvantagem, no entanto, é a dificuldade prática de se posicionar os discos de pele o mais planos o possível no micrótomo para realizar cortes precisos que de fato separem as camadas, ao invés de as misturarem – o que exige grande treinamento pré-análise.

Os resultados da retenção cutânea podem ser vistos na Figura 5, que fornece também uma visão geral do experimento em termos de absorção dos hormônios. A figura mostra que uma quantidade relativamente alta de hormônios ficou retida no EC e nas outras camadas epiteliais. É importante citar que a espessura do EC varia de acordo com variáveis como gênero, idade e sítio anatômico (GOEBEL *et al.*, 2009), e portanto divergências com trabalhos anteriores que mediram o EC podem existir. Apesar desta retenção, as drogas tiveram boa permeação. Uma grande quantidade foi encontrada em camadas mais profundas da pele, onde o tecido conectivo estava presente. E3-Biest apresentou a maior quantidade relativa de droga retida no EC e na epiderme, o que pode ser devido à difusão através da pele ser diretamente dependente da interação entre os lipídios intercelulares e também ao peso molecular das drogas – neste caso, E3 apresentou a menor interação com os lipídeos (menor $\log P_{o/w}$ entre os hormônios testados), além de possuir um maior peso molecular comparado a E2 (CAON *et al.*, 2010).

Figura 5 – Sumário dos resultados de permeação e retenção cutânea de hormônios sexuais femininos transdérmicos.



Fonte: o autor

Um outro dado que merece atenção é o de que praticamente metade da dose aplicada foi perdida/retida no espalhador da formulação. É possível que esta quantidade de droga não seja perdida *in vivo*, porque neste caso o espalhador seria o próprio dedo do paciente, que também é uma porta de entrada transdérmica. Entretanto, considerou-se que o paciente pode também lavar a mão após a aplicação, o que resultaria na perda efetiva da droga, e portanto considerou-se que a droga no espalhador foi perdida, e não contabilizada na permeação.

6.8 DISCUSSÃO COMPLEMENTAR

A Figura 5 e a Tabela 18 mostram o balanço de massas do estudo e apresentam alguns dados que permitem inferências sobre as formulações estudadas. A taxa de recuperação aceitável se situa entre 85-115%, e apesar de todos os estudos estarem dentro da faixa, pode-se notar que E3 apresentou a menor recuperação. Isso pode ter ocorrido devido a uma menor solubilidade relativa no meio receptor, o que ocasionou quantidades permeadas abaixo do limite de quantificação em alguns pontos de coleta.

Tabela 18 – Balanço de massas da do estudo de permeação transdérmica de emulsões contendo hormônios sexuais.

Parâmetro	P (P_{emuls})	E2 (E_{emuls})	E2 ($Biest$)	E3 ($Biest$)
Quantidade teórica aplicada (μg) ^a	470,0	40,0	55,8	223,2
Quantidade real aplicada (μg) ^b	210,2	32,8	39,5	187,6
Total permeado após 48 h (μg) ^c	161,4	32,7	33,4	93,6
Droga retida na epiderme (μg) ^d	87,8	3,0	11,5	65,7
Porcentagem de permeação por dose (%) ^e	76,8	99,9	84,7	49,9
Recuperação total do experimento (%) ^f	109,5	107,5	109,8	87,3

^a Quantidade total de emulsão colocada na câmara receptora ($5,0 \text{ mg cm}^{-2}$ para P_{emuls} , $21,5 \text{ mg cm}^{-2}$ para E_{emuls} e $28,4 \text{ mg cm}^{-2}$ para $Biest$).

^b Quantidade total aplicada (a) menos a quantidade retida no espalhador antes do início dos experimentos.

^c Hormônio quantificado no meio receptor + derme.

^d Hormônio quantificado no estrato córneo + epiderme viável (epiderme total).

^e Estimativa matemática da quantidade total de droga passível de permeação, de acordo com a dose aplicada $[(c/b) \times 100]$

^f Estimativa matemática: quantidade total de hormônio quantificada [no espalhador (a - b), no meio receptor (b) e nas camadas da pele (c)] dividida pela quantidade total de hormônio aplicada (a). Resultado expresso como porcentagem ($\times 100$).

Para progesterona, utilizando a porcentagem de permeação por dose (%), pode-se inferir que um paciente que faça uso de uma dose diária de 1g de emulsão que contenha 50 mg de P terá 38,4 mg de P liberada em sua corrente sanguínea, gradual e continuamente por 48 h. Teoricamente, isto seria 19 mg dia^{-1} , mas o processo segue cinética de Higuchi, e após

24 h de experimento havia uma quantidade cumulativa de 28,8 mg permeadas, ou seja, a permeação estabilizou no segundo dia / atingiu um platô.

A Injeção de Progesterona USP foi considerada a formulação padrão para comparação por causa de sua biodisponibilidade. Ela libera 5-10 mg/dia de hormônio para o tratamento de amenorreia e sangramento uterino disfuncional. Neste contexto, uma dose de 1 g de emulsão composta utilizando o referido veículo libera ainda mais hormônio que a injeção USP, mesmo quando usado a cada 2 dias. Isto posto, o uso do veículo Pentravan pode levar a uma mudança de paradigma para a terapia, em relação à dosagem hormonal. O paciente poderia, por exemplo, utilizar um quarto da dose de 1g ou a mesma quantidade de emulsão, mas com uma carga de P menor. Isto iria ao encontro do objetivo de baixar a dose necessária a ser utilizada pelo paciente, sem diminuir a eficácia.

Usando o mesmo raciocínio, E_{emuls} permearia praticamente a totalidade de E2 por dose (1,0 mg), aproximadamente 0,5 mg de E2 por dia. Esta quantidade de substância ativa é muito maior do que o praticado atualmente em produtos transdérmicos comerciais (0,025-0,1 mg/dia – Climara[®] patch; 0,025-0,1 mg/dia – Esclim[®] patch; 0,05-0,1 mg/dia – Estraderm[®] patch) utilizando para sintomas vasomotores climatéricos ou hipogonadismo, apesar de nenhum destes produtos estar disponível em formulações semissólidas.

Para Biest, a dosagem utilizada permearia quase 0,5 mg de E2 por dia e 2,0 mg de E3 por dia. Não há produto transdérmico industrializado disponível no mercado que possua esta associação, apesar de seu amplo emprego e comercialização em farmácias de manipulação. O raciocínio adotado para a permeação de E2 em E_{emuls} pode ser extrapolado para a mesma substância em Biest.

Como notado, uma questão a ser levantada a partir destes dados é a possibilidade de redução da quantidade de emulsão a ser aplicada por cada paciente, o que se espera aumentar a adesão à terapêutica. Neste caso, as embalagens a vácuo deveriam ser calibradas para a dispensação de doses de 300 mg, e não de 1 g. Isso facilitaria o espalhamento do produto pelo paciente. Isto só é possível porque o veículo utilizado neste estudo apresentou uma alta performance de liberação transdérmica para os hormônios, devido a sua capacidade de liberação de agentes terapêuticos por um longo período com uma taxa controlada e ainda de escapar do metabolismo hepático. Apesar de não ser possível a extrapolação destes resultados para outras drogas, espera-se que o mesmo seja válido para outros compostos carregados no veículo.

De acordo com os resultados, os hormônios sexuais femininos incorporados em Pentravan e aplicados topicamente são esperados a exercer suas ações sistêmicas com boa

eficácia, dada sua permeação satisfatória através da pele. Entretanto, cuidado deve ser dado em relação à quantidade de fármaco que permeia à partir da aplicação, a fim de se evitar superdosagem pelo paciente.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, as principais conclusões que se pode depreender deste estudo foram:

- Os métodos *eco-friendly* desenvolvidos para quantificação de hormônios sexuais femininos em emulsões transdérmicas foram adequados aos objetivos, o que foi comprovado através da validação dos mesmos;
- A avaliação do processo de manipulação das emulsões transdérmicas revelou que as embalagens à vácuo atualmente utilizadas por farmácias magistrais foram adequadas ao uso, e a utilização de moinho de rolos desempenhou papel fundamental na uniformidade de conteúdo de E_{emuls} e Biest;
- As taxas de liberação *in vitro* dos fármacos a partir de suas formulações foram adequadamente altas, e todas as formulações seguiram cinética de pseudo-primeira ordem, ou cinética de Higuchi, o que é típico de produtos semissólidos;
- O estudo de permeação *ex vivo* demonstrou que todas as formulações foram capazes de promover a absorção transdérmica dos hormônios em quantidades comparáveis ou superiores às praticadas atualmente por produtos industrializados. Isto pode ocasionar superdosagem nos pacientes e, portanto, uma mudança nas dosagens praticadas atualmente deve ser realizada.

REFERÊNCIAS

- ABDOU, H.; HANNA, S.; MUHAMMAD, N. Dissolução. In: GENNARO, A.R. Remington: a ciência e a prática da farmácia. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 2004, p.830.
- AKOMEAH, F. *et al.* Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 2, p. 337-345, 2004.
- ALLEVATO, M. Sistemas terapêuticos transdérmicos. **Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas y Estéticas**, v. 30, n. 3, p. 154-166, 2007.
- ALBERTS, B. *et al.* Histologia: vida e morte das células nos tecidos. In: _____. *Biologia Molecular da Célula*. Tradução de Ana Beatriz da Veiga *et al.* 4 ed. Porto Alegre : Artmed, 2004. p. 1259-1312.
- ANDREWS, S.N.; JEONG, E.; PRAUSNITZ, M.R. Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum. **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 1099-1109, 2013.
- ARCHER, D. F. *et al.* Transdermal estradiol gel for the treatment of symptomatic postmenopausal women. **Menopause**, v. 19, n. 6, p. 622-629, 2012.
- ARRUEBO, M. *et al.* Magnetic nanoparticles for drug delivery, **Nano Today**, v. 2, p. 22-32, 2007.
- ASBILL, C.; EL-KATTAN, A.; MICHNIAK, B. Enhancement of transdermal drug delivery: chemical and physical approaches. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 17, n. 6, p. 621-658, 2000.
- ASBILL, C.; MICHNIAK, B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 1, p. 36-41, 2000
- AZARMI, S.; ROA, W.; RÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 1, p. 12-21, 2007.
- BABY, A. R. *et al.* Influence of urea, isopropanol, and propylene glycol on rutin in vitro release from cosmetic semisolid systems estimated by factorial design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, p. 272-282, 2009.
- BAERT, B. *Et al.* A new discriminative criterion for the development of Franz diffusion tests for transdermal pharmaceuticals. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 218-230, 2010.
- BALAGUER-FERNÁNDEZ, C. *et al.* Sumatriptan succinate transdermal delivery systems for the treatment of migraine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 97, n. 6, p. 2102-2109, 2008.

BALL, A.; SMITH, K. Optimizing transdermal drug therapy. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 65, n. 14, p. 1337-1346, 2008.

BARRETT-CONNOR, E. Sex differences in coronary heart disease why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. **Circulation**, v. 95, 252-64, 1997.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4a. ed. Bookman : Porto Alegre, 2010. 414p.

BARRY, B. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 101-114, 2001.

BASSON, R. Testosterone therapy for reduced libido in women. **Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism**, v. 1, n. 4, p. 155-164, 2010.

BENOT, S. *et al.* Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. **Journal of Pineal Research**, v. 27, 27, p. 59-64, 1999.

BENSON, H. A. E.; WALTINKSON, A. C. Skin Structure, Function, and Permeation. In: _____. *Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*. Wiley, New York, p. 1-22, 2011.

BIRUSS, B.; Kählig, H.; Valenta, C. Evaluation of an eucalyptus oil containing topical drug delivery system for selected steroid hormones. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 142-151, 2007

BOOTHBY, L. A.; DOERING, P. L.; KIPERSZTOK, S. Bioidentical hormone therapy: A review. **Menopause**, v. 11, 2004.

BOULOUX, P. What is the best form of testosterone replacement therapy (TRT)? **Endocrine Abstracts**, v. 28, p. S3.3, 2012.

BRANDÃO, M. A. F. *et al.* A High Performance Liquid Chromatography method for determinations of hydroxyzine hydrochloride in syrup. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p. 1798-1802, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 48, de 6 de outubro de 2009. Dispõe sobre realização de alteração, inclusão, suspensão, reativação, e cancelamento pós-registro de medicamentos e dá outras providências. Disponível em: <www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/100764-48?format=pdf>. Acesso em: 11 mar. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e Bioanalíticos. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 11 mar. 2014.

BRAZIL, M. Drug delivery: Principles of penetration. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 372-373, 2005.

BRITISH Pharmacopoeia 2014. London: The Stationery Office, 2013.

BRONAUGH, R. L.; STEWART, R. F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 1255-1258, 1984.

BRUCE, D.; RYMER, J. Symptoms of the menopause. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 23, n. 1, p. 25-32, 2009.

BUBENIK, G. A. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, Suppl 2, p. 33-51, 2008.

BUBENIK, G. A.; KONTUREK, S. J. Melatonin and aging: prospects for human treatment. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 13-19, 2011.

BUEHLER, P. A woman's guide to bioidentical hormone replacement therapy. 2010. 23p.

BURGER, H. G. *et al.* A prospective longitudinal study of serum testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and sex hormone-binding globulin levels through the menopause transition. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 8, p. 2832-2838, 2000.

BUTSRIPOOM, B. *et al.* Premenstrual Syndrome among Thai Nurses: Prevalence, Impact and Self-management Strategies, **Thai Journal of Nursing Research**, v. 13, n. 4, p. 285-301, 2009.

CAON, T. *et al.* Evaluation of the transdermal permeation of different paraben combinations through a pig ear skin model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 391, p. 1-6, 2010.

CASTENSSON, S. Pharmaceutical Waste. In: KÜMMERER, K. [ed.]. **Pharmaceuticals in the Environment**. 3rd ed. Heidelberg: Springer, 2008. p. 489-499.

CEDERROTH, C. R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 304, n.1-2, p. 30-42, 2009.

CIRIGLIANO, M. Bioidentical Hormone Therapy: A Review of the Evidence. **Journal of Women's Health**, v. 16, n. 5, p. 600-631, 2007.

COLIPA, 1997. Cosmetic ingredients: Guidelines for percutaneous Absorption/ Penetration.

CONTRERAS, I.; PARRA, D. Estrogen Replacement Therapy and the Prevention of Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 57, n. 21, p. 1963-1971, 2000.

CORNOLDI, A. *et al.* Effects of chronic testosterone administration on myocardial ischemia, lipid metabolism and insulin resistance in elderly male diabetic patients with coronary artery disease. **International Journal of Cardiology**, v. 142, n. 1, p. 50-55, 2010.

CSÓKA, I. *et al.* *In vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 291, n. 1-2, p. 11-19, 2005.

CUNNINGHAM, G. R.; TOMA, S. M. Why is androgen replacement in males controversial? **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 1, p. 38-52, 2011.

D'ACAMPORA, A. J. *et al.* Histological analysis of the viability of half ovary autologous transplantation in retroperitoneal of rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 360-369, 2004.

DANIELS, R. Strategies for Skin Penetration Enhancement. CosmeticWeb. Disponível em: <<http://www.skin-care-forum.basf.com/en/author-articles/strategies-for-skin-penetration-enhancement/2004/08/12?id=5b9a9164-6148-4d66-bd84-6df76bd6d111&mode=Detail>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

DAVIS, S. R.; PANJARI, M.; STANCZYK, F. Z. DHEA Replacement for postmenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 6, p. 1642-1653, 2011.

DEEKS, A. *et al.* Risk perception in women: a focus on menopause. **Menopause**, v. 15, n. 2, p. 304-309, 2008.

DE LIGNIERES, B. Oral micronized progesterone. **Clinical Therapy**, v. 21, p. 41-60, 1999.

DOBS, A. S. *et al.* Short-term pharmacokinetic comparison of a novel testosterone buccal system and a testosterone gel in testosterone deficient men. **Current Medical Research and Opinion**, v. 20, n. 5, p. 729-738, 2004.

DONATI, S. *et al.* Menopause: Knowledge, attitude and practice among Italian women. **Maturitas**, v. 63, n. 3, p. 246-252, 2009.

DRUCKMANN, R. Dysfunctional uterine bleeding: from adolescence to menopause. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 3, n. 3, p. 461-467, 2010.

DWECK, A. C. Isoflavones, phytohormones and phytosterols. **Journal of Applied Cosmetology**, v. 24, p. 17-33, 2006.

EBELING, P. R.; HAIKERWAL, A. New therapies for postmenopausal osteoporosis. **Medicine Today**, v. 8, n. 10, p. 63-69, 2007.

ENSRUD, K. E. Frequency and severity of hot flashes and sleep disturbance in postmenopausal women with hot flashes. **Menopause**, v. 16, n. 2, p. 286-292, 2009.

ESCRIBANO, E. *et al.* Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 203-210, 2003.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 6.ed. Strasbourg : Council of Europe, 2008. 1084 p.

FARMACOPEA de los Estados Unidos Mexicanos. 8. ed. México, D.F. : Comisión Permanente de La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2004.

FARMACOPEIA Brasileira. 5.ed. Brasília : Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry on Nonsterile Semisolid Dosage Forms – Scale-up and Postapproval Changes: chemistry, manufacturing, and controls, In vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation, 1997.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry: Estrogen and estrogen/progestin drug products to treat vasomotor symptoms and vulvar and vaginal atrophy symptoms—Recommendations for clinical evaluation, 2003.

FILES, J. A.; KO, M. G.; PRUTHI, S. Bioidentical Hormone Therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 7, p. 673-680, 2011.

FOURNIER, A.; BERRINO, F.; CLAVEL-CHAPELON, F. Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 10791, p. 103-111, 2008.

FRANCISCO, L. Is bio-identical hormone therapy fact or fairy tale? **The Nurse Practitioner**, v. 28, n. 39, p. 39-44, 2003.

GERDES, A. M.; IERVASI, G. Thyroid replacement therapy and heart failure. **Circulation**, v. 122, n. 4, p. 385-393, 2010.

GIAGULLI, V. A. *et al.* Evidence-based medicine update on testosterone replacement therapy (TRT) in male hypogonadism: focus on new formulations. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 15, p. 1500-1511, 2011.

GILLET, A.; EVRARD, B.; PIEL, G. Liposomes and parameters affecting their skin penetration behavior. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, p. 35-42, 2011.

GOEBEL, A. S. B.; WOHLRAB, J.; NEUBERT, R. H. H. Quantification of tacrolimus in human skin samples and ointment by LC-MS. **Chromatographia**, v. 70, p. 581-584, 2009.

GOODMAN, M. P. Are all estrogens created equal? A review of oral vs transdermal therapy. **Journal of Women's Health**, v. 21, p. 161-169.

GUY, R. H. Transdermal drug delivery. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 197, p. 399-410, 2010.

GUY, R. H.; HAFGRAFT, J. On the determination of drug release rates from topical dosage forms, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 60, p. R1-R3, 1990.

HAFGRAFT, J.; VALENTA, C. pH, pKa and dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, n. 2, p. 243-247, 2000.

HAMEED, A.; BROTHWOOD, T.; BOULOUX, P. Delivery of testosterone replacement therapy. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 4, n. 10, p. 1213-1219, 2003.

HARRIS, I. D.; SCHLAFF, W. D. Irregular Bleeding during the Menopause Transition, in Disorders of Menstruation (eds P. B. Marshburn and B. S. Hurst), Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2011.

HEATHOUT, R. M. *et al.* Microemulsions formulations for the transdermal delivery of testosterone. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 188-196.

HOOPER, L. *et al.* Effects of soy protein and isoflavones on circulating hormone concentrations in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 4, p. 423-440, 2009.

HUANG, A. J. *et al.* Vaginal symptoms in postmenopausal women: self-reported severity, natural history, and risk factors. **Menopause**, v. 17, n. 1, p. 121-126, 2010.

HULLEY, S. *et al.* Randomized Trial of Estrogen Plus Progestin for Secondary Prevention of Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women. Heart and estrogen/ progestin Replacement study (HERS) Research Group. **Journal of the American Medical Society**, v. 280, n. 7, p. 605-613, 1998.

HUZIL, J. T. *et al.* Drug delivery through the skin: molecular simulations of barrier lipids to design more effective noninvasive dermal and transdermal delivery systems for small molecules, biologics, and cosmetics. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 5, p. 449-462, 2011.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology (Q2BR1), Geneva, 2005.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Padronização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JACOBI, U. *et al.* Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 1, p. 61-71, 2005.

JANOWSKY, J.; CHAVEZ, B.; ORWOLL, E. Sex steroids modify working memory. **Journal of Cognitive Neuroscience**, Boston, v. 12, n. 3, p. 407-414, 2002.

JAPANESE Pharmacopoeia. 15. ed. Disponível em:
<<http://jpdb.nihs.go.jp/jp15e/JP15.pdf>>. Acesso em: 07 jul. 2011.

JOCKENHÖVEL, F. Testosterone supplementation: what and how to give. **Ageing Male**, v. 6, p. 200-206, 2003.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. Pele e Anexos. In: _____. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan , 2004. p. 359-370.

KALIA, Y.; GUY, R. H. Modeling transdermal drug release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1-2, p. 159-172, 2001.

KANG, L. *et al.* Physicochemical studies of lidocaine–menthol binary systems for enhanced membrane transport. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 206, n. 1-2, p. 35-42, 2000.

KARANDE, P. *et al.* Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 13, p. 4688-4693, 2005.

KHOO, S. K. *et al.* Postmenopausal hormone therapy and cognition: effects of timing and treatment type. **Climacteric**, v. 13, n. 3, p. 259-264, 2010.

KLANG, V. *et al.* Effect of γ -cyclodextrin on the *in vitro* skin permeation of a steroidal drug from nanoemulsions: impact of experimental setup. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 535-542, 2012.

KOULOURI, O. *et al.* Diagnosis and treatment of hypothyroidism in TSH deficiency compared to primary thyroid disease: pituitary patients are at risk of under-replacement with levothyroxine. **Clinical Endocrinology**, v. 74, n. 6, p. 744-749, 2011.

KREILGAARD, M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, suppl. 1, p. S99-S121, 2002.

KRISHNAN, G. *et al.* Enhanced skin permeation of naltrexone by pulsed electromagnetic fields in human skin *in vitro*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 2724-2731, 2010.

KULAK JUNIOR, J. *et al.* Serum androgen concentrations and bone mineral density in postmenopausal ovariectomized and non-ovariectomized women. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 8, p. 1033-1039, 2009.

KULKARNI, P. R. *et al.* Transferosomes: an emerging tool for transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 4, p. 735-741, 2011.

KUMAR, B.; JAIN, S. K.; PRAJAPATI, S. K. Effect of penetration enhancer DMSO on *in vitro* skin permeation of acyclovir transdermal microemulsion formulation. **International Journal of Drug Delivery**, v. 3, n. 1, p. 83-94, 2011.

KUMAR, R. Ethosomes: novel vesicular carriers in transdermal drug delivery. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 2, n. 6, p. 1-7, 2010.

LABRIE, F. Neuroendocrinology - Pathological Situations and Diseases. **Progress in Brain Research**, v. 182, p. 97-148, 2010.

LARIMORE, W. Natural Medications (Herbs, Vitamins, and Supplements) for Menopausal Symptoms. AAFP Annual Scientific Assembly San Diego, CA 60-Minute Seminar September 19 and 20, 2008, 40 p.

- LEHMAN, P. A.; RANEY, S. G. *In vitro* percutaneous absorption of ketoprofen and testosterone: comparison of Pluronic Lecithin Organogel vs. Pentravan cream. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 16, p. 248-252, 2012.
- LEIBLUM, S. R. *et al.* Vaginal Dryness: A Comparison of Prevalence and Interventions in 11 Countries. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 6, n. 9, p. 2425-2433, 2009.
- LEICHTNAM, M. L. *Et al.* Identification of penetration enhancers for testosterone transdermal delivery from spray formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 12, p. 57-62, 2006.
- LERMER, M. A. *et al.* Somatic and affective anxiety symptoms and menopausal hot flashes. **Menopause**, v. 18, n. 2, p. 129-132, 2011.
- LIFE, J. S. *The Life Plan: How Any Man Can Achieve Lasting Health, Great Sex, and a Stronger, Leaner Body.* 1st ed. New York: Atria Books; 2011. 352p.
- LING, S. *et al.* Cardiovascular Physiology of Androgens and Androgen Testosterone Therapy in Postmenopausal Women. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 9, n. 1, p. 29-37, 2009.
- LOOSE-MITCHELL, D. S.; STANCEL, G. M. Estrogênios e progestogênios. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GOODMAN GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica*, Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 2005. cap. 58, p. 1201-1230.
- MARDER, M. Z.; JOSHI, U.; MANDEL, I. D. Estrogen concentration in human parotid and submaxillary saliva. **Journal of Dental Research**, v. 58, p. 2370, 1979.
- MAYBIN, J. A.; CRITCHLEY, H. O. D. Progesterone: a pivotal hormone at menstruation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, p. 88-97, 2011.
- MEGWA, S. *et al.* Ion-pair formation as a strategy to enhance topical delivery of salicylic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 8, p. 919-928, 2000.
- MEIDAN, V.; BONNER, M.; MICHNIAK, B. Transfollicular drug delivery – Is it a reality?. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 306, n. 1-2, p. 1-14, 2005.
- MITRAGOTRI, S. Synergistic Effect of Enhancers for Transdermal Drug Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 11, 1354-1359, 2000. 63
- MITRAGOTRI, S.; KOST, J. Low-Frequency Sonophoresis: A Noninvasive Method of Drug Delivery and Diagnostics. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 3, p. 488-492, 2000.
- MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*, 6th ed. Wiley, New York, 2005.
- MONTPLAISIR, J. *et al.* Sleep in menopause: differential effects of two forms of hormone replacement therapy. **Menopause**, v. 8, n. 1, p. 10-16, 2001.

MORSE, C. A.; RICE, K. Memory after menopause: preliminary considerations of hormone influence on cognitive functioning. **Archives of Women's Mental Health**, v. 8, p. 155-162, 2005.

MUKHERJEE, B. *et al.* A comparison between povidone-ethylcellulose and povidone-eudragit transdermal dexamethasone matrix patches based on *in vitro* skin permeation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, n. 3, p. 475-483, 2005.

MURTHY, S. Magnetophoresis: an approach to enhance transdermal drug diffusion. **Pharmazie**, v. 54, n. 5, p. 377-379, 1999.

MURTHY, S.; SAMMETA, S. M.; BOWERS, C. Magnetophoresis for enhancing transdermal drug delivery: Mechanistic studies and patch design. **Journal of Controlled Release**, v. 148, p. 197-203, 2010.

NAPPI, R. E. *et al.* Menopause and sexual desire: the role of testosterone. **Menopause International**, v. 16, p. 162-168, 2010.

NOKHODCHI, A. *et al.* The effect of glycyrrhizin on the release rate and skin penetration of diclofenac sodium from topical formulations. **Il Farmaco**, v. 57, n. 11, p. 883-888, 2002.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidance document for guidance of skin absorption studies, in: OECD Series on Testing and Assessment No. 28. 2004.

PALACIOS, S. *et al.* Knowledge and compliance from patients with postmenopausal osteoporosis treatment. **Menopause International**, v. 15, p. 113-119, 2009.

PATEL, S. *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of the transdermal iontophoretic delivery of sumatriptan succinate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 296-301, 2007.

PEET, D. Menopause and HRT. **InnovAiT**, v. 2, n. 1, p. 10-16, 2009.

PEREIRA, D. H. Reposição Hormonal Masculina e Feminina. In: Maio M. Tratado de Medicina Estética. 1a. ed. São Paulo: Roca; 2004. cap. 114, p. 1789-1817.

PHARMACOPOEIA of the People's Republic of China. Beijing : People's Medical Publishing House, 2005.

PIKAL, M. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 281-305, 2001.

PINES, A. Where postmenopausal hormone therapy stands today. **Hormones**, v. 8, n. 4, p. 227-231, 2009.

POLONINI, H. C. Transdermal formulations containing human sexual steroids: development and validation of methods and *in vitro* drug release. **Química Nova**. No prelo.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 1261-1268, 2008.

PRAUSNITZ, M.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature**, v.3, n.2, p. 115-124, 2004.

PRISTA, L. *et al.* Preparações Transdérmicas. In : _____. Tecnologia Farmacêutica. 6 ed. Lisboa : Calouste Gulbenkian, 1996. p. 1410-1430.

RADERMARCHER, J. *et al.* Diclofenac concentrations in synovial fluid and plasma after cutaneous application in inflammatory and degenerative joint disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, n. 5, p. 537-541, 1991.

RAMACHANDRAN, C.; FLEISHER, D. Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 42, n. 3, p. 197-223, 2000.

RAMTEKE, K. H.; DHOLE, S. N.; PATIL, S. V. Transdermal drug delivery system: a review. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 3, n. 1, p. 22-35, 2012.

RAO, R.; NANDA, S. Sonophoresis: recent advancements and future trends. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 6, p. 689-705, 2009.

RECKELHOFF; J. F.; ROM, R. J. Androgens and Hypertension: Role in Both Males and Females? **Hypertension**, v. 57, p. 681-682, 2011.

REICHLING, J. *et al.* In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 222-228, 2006..

RITSNER, M. S. The clinical and therapeutic potentials of dehydroepiandrosterone and pregnenolone in Schizophrenia. **Neuroscience**, Amsterdam, v. 191, p. 91-100, 2011.

RIVIERE, J.; PAPICH, M. Potential and problems of developing transdermal patches for veterinary applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 3, p. 175-203, 2001.

ROLF, C. *et al.* Interpersonal testosterone transfer after topical application of a newly developed testosterone gel preparation. **Clinical Endocrinology**, v. 56, n. 5, 637-641, 2002.

ROTHER, M. *et al.* Efficacy and safety of epicutaneous ketoprofen in Transfersome (IDEA-033) versus oral celecoxib and placebo in osteoarthritis of the knee: multicentre randomised controlled trial. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 66, p. 1178-1183, 2007.

ROUSSOW, J. E. *et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 3, p. 321-333, 2002.

ROXHEAD, N. A fully integrated microneedle-based transdermal drug delivery system. Tese de Doutorado. Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, 2007. 82p.

SANAEI-ZADEH, H.; ZAMANI, N.; SHADNIA, S. Outcomes of visual disturbances after methanol poisoning. **Clinical Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 102-107, 2009.

SANDRA, P. *et al.* Green Chromatography (Part 1): Introduction and Liquid Chromatography. **LCGC Europe**, v. 23, 2010.

SANTORO, N. Evidence-Based Approach to Menopause Symptoms of Menopause: Hot Flashes. **Clinical Obstetrics & Gynecology**, v. 51, n. 3, p. 539-548, 2008.

SAVARD, M. *et al.* Changes in self-reported hot flashes and their association with concurrent changes in insomnia symptoms among women with breast cancer. **Menopause**, v. 18, n. 9, p. 985-993, 2011.

ŞENYİĞİT, T. *et al.* Different approaches for improving skin accumulation of topical corticosteroids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, n. 1-2, p. 155-160, 2009.

SHAH, H. S.; TOJO, K.; CHIEN, Y. W. Transdermal controlled delivery of verapamil: determination of in vitro/in vivo relationship, **Journal of Controlled Release**, v. 22, p. 133-139, 1992.

SHARMA, R.; WALKER, R. B.; PATHAK, K. Evaluation of the kinetics and mechanism of drug release from econazole nitrate nanosponge loaded carbapol hydrogel. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 45, p. 25-31, 2011.

SHETH, P. Skin Care and Diseases. Disponível em:
<<http://www.netwellness.org/healthtopics/skincare/youandyourskin.cfm>>. Acesso em: 11 mar 2014.

SINGH, I.; MORRIS, A. P. Performance of transdermal therapeutic systems: Effects of biological factors. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 1, n. 1, p. 4-9, 2011.

SINHA, V.; KAUR, M. Permeation enhancers for transdermal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 11, p. 1131-1140, 2000.

SITES, C. K. **Bioidentical hormones for menopausal therapy**. *Women's Health*, v. 4, n. 2, p. 163-171, 2008.

SITRUK-WARE, R. *et al.* Oral micronized progesterone: bioavailability pharmacokinetics, pharmacological and therapeutic implications — A review. *Contraception*, New York, v. 36, n. 4, p. 373-402, 1987.

SMITH, S.; IRWIN, W. Ionisation and the effect of absorption enhancers on transport of salicylic acid through silastic rubber and human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 210, n. 1, p. 69-82, 2000.

SONI, M.; KUMAR, S.; GUPTA, G. D. Transdermal drug delivery: A novel approach to skin permeation. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, p. 1184-1190, 2009.

SOOD, R. *et al.* Counseling Postmenopausal Women about Bioidentical Hormones: Ten Discussion Points for Practicing Physicians. **Journal of the American Board Family Medicine**, v. 24, n. 2, 2011.

STOTT, P.; WILLIAMS, A.; BARRY, B. Mechanistic study into the enhanced transdermal permeation of a model β -blocker, propranolol, by fatty acids: a melting point depression effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 219, n. 1-2, p.161-176, 2001.

STUENKEL, C. A.; DUDLEY, R. E.; YEN, S. S. Sublingual administration of testosterone-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex simulates episodic androgen release in hypogonadal men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 72, n. 5, p. 1054-1059, 1991.

SWERDLOFF, R. S. *et al.* Long-term pharmacokinetics of transdermal testosterone gel in hypogonadal men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 12, p. 4500-4510, 2000.

TANNER, T.; MARKS, R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. **Skin Research and technology**, v. 14, n. 3, p. 249, 260, 2008.

TAYLOR, E. B.; TAYLOR, A. B. Are Your hormones making you sick?: A woman's guide to better health through hormonal balance. Atlanta: Physicians, Natural Medicine; Jan. 2000.

TAYLOR, M. Unconventional estrogens: Estriol, biest, and triest. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 44, p. 864-879, 2001.

TEPHLY, T. R. The toxicity of methanol. **Life Sciences**, v. 48, n. 11, p. 1031-1041, 1991.

TIRNAKSIZ, F.; YUCE, Z. Development of transdermal system containing nicotine by using sustained release dosage design. **II Farmaco**, v. 60, n. 9, p. 763-770, 2005.

TOUITOU, E. *et al.* Liposomes as carriers for topical and transdermal delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 9, p. 1189-1203, 1994.

USP – The United States Pharmacopeia. 37. ed. Rockville : United States Pharmacopeial Convention, 2014.

UTIAN, W. *et al.* Estrogen and Progestogen Use in Postmenopausal Women: 2010 Position Statement of the North American Menopause Society. **Menopause**, v. 17, n. 2, p. 242-255, 2010.

VEERING, B. T. *et al.* The effect of age on serum concentrations of albumin and alpha 1-acid glycoprotein, **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 201-206, 1990.

VERAS, A. B. *et al.* Prevalence of depressive and anxiety disorders in a Brazilian outpatient sample of menopausal women. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 28, n. 2, p. 130-134, 2006.

VILLAREAL, D. T.; HOLLOSZY, J. O.; KOHRT, W. M. Effects of DHEA replacement on bone mineral density and body composition in elderly women and men. **Clinical Endocrinology**, v. 53, n. 5, p. 561-568, 2000.

VILLARINO, N.; LANDONI, M. Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. **Analecta Veterinaria**, v. 26, n.1, p. 28-37, 2006.

VINING, R. F.; MCGINLEY, R. A. The measurement of hormones in saliva: Possibilities and pitfalls. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 27, n. 1-3, p. 81-94, 1987.

VINING, R. F.; MCGINLEY, R. A.; SYMONS, R. G. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. **Clinical Chemistry**, v. 29, p. 1752-1756, 1983.

WALKER, C. R. Bioidentical hormone replacement therapy. A natural option for perimenopause and beyond. **Advance for Nurse Practitioners**, v. 9, n. 39, p. 39-42, 2001.

WALLACE, M. *et al.* Topical delivery of lidocaine in healthy volunteers by electroporation, electroincorporation, or iontophoresis: An evaluation of skin anesthesia. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 26, n. 3, p. 229-238, 2001.

WARNER, R.; STONE, K.; BOISSY, Y. Hydration Disrupts Human Stratum Corneum Ultrastructure. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, p. 275-284, 2003.

WEAVER, J. Electroporation of cells and tissues: nonthermal medical/biological treatments using electromagnetic waves and ionized gases. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 28, n. 1, p. 24-33, 2000.

WEISENBACH, T. M. Nature made: Bioidentical hormone therapy for menopausal and perimenopausal patients. **Advance for Nurse Practitioners**, v. 12, n. 8, p.77-80, 2004.

WERMELING, D. P. *et al.* Microneedles permit transdermal delivery of a skin-impermeant medication to humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 6, p. 2058-2063, 2008.

WILLE, J. **Skin Delivery Systems : Transdermals, Dermatologicals and Cosmetic Actives**. Blackwell Publishing, 2006. 392 p. Disponível em: <http://books.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=xBe1RM6flrMC&oi=fnd&pg=PA277&dq=laurocapram&ots=_dJ5UnImJf&sig=u9O21qQGxF9rK_oYTo4rw-RkGeY>. Acesso em: 25 mar. 2014.

WOODS, N. F. Menopause, symptoms, and quality of life: time for a theoretical framework. **Menopause**, v. 17, n. 5, p. 892-893, 2010.

WU, J. *et al.* Programmable transdermal drug delivery of nicotine using carbon nanotube membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 26, p. 11698-11702, 2010.

YASMIN, N. *et al.* Menopause and Hormone Therapy. **Bangladesh Medical Journal**, v. 36, n. 2, p. 48-51, 2007.

YOON, K. D.; KIM, J. Preparative separation of dioscin derivatives from *Dioscorea villosa* by centrifugal partition chromatography coupled with evaporative light scattering detection. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 2486-2491, 2008.

ZAHAR, S. E. V. *et al.* Quality of life in users and non-users of hormone replacement therapy. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 51, n. 3, p. 133-138, 2005.

ZHANG, J. *et al.* Influence of ion-pairing and chemical enhancers on the transdermal delivery of meloxicam. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 6, p. 663-670, 2009.

CAPÍTULO 2
ECOTOXICIDADE AQUÁTICA DE MICRO E NANOPARTÍCULAS
DE TITANATO DE BÁRIO

1 INTRODUÇÃO

O titanato de bário (BaTiO_3 , BT) é um óxido do tipo perovskita tradicionalmente conhecido por ser um material semicondutor/ferroelétrico com notável constante dielétrica e, portanto, alta empregabilidade no campo da eletrocerâmica (CIOFANI *et al.*, 2010a; SU *et al.*, 2013). Não obstante, a introdução efetiva de BT em nanoescala na indústria e nas rotinas de laboratório trouxe novas aplicações em medicina para tal material. Graças às suas propriedades piezoelétricas/dielétricas peculiares (CIOFANI *et al.*, 2013), sistemas de cerâmica feitos de BT foram investigados com foco na sua utilização como nanocarreadores intracelulares para proteínas e fármacos de baixo peso molecular, tais como doxorubicina (CIOFANI *et al.*, 2010a; 2010b); como biomarcadores, através da bioconjugação dos seus nanocristais com anticorpos imunoglobulina G para sondas de imagem (HSIEH *et al.*, 2010); e como matéria prima para enxertos ósseos (BALL *et al.*, 2013).

No entanto, o uso cada vez maior deste e também de outros nanomateriais levou a um aumento em sua liberação para o meio ambiente (HANDY *et al.*, 2008; CULLEN *et al.*, 2011). Até então, alguns estudos têm demonstrado que partículas nanométricas podem levar a efeitos ecotoxicológicos inesperados e diferentes dos causados pelo material de origem, mesmo quando este seja relativamente inerte (HANDY *et al.*, 2008). Neste contexto, a nanoecotoxicologia tem gradualmente se firmado como um campo de pesquisa multidisciplinar imprescindível para a elucidação do real impacto destes novos materiais no ambiente.

Por ser um tema relativamente novo, ainda é incerto se o impacto ambiental dos materiais é inversamente proporcional ao seu tamanho. Além disso, pode-se observar que não apenas o tamanho influencia a reatividade dos materiais, mas também uma vasta gama de outras propriedades que têm de ser avaliadas quando da realização de ensaios toxicológicos. Para Jiang *et al.* (2008), por exemplo, até que as relações entre as características de nanopartículas e de toxicidade sejam completamente compreendidas, é necessário garantir que todas as suas características potencialmente significativas sejam medidas.

Como a determinação de todas essas características é praticamente impossível, alguns autores identificaram um conjunto de propriedades principais que devem ser abordados em estudos toxicológicos, que são: tamanho, estado de dispersão, carga de superfície, forma, composição química, área superficial e química de superfície (OBERDORSTER *et al.*, 2005a; 2005b; POWERS *et al.*, 2006). Além disso, é fundamental que a caracterização dos materiais seja realizado em meios biorelevantes para os ensaios de toxicidade pretendidos (JIANG *et*

al., 2009), ou seja, aqueles em que os experimentos ecotoxicológicos serão realizados. Isso porque alterações físico-químicas potenciais (por exemplo, a aglomeração/agregação e variação na carga de superfície) podem ocorrer com as partículas em soluções diferentes, o que, por sua vez, pode ter impacto direto sobre as respostas toxicológicas (POWERS *et al.*, 2007).

Neste estudo, partículas de BT com dois tamanhos distintos, da ordem micrométrica e manométrica, foram avaliadas quanto ao seu impacto em ambientes aquáticos. Uma caracterização detalhada dos materiais foi realizada, envolvendo sua composição química, sua forma e tamanho, seu estado de dispersão e a carga, área e química de sua superfície. A seguir, utilizou-se três micro-organismos aquáticos, sendo duas algas (*Chlorella vulgaris* e *Euglena gracilis*) e uma cianobactéria colonial (*Anabaena flos-aquae*), como organismos-modelo para avaliação da grau de toxicidade destes materiais e seu mecanismo de ação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma das áreas do conhecimento humano que mais se desenvolve, beneficiando segmentos distintos como as indústrias de eletrônicos, de cosméticos, agropecuária, farmacêutica, médica, entre outras (MAHMOOD *et al.*, 2012, BRAYNER *et al.*, 2011). O grande diferencial dos materiais nanoestruturados é a potencialização de suas propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas. Isto ocorre porque na escala nanométrica as estruturas revelam características peculiares e viabilizam produtos finais mais eficientes, leves e resistentes (MOORE, 2006; KOLAKOVIC *et al.*, 2011).

2.1.1 Conceitos

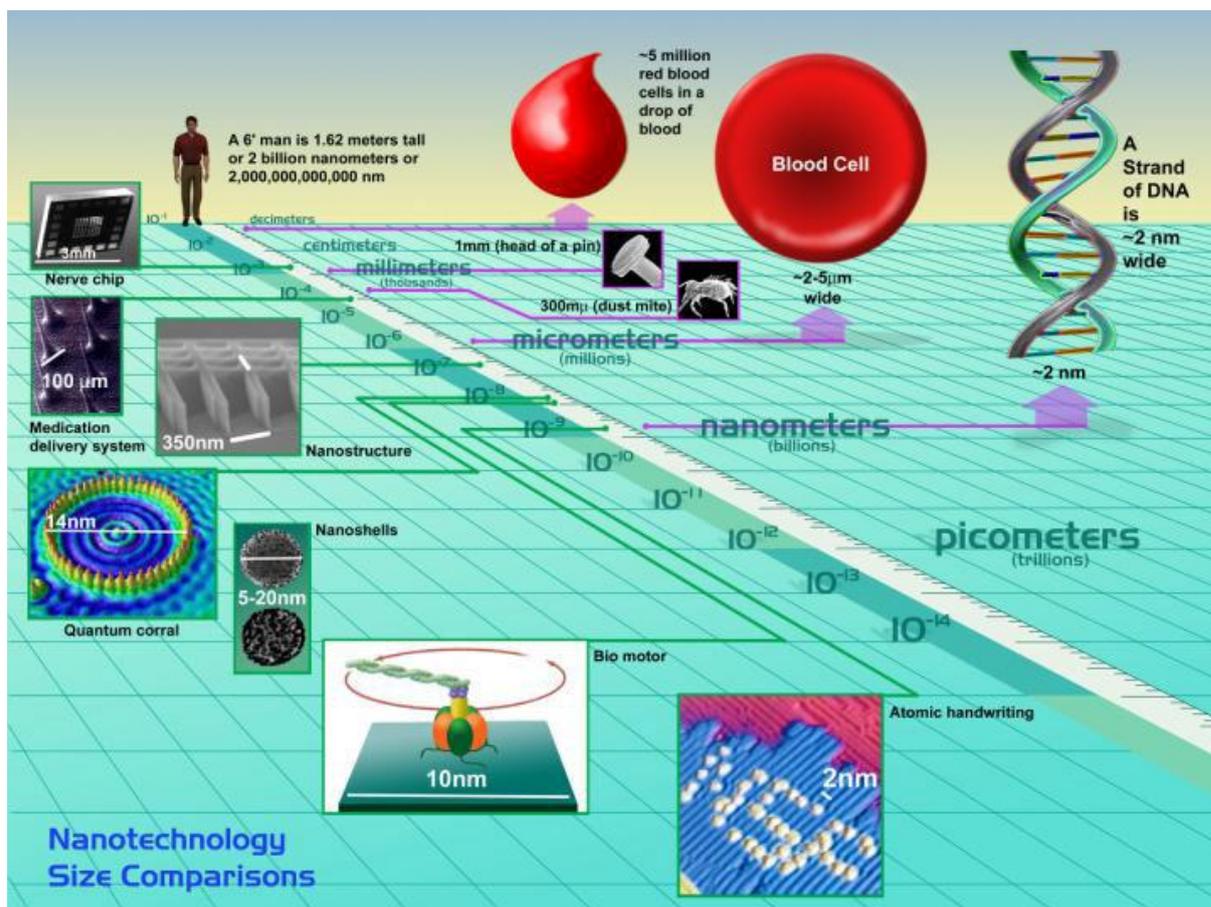
O prefixo “nano” é derivado da palavra grega para “anão” e é utilizada na definição de unidade de medida inferior a um bilionésimo (10^{-9}) de um metro (Figura 1). Já o conceito de nanotecnologia remete ao físico Richard Feynman, o primeiro a utilizar o termo, ao sugerir a manipulação de átomos para a confecção de novos materiais (FEYNMAN, 1960). Atualmente, a nanotecnologia consiste no desenho, produção e aplicação de materiais na escala nanométrica, com o objetivo de gerar novos materiais cuja aplicação seja maior e mais diversa que seu material de origem.

No sentido mais abrangente, atualmente o termo nanopartícula é utilizado para uma união de átomos cujas dimensões se situe entre 1 e 100 nm. Porém, a *International Organization for Standardization* (ISO) possui uma classificação em três categorias para estes materiais (Figura 2) (ISO, 2008):

- Nanofilme: quando uma única dimensão é inferior a 100 nm;
- Nanotubo e nanofios: quando duas dimensões são inferiores a 100 nm;
- Nanopartícula: quando as três dimensões são inferiores a 100 nm.

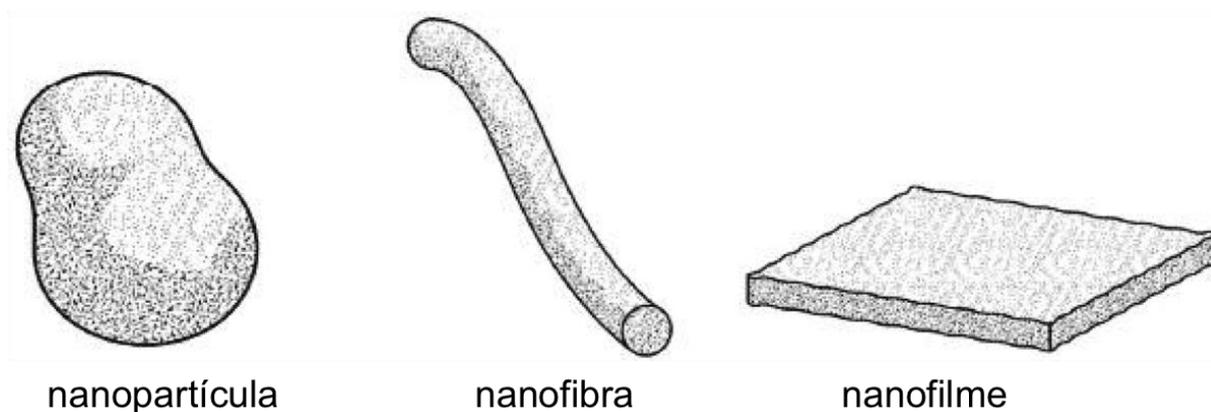
Uma outra distinção também existente para os nanomateriais é em relação a sua origem. Dessa forma, existem os nanomateriais antropogênicos e os naturais. Estes últimos são os presentes em nosso planeta sem a intervenção do homem, e consistem basicamente das partículas ultra-finas liberadas em queimadas, emissões vulcânicas, aerossóis marinhos, etc (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

Figura 1 – Escala nanométrica dos materiais.



Fonte: JEFFERS, 2014.

Figura 2 – Diagrama esquemático das principais formas de nanomateriais.



Adaptado de: ISO, 2008.

Os nanomateriais antropogênicos, por sua vez, podem ser intencionais ou não intencionais. Os não intencionais são gerados por atividades humanas cujo objetivo final não seja a geração de um nanomaterial, o que ocorre, por exemplo, em processos de refinação, soldadura, produção de alimentos ou combustão de automóveis (BUZEA; PACHECO;

ROBBIE, 2007). Há ainda alguns exemplos ainda mais antigos, como certas pinturas maias com argila turquesa (JOSÉ-YACAMÁN, 1996), vasos romanos do século IV a.C. e espadas do século VIII (REIBOLD *et al.*, 2006).

Já os nanomateriais intencionais são aqueles produzidos pelo homem como objetivo final, e cujas propriedades físico-químicas são relacionadas à sua aplicação no produto acabado manufaturado com eles (HANDY; OWEN; VALSANI-JONES, 2008).

Os processos pelos quais os nanomateriais podem ser sintetizados são diversos, porém todos seguem a duas técnicas principais: o *top-down*, ou “de cima para baixo” e o *bottom-up*, ou “de baixo para cima”. Neste último, processos químicos, físicos ou um conjunto de ambos são utilizados para organizar os átomos em escala nanométrica, iniciando-se o método “do zero”. Já no *top-down* o conceito é de utilizar estruturas maiores e reduzir continuamente seu tamanho até a obtenção da escala nano (CHEN *et al.*, 2012).

2.1.3 Aplicações potenciais

Um dos motivos que leva a nanotecnologia a estar em plena expansão em termos de pesquisa e utilização são as possibilidades inovadoras que ela proporciona devido a suas propriedades únicas, em diversos campos. Citam-se alguns:

- Agronegócio: melhoria da fertilidade do solo, aprimoramento da produção de sementes, fabricação de sensores para monitoramento da saúde animal, produção de filmes, revestimentos comestíveis e embalagens bactericidas, produção de animais transgênicos, etc (PEREIRA, 2013).
- Eletrônica: miniaturização e ultra-alta compactação de dados, permitindo a manipulação de volumes cada vez maiores de informação em velocidades cada vez menores (NAYDENOV; BOLAND, 2013);
- Energia: produção de células de combustível com potencial de armazenamento mais eficiente de hidrogênio (HERR *et al.*, 2013);
- Ambiente: produção de energia sustentável (LIU *et al.*, 2010a) e de nanorobôs capazes de remover substâncias nocivas do ar, água e solo (RAY; YU; FU, 2009);
- Farmácia e medicina: sistemas de imagem para marcação eficiente *in vivo* (SANVICENS; MARCO, 2008) e sistemas de detecção precoce de enfermidades (BIDDLESTONE-THORPE *et al.*, 2012), produção de materiais de suporte ósseo e de estimuladores da diferenciação e proliferação celular (TONELLI *et al.*, 2012), nanosistemas

que combatem diretamente células cancerosas ou doenças causadas por vírus e bactérias (RAY; YU; FU, 2009), terapia gênica (ENYASHIM; GEMMING; SEIFERT, 2007), produção de sistemas de liberação controlada mais eficazes e seguros (ZHANG; ZENG; LI, 2013; GAO; PANG; JIANG, 2013), etc.

2.1.3 Exposição humana aos nanomateriais

O acelerado desenvolvimento e disseminação dos nanomateriais podem colocá-los em contato com organismos vivos em situações ainda não compreendidas plenamente. Pesquisas recentes indicam que nanomateriais possuem diferentes perfis de toxicidade quando comparados a grandes partículas, devido ao seu pequeno tamanho e alta reatividade (BRAYNER *et al.*, 2010b).

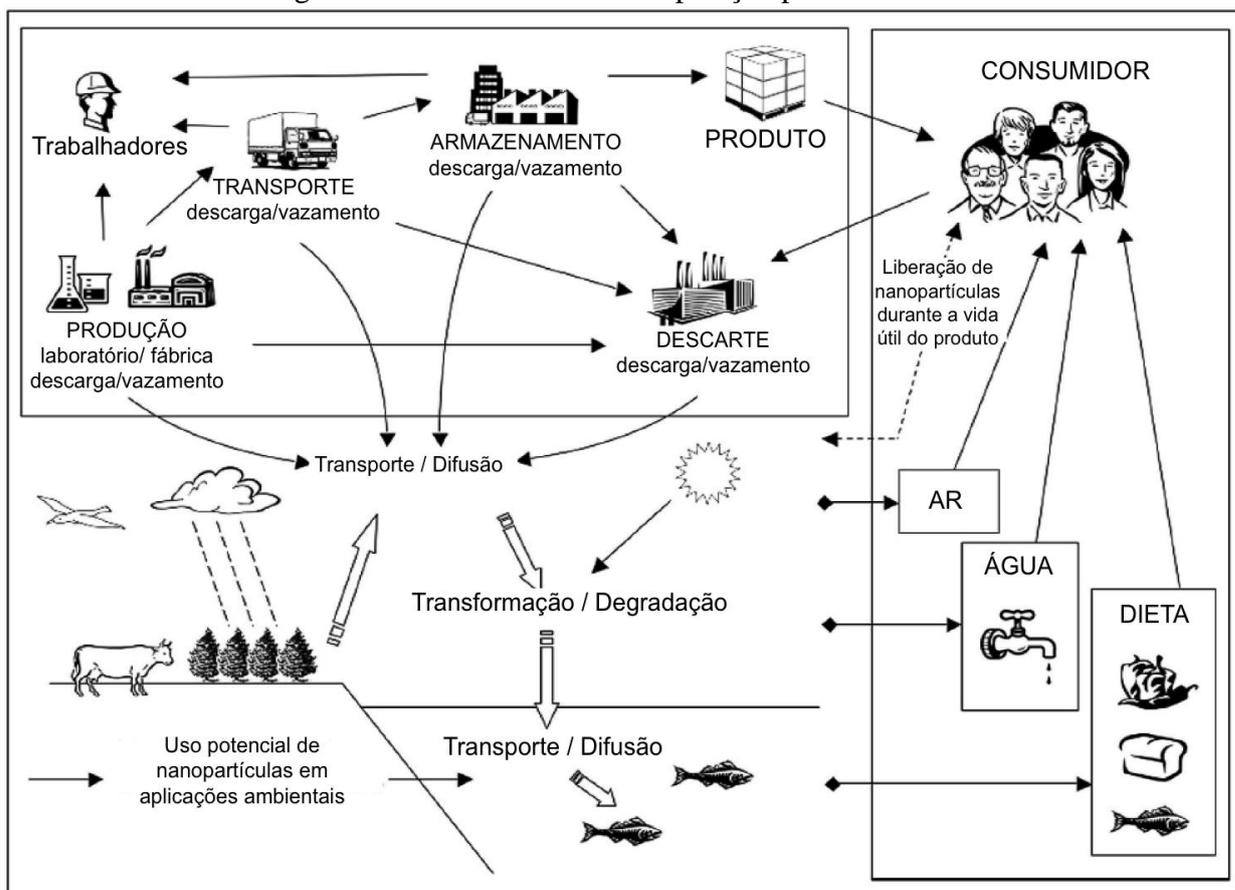
Os humanos podem estar expostos direta ou indiretamente a esses materiais (NEL *et al.*, 2006). A Figura 3 exemplifica algumas das possíveis rotas de exposição, que pode ocorrer desde sua síntese e a produção de produtos derivados (exposição ocupacional) até à utilização final destes produtos (exposição do consumidor), incluindo também a eliminação dos mesmos e o conseqüente acúmulo no ambiente (exposição ambiental).

Dentre essas, a exposição aérea é considerada mais significativa. De fato, estudos epidemiológicos têm demonstrado que partículas ultrafinas estão associadas a doenças respiratórias e cardiovasculares, o que tem resultado em morbidade e mortalidade em parcelas susceptíveis da população (WICHMANN *et al.*, 2002; RYMAN-RASMUSSEN; RIVIERE; MONTEIRO-RIVIERE, 2006).

As principais rotas de entrada dos nanomateriais no organismo humano são a pele, o trato gastrointestinal e o trato respiratório, quer pela utilização de cremes tópicos ou medicamentos orais, quer pelo contato com água, ar e solo contaminados (MIHRANYAN; FERRAZ; STROMME, 2012; HAGENS *et al.*, 2007).

Alguns estudos sugerem que os nanomateriais, por sua pequena dimensão, podem ter uma permeabilidade maior através da pele, mucosas e membranas celulares, podendo ter seu efeito tóxico magnificado, já que possuem uma reatividade superior, principalmente devido ao aumento da área superficial. Um exemplo clássico é o ouro, que é um metal praticamente inerte, mas que na forma de nanopartículas se torna altamente reativo (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

Figura 3 – Possíveis rotas de exposição para nanomateriais.



Adaptado de: ROYAL SOCIETY, 2004.

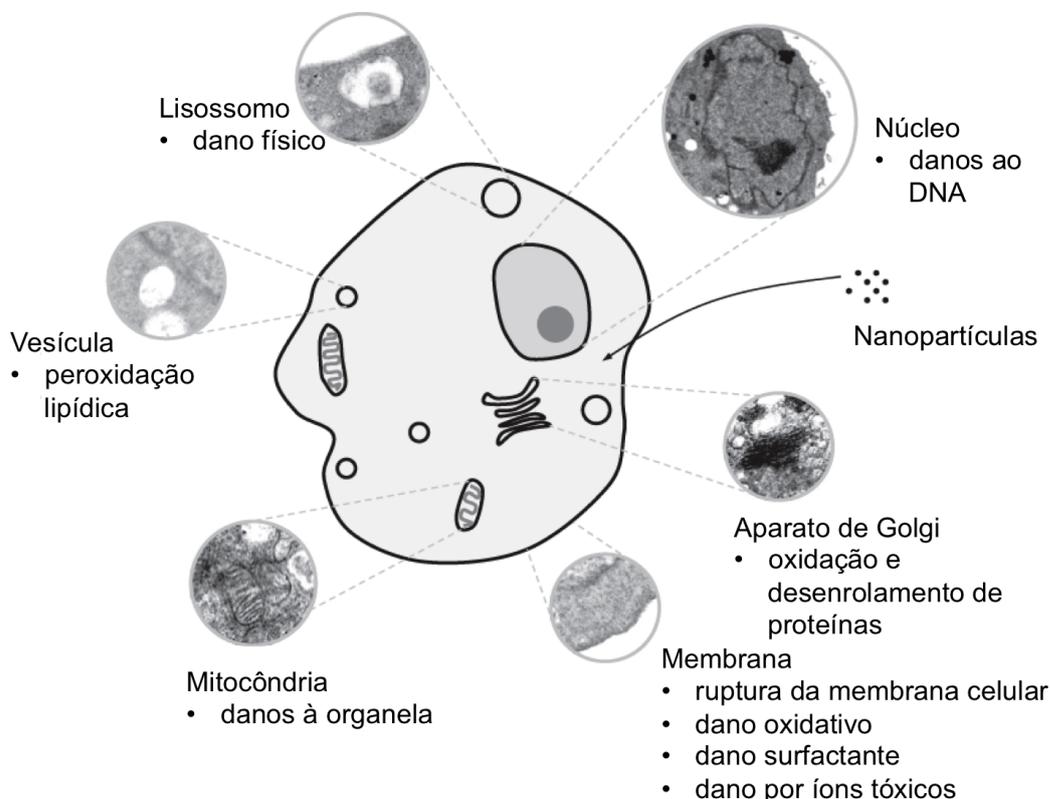
2.1.4 Caracterização de nanomateriais para estudos toxicológicos

Uma outra classificação existente para nanomateriais pode ser feita de acordo com o fato de a nanoestrutura estar ou não imobilizada dentro em um material de maior tamanho (compósitos, nanopartículas funcionalizadas, etc), por exemplo, como parte de uma superfície de um material micronizado. O oposto a este caso seriam nanopartículas livres, capazes de mobilidade no ambiente e no corpo humano (HANSEN *et al.*, 2008).

É este último que é o mais preocupante, do ponto de vista toxicológico, e é a interação destas partículas com os organismos vivos que ainda não é completamente conhecida. A complexidade vem, em parte, da capacidade que as nanopartículas possuem de se ligarem e interagirem com material biológico e mudar suas características de superfície, dependendo do ambiente que estão (Figura 4). O conhecimento científico recente sobre os mecanismos de interação de células e nanopartículas vem indicando que as muitas células prontamente internalizam as nanopartículas, quer através de mecanismos ativos ou passivos. Intracelularmente, no entanto, os mecanismos e caminhos são mais difíceis de entender.

Mesmo partículas de um mesmo material podem apresentar comportamentos completamente diferentes, devido a, por exemplo, pequenas diferenças na superfície de revestimento, na carga ou no tamanho. Esta é uma das principais distinções entre nanotoxicologia e a toxicologia clássica. Além disso, a protocolização de bioensaios envolvendo nanomateriais ainda está em desenvolvimento e, em geral, não foi ainda validado internacionalmente (ELSAESSER; HOWARD, 2012).

Figura 4 – Interação de nanomateriais com células: alvos intracelulares e mecanismos nanotoxicológicos.



Adaptado de: ELSAESSER; HOWARD, 2012.

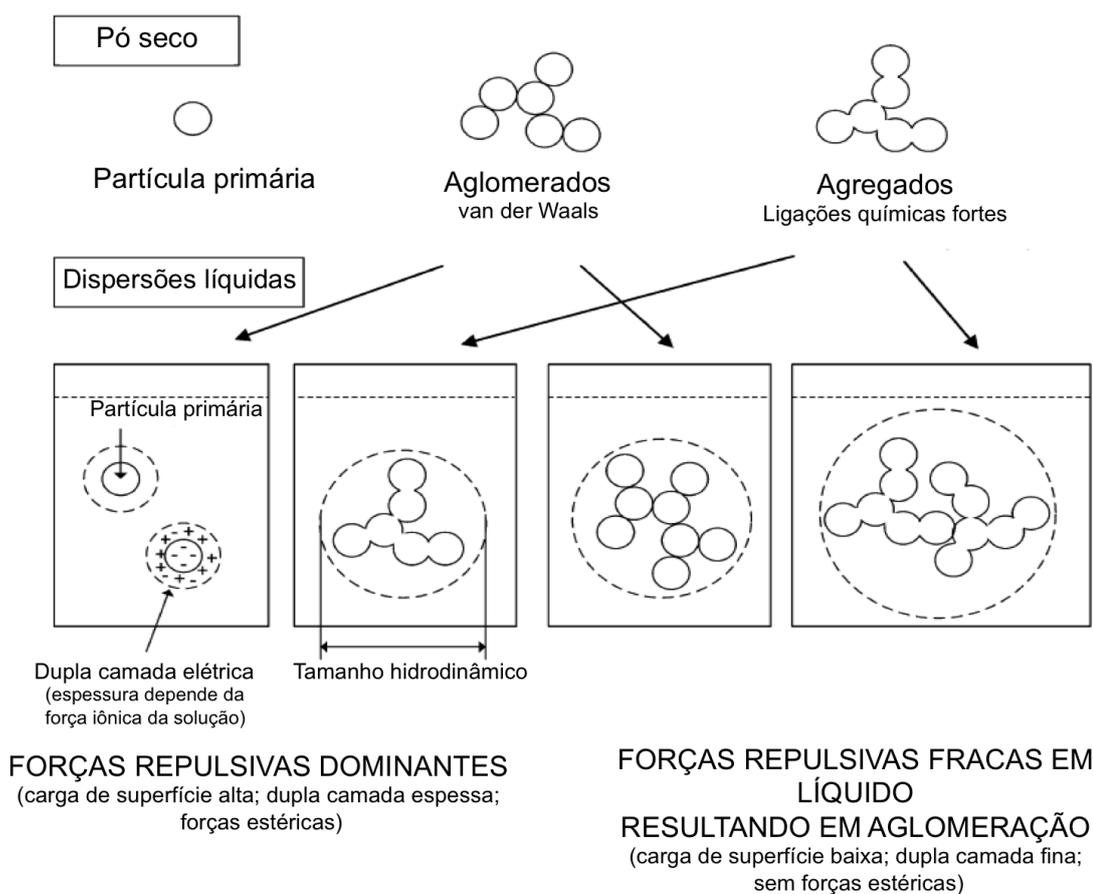
Além disso, há muito mais variáveis a considerar quando se trabalha com nanomateriais, e estas incluem: tamanho, forma, carga de superfície, estado de dispersão (aglomeração, agregação), concentração e meio. Caso contrário, os possíveis efeitos tóxicos não poderão ser facilmente atribuídos a uma determinada qualidade do nanomaterial ou até mesmo ao próprio nanomaterial porque, por exemplo, impurezas e outros componentes podem ser responsabilizados (SAYES; WARHEIT, 2009).

A importância em se estabelecer o estado de dispersão de nanomateriais reside no fato de que determinadas partículas são extremamente reativas em meio aquoso, o que altera seu

tamanho e sua forma, comparando-se ao pó seco. A Figura 5 ilustra os vários estados e configurações que os nanomateriais podem assumir, quando secos ou em solução/suspensão.

Os nanomateriais secos podem assumir duas formas: agregados (ligações fortes entre partículas primárias) e aglomerados (controlada por forças mais fracas, como a de van der Waals). O estado das nanopartículas, agregado ou aglomerado, pode ser controlado durante a síntese (JIANG *et al* 2007; . TSANTILIS; PRATSINIS, 2004). Após dispersar o nanomaterial em solução/suspensão, eles podem permanecer como singletos ou formar aglomerados, ou permanecer como agregados, rodeados por uma dupla camada elétrica. Tipicamente, as nanopartículas quando aglomeradas são adicionados a um líquido e podem ser separadas ao ultrapassar as forças de atração fracas através de várias metodologias, como o uso de ultrassom. Já as nanopartículas agregadas não podem ser separadas.

Figura 5 – Estados e configurações que os nanomateriais podem assumir quando secos ou em dispersão líquida.

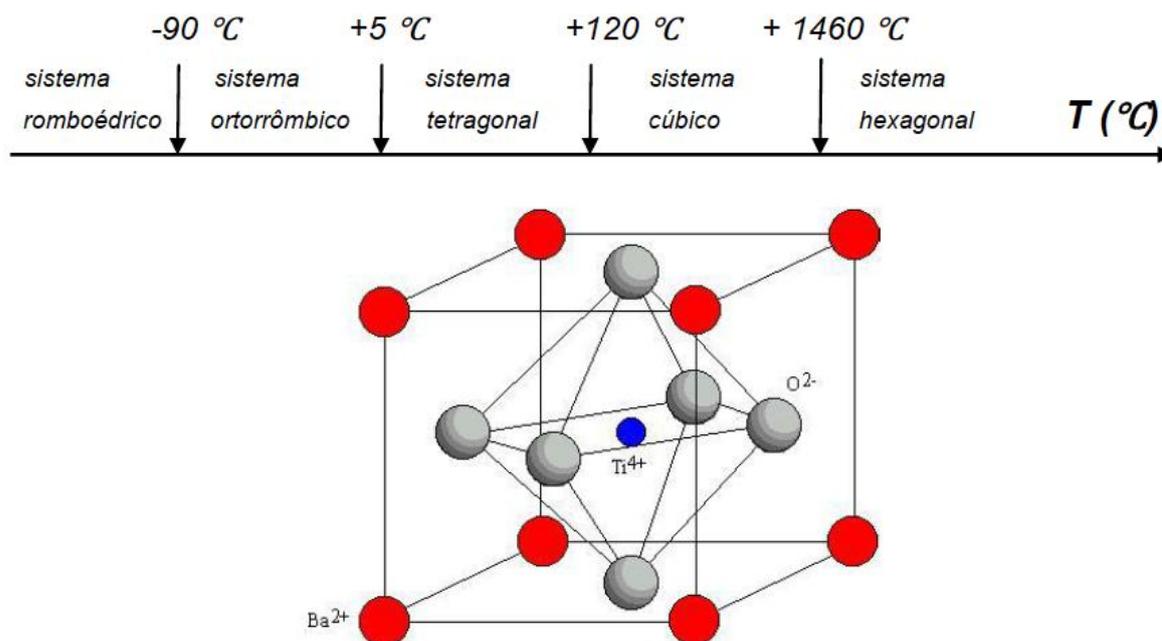


Adaptado de: JIANG; OBERDÖRSTER; BISWAS, 2009.

2.2 TITANATO DE BÁRIO

O BT (Figura 6) é um óxido branco do tipo perovskita tradicionalmente conhecido por ser um material semicondutor/ferroelétrico com notável constante dielétrica e, portanto, alta empregabilidade no campo da eletrocerâmica (CIOFANI *et al.*, 2010a; SU *et al.*, 2013). Por exemplo, ele é ainda a base para a preparação de condensadores cerâmicos multi-camada e de termoresistores com coeficiente de temperatura positivo de resistividade (HENNINGSS *et al.*, 2001; BUSCAGLIA *et al.*, 2000), detectores de infravermelho (LI *et al.*, 2013), dispositivos piezoelétricos (PARK *et al.*, 1999), transdutores de micro-ondas ajustáveis (SCOTT, 2007) e de sensores de umidade (WANG *et al.*, 2011), só para citar alguns exemplos.

Figura 6 – Estrutura cúbica da perovskita titanato de bário.



Fonte: LEONEL, 2010.

Não obstante, a introdução efetiva de BT em nanoescala na indústria e nas rotinas de laboratório trouxe novas aplicações em medicina para tal material. Até 2010, nenhum relato de bioaplicações de BT existia na literatura, quando então Ciofani *et al* (2010a) publicaram seu primeiro trabalho na área. Neste trabalho, os autores descrevem a obtenção de uma dispersão aquosa estável de BT nanoparticulado, através da utilização de poli-L-lisina. Após a devida caracterização, testes *in vitro* com a linhagem de células H9C2 foram

realizados, os quais demonstraram que o metabolismo e a viabilidade das mesmas não são afetada em concentrações de até $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos aglomerados ($\sim 300 \text{ nm}$).

No mesmo ano, os autores descreveram sua utilização como nanocarreador intracelular para proteínas e fármacos de baixo peso molecular, tais como doxorrubicina (CIOFANI *et al.*, 2011b). Neste trabalho, a complexação das nanopartículas de BT foi realizada com glicol-chitosana, o que aumentou a tolerância das células até uma concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após, foi feita a funcionalização das partículas com doxorrubicina para terapia anti-câncer, através de interações hidrofóbicas entre a superfície das nanopartículas e os anéis aromáticos da droga. O complexo exibiu atividade citotóxica maior que a da droga isoladamente.

Após estes dois trabalhos pioneiros, mais duas novas bioaplicações foram relatadas. Ainda em 2010, a segunda aplicação do nanosistemas de BT focou na bioconjugação de nanocristais de BT com anticorpos imunoglobulina G (IgG) para sondas de imagem (HSIEH *et al.*, 2010). Hsieh e colaboradores desenvolveram nanocristais de BaTiO_3 entre 60 nm e 110 nm de diâmetro. Anticorpos IgG foram covalentemente conjugados com os nanocristais, mostrando uma alta especificidade. A sonda então obtida pode assim rotular o anticorpo primário específico e, portanto, ser aplicada para detectar moléculas de interesse.

Por fim, mais recentemente Ball e colaboradores (2013) investigaram o potencial de BT em medicina regenerativa. Espumas com porosidade entre 50 e 70%, com tamanho médio de partícula igual a 30 nm de diâmetro foram sintetizadas e avaliadas para aplicações ortopédicas. A biocompatibilidade *in vitro* foi verificada utilizando osteoblastos de rato (linhagem celular 7F2). A citotoxicidade foi menor que de materiais já comercializados para este fim, e nenhuma resposta inflamatória foi detectada. Estes resultados indicam que BT não exibe citotoxicidade a curto prazo e tem potencial para aplicação em engenharia de tecidos ortopédicos, para enxertos. Porém, os testes foram realizados apenas em 72 h.

Além de não haver na literatura dados de biocompatibilidade em longo prazo, nenhum estudo do impacto ambiental de nanopartículas de BT foi encontrado.

2.3 NANOECOTOXICOLOGIA

A exposição de nanomateriais em diferentes compartimentos ambientais (água, solo e ar) pode resultar na sua maior biodisponibilidade e acúmulo ao longo das cadeias alimentares (OBERDORSTER *et al.* 2004, RAMSDEN *et al.*, 2009). Da mesma forma que podem chegar

ao organismo humano através de água, ar e solo, os nanomateriais podem vir a interagir com outros seres vivos, causando efeitos até então desconhecidos em sua totalidade.

Os três elementos base para as estratégias de *screening* do perfil de toxicidade de nanomateriais, segundo Oberdörster *et al.* (2005) são:

- Caracterização físico-química (tamanho, área de superfície, formato, solubilidade, agregação);
- Elucidação dos efeitos biológicos a partir de estudos *in vitro*;
- Confirmação dos efeitos em estudos *in vivo*.

Estes três pontos foram formulados de um ponto de vista dos efeitos potenciais dos nanomateriais em humanos. Porém, quando todo um ecossistema é levado em consideração, a questão se torna mais abrangente e mais complexa. Apesar de um volume cada vez maior de informações a respeito dos efeitos tóxicos dos nanomateriais em humanos, por exposição direta ou indireta, os estudos de impactos ambientais dos mesmos estavam apenas em seu começo em 2010, segundo Kahru e Dubourguier (2010). A tendência, no entanto, é de que esta avaliação seja cada vez mais uma preocupação mundial, passando a ser exigência pelas agências regulatórias.

A ecotoxicologia é uma ciência cujo cerne é estudar os contaminantes e seus efeitos sobre componentes da biosfera, incluindo seres humanos (NEWMAN; ZHAO, 2008). Foi René Truhaut, em 1969, quem citou pela primeira vez o termo “ecotoxicologia”, definindo-o como “o ramo da toxicologia preocupado com o estudo de efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos para os componentes dos ecossistemas animais (incluindo humanos), vegetal e microbiano, num contexto integral” (TRUHAUT, 1977). As pesquisas ecotoxicológicas desenvolveram-se rapidamente devido à poluição do meio ambiente induzida pelo rápido desenvolvimento industrial da época, permeada por acidentes industriais graves. Políticas foram desenvolvidas a partir de então, e a ecotoxicologia tornou-se uma parte significativa da avaliação de risco ambiental e ecológica exigida pelas novas legislações.

Os testes ecotoxicológicos se desenvolveram sobremaneira para os ambientes aquáticos. Neste contexto, Blaise (1998) classificou as etapas de desenvolvimento dos testes de toxicidade aquática por décadas: (i) “idade das trevas”, até 1950; (ii) a década dos ensaios em peixes, em 1960; (iii) a década regulatória, em 1970; (iv) a década ecotoxicológica em 1980; e (v) a década dos microbiotestes em 1990. Mais recentemente, Kahru e Dubourguier (2010) designaram que a década de 2010-2020 pode ser definida como a “era da (eco)toxicogenômica e da nanoecotoxicologia”.

Apesar da crescente compreensão de que os nanomateriais sintéticos devem ser avaliados pelo seu potencial perigo ambiental previamente à sua utilização em produtos e sua inevitável liberação para o meio ambiente, há atualmente poucos dados a esse respeito. As primeiras poucas pesquisas foram iniciadas na década de 1990, principalmente avaliando o impacto pulmonar de partículas ultrafinas (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005b). Houve uma defasagem de 10 anos, até que o número de pesquisas nanotoxicológicas começassem a aumentar exponencialmente, a maioria focada na saúde humana (ROYAL SOCIETY, 2004). Já em relação ao impacto ambiental, o número de pesquisas ainda é pequeno e não reflete o número substancial de novas aplicações desenvolvidas para estes materiais (KAHRU; DUBOURGUIER, 2010).

2.3.1 Nanoecotoxicologia aquática

Os testes de toxicidade aquática são bastante utilizados porque tais ecossistemas constituem os principais receptáculos de contaminantes, quer sejam eles advindos de lançamento direto nos corpos d'água, através de descargas de efluentes, ou emitidos no ar ou depositados nos solos (KENDALL *et al.*, 2001).

O ambiente aquático é complexo e diverso. Ele compreende vários tipos de ecossistemas, dentre os quais se encontram rios, lagos, estuários, mares e oceanos (RANG *et al.*, 1995). Eles são ainda sistemas abertos e dinâmicos passíveis de sofrer modificações contínuas na sua composição química. Por exemplo, nas águas doces, foco deste estudo, cálcio, magnésio e carbonato são os íons mais abundantes, mas compostos de sódio, potássio, fósforo, ferro, enxofre e silício também estão presentes. Há ainda componentes não conservativos, os quais incluem: gases dissolvidos como O₂, CO₂ e N₂; nutrientes como fosfato e nitrato; compostos orgânicos dissolvidos como aminoácidos e substâncias húmicas; elementos traços como cobre, zinco, cromo, molibdênio, vanádio, manganês, estanho, ferro, níquel, cobalto e selênio e, materiais particulados como areia, argila, colóides, tecidos não vivos e excretos (RANG *et al.* 1995; RAVERA, 2004).

Neste estudo, micro-organismos cultivados em amostras naturais de água do Rio Sena foram utilizados. Este rio possui 777 km de extensão, com aproximadamente 14 milhões de metros cúbicos de água circulantes anualmente. Como os demais rios, sua composição é variável ao longo do ano. Seu pH varia entre 7,8 e 8,2, a temperatura média varia de acordo com a estação, entre 4 e 24 °C (média = 11,6 °C) e sua força iônica é elevada (6,5 mM). A

Tabela 1 sumariza a composição em termos de principais constituintes químicos, determinados a partir de 131 coletas realizadas entre outubro de 2007 e julho de 2009.

Tabela 1 – Caracterização físico-química do Rio Sena.

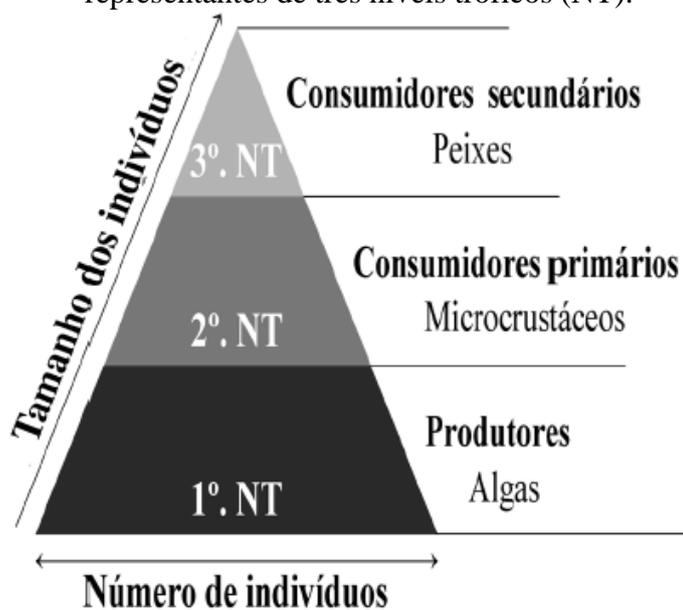
Componente	Quantidade
pH	7,99 ± 0,11
Potencial Zeta (mV)	- 67,95 ± 14,78
Temperatura (°C)	11,59 ± 4,88
[O ₂] (%)	103,33 ± 3,61
[O ₂] (mg L ⁻¹)	11,55 ± 1,35
Condutividade (μS cm ⁻¹)	511,98 ± 34,21
Carbono orgânico total (mg L ⁻¹)	2,69 ± 0,39
Alcalinidade (mM)	3,88 ± 0,72
Força iônica (mM)	6,51 ± 0,42
Magnésio (× 10 ⁻⁴ M)	1,69 ± 0,24
Cálcio (× 10 ⁻³ M)	2,34 ± 0,22
Sódio (× 10 ⁻⁴ M)	4,63 ± 0,93
Potássio (× 10 ⁻⁵ M)	8,04 ± 1,08
Nitratos (μM)	394,62 ± 51,61
Nitritos (μM)	1,99 ± 0,93
Amônia (μM)	4,43 ± 2,81
Silicatos (μM)	106,91 ± 31,98
Fosfatos (μM)	2,12 ± 1,04

Fonte: DA ROCHA, 2014.

Dentre os efeitos bioquímicos e fisiológicos provocados pelos agentes tóxicos em organismos aquáticos, pode-se citar: modificações na permeabilidade das membranas celulares; interferência na produção de ATP; inibição reversível ou irreversível de enzimas; distúrbios no metabolismo de carboidratos e distúrbios no processo respiratório pela inibição do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa; distúrbios no metabolismo de lipídios, podendo resultar em alterações hepáticas; alteração na estrutura ou na atividade de enzimas que participam de processos reguladores, comprometendo a síntese e liberação de hormônios (COSTA *et al.*, 2008). Destes, somente os dois últimos não foram realizados neste estudo, por não se aplicarem aos organismos-teste utilizados. É recomendável também que o efeito tóxico

de uma amostra seja avaliado para mais de uma espécie representativa da biota aquática (Figura 7). Neste estudo, utilizaram-se uma alga (*C. vulgaris*), uma euglenófito (*E. gracilis*) e uma cianobactéria (*A. flos-aquae*).

Figura 7 – Exemplo de cadeia alimentar de ecossistema aquático constituída por representantes de três níveis tróficos (NT).



Fonte: COSTA *et al.*, 2008

Ainda, os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos, dependendo da duração e das respostas finais que são medidas. Os testes de toxicidade aguda são utilizados para medir os efeitos de agentes tóxicos sobre espécies aquáticas durante um curto período de tempo em relação ao período de vida do organismo-teste. Eles têm como objetivo estimar a dose ou concentração de um agente tóxico que seria capaz de produzir uma resposta específica mensurável em um organismo-teste ou população, em um período de tempo relativamente curto, geralmente de 24 a 96 h. Os efeitos tóxicos medidos em testes de toxicidade aguda incluem qualquer resposta exibida por um organismo-teste ou população resultante de um estímulo químico. Normalmente, o efeito medido em estudos de toxicidade aguda com organismos aquáticos é a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade (COSTA *et al.*, 2008). Este foi o tipo de teste utilizado neste estudo.

Já os testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste. O fato de uma substância química não produzir

efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos em testes de toxicidade aguda não indica que ela não seja tóxica para eles. Testes de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações sub-letais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras (RONCO; BAEZ; GRANADOS, 2004; KENDALL *et al.*, 2001).

Os testes de toxicidade podem ainda ser classificados em estáticos, semi-estáticos e dinâmicos, de acordo com o método de adição das soluções-teste. Os ensaios estáticos são realizados sem renovação das soluções-testes e são recomendados para amostras que não causam depleção de oxigênio, que não são voláteis e que são estáveis em meio aquoso. Por outro lado, substâncias tóxicas instáveis ou voláteis têm suas concentrações reduzidas ao longo do teste, contribuindo para que seu resultado seja subestimado. Nesses casos são recomendados os testes semi-estáticos, nos quais as soluções-testes são renovadas periodicamente. Já testes de toxicidade crônica de longa duração são geralmente realizados em modo dinâmico. Nos testes dinâmicos as soluções-testes são continuamente renovadas (APHA, 1998; ADAMS; ROWLAND, 2003; ABNT, 2004).

2.3.2 Organismos-teste utilizados

Neste estudo, utilizaram-se uma alga (*C. vulgaris*), uma euglenófito (*E. gracilis*) e uma cianobactéria (*A. flos-aquae*), ambos representantes do primeiro nível trófico aquático (produtores).

O uso de produtores primários como indicadores biológicos é importante porque eles se situam na base da cadeia alimentar e qualquer alteração na dinâmica de suas comunidades pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema. Normalmente, eles também são bastante sensíveis às alterações ocorridas no meio ambiente e o seu ciclo de vida é relativamente curto, o que possibilita a observação de efeitos tóxicos em várias gerações (COSTA *et al.*, 2008).

O efeito de inibição resultante sobre a população de algas e cianobactérias, após um intervalo de tempo pré-estabelecido (geralmente 3 ou 4 dias; no presente estudo, 4 dias), é determinado comparando-se o crescimento observado na presença de agente tóxico com o crescimento normal observado em um sistema livre de agente tóxico, o qual é chamado de controle.

O crescimento de algas e cianobactérias pode ser determinado por contagem celular ao microscópio óptico ou com um contador eletrônico de partículas. As algas verdes e unicelulares de água doce *Scenedesmus subspicatus* e *Pseudokirchneriella subcapitata* são frequentemente utilizadas em testes de toxicidade porque crescem rapidamente e suas culturas são facilmente preparadas em laboratório (CLEUVERS; WEYERS, 2003).

C. vulgaris são algas verdes unicelulares eucariotas de forma arredondada ou elipsoide, com diâmetro médio de 5 µm. Ela possui um cloroplasto parietal que contém clorofila a e b e carotenoides. O amido é sua reserva majoritária de glicídeos e sua membrana celular externa é composta de três folhas membranas contendo glicosamina (ALLARD *et al.*, 2000; VAN DEN HOEK *et al.*, 1995).

As algas *E. gracilis*, por sua vez, apresentam uma plasticidade metabólica notável, uma vez que podem comportar-se tanto como autotróficas e fotossintéticas (quando cultivadas na presença de luz, apresentando-se macroscopicamente na cor verde) quanto como heterotróficas (quando cultivadas no escuro, sendo neste caso incolor) (EINICKER-LAMAS *et al.*, 2002). No presente estudo, modulou-se as culturas para terem um comportamento autotrófico. Além disso, elas possuem a capacidade de endocitar partículas e de se mover por meio de um flagelo, uma estrutura longa em forma de chicote (BRAYNER *et al.*, 2010; 2011).

As cianobactérias *A. flos-aquae* são compostas por um série linear de células vegetativas e, geralmente, possuem uma grande quantidade de heterocistos de parede grossa dispersos ao longo de toda o tricoma (BRAYNER *et al.*, 2010; 2011). Elas produzem toxinas (anatoxina-a e homoanatoxina-a, principalmente). É importante salientar que as cianobactérias são uma divisão do grupo Bacteria, e por serem bactérias fotossintetizantes apresentam características tanto de bactérias quanto de algas.

3 HIPÓTESE

O tamanho de partícula e o meio de cultivo influenciam na ecotoxicidade de BT em modelo experimental que utilize micro-organismos de ambientes aquáticos.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar pela primeira vez o perfil ecotoxicológico de BT em ambientes aquáticos, avaliando a resposta em função do tamanho de partícula.

4.2 Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente dois lotes de BT com tamanhos de partículas distintos, sendo um micrométrico e o outro nanométrico, em relação à composição química, à forma e ao tamanho, a seu estado de dispersão e a sua carga, área e química de superfície;
- Avaliar se há ou não toxicidade destes materiais para três micro-organismos aquáticos de água doce: *C. vulgaris*, *A. flos-aquae* e *E. gracilis*, em função da taxa de reprodução e da viabilidade celular;
- Investigar o mecanismo pela qual a toxicidade ocorra, caso ocorra;
- Comparar o comportamento das partículas e dos micro-organismos em meios de cultura natural e artificiais;
- Determinar se o tamanho de partícula é um parâmetro que influencia a toxicidade de BT.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REAGENTES E MATERIAIS

Os reagentes etanol (EtOH), hidróxido de sódio (NaOH), ácido nítrico (HNO₃), ácido clorídrico (HCl), azul de tripano, tetróxido de ósmio (OsO₄), ácido pícrico, glutaraldeído, nitrato de sódio (NaNO₃), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), sulfato de magnésio (MgSO₄), edetato férrico (Fe-EDTA), fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), ácido bórico (H₃BO₃), cloreto de manganês (MnCl₂), trióxido de molibdênio (MoO₃), sulfato de vanadila (VOSO₄), sulfato de cobre (CuSO₄), sulfato de cobalto (CoSO₄), sulfato de zinco (ZnSO₄), cloreto de amônia (NH₄Cl), molibdato de amônia ((NH₄)₆Mo₇O₂₄), cianocobalamina (vit. B12), tiamina (vit. B1), biotina e citrato de chumbo foram todos obtido de Sigma-Aldrich (Alemanha).

Água ultrapura obtida em um sistema Purelab Classic UV (ELGA LabWater, Reino Unido) (18,2 MΩ cm de resistividade a 25 °C e < 10 ppb de carbono orgânico total) foi utilizada em todas as etapas experimentais.

Os materiais em estudo (BT micro- e nanoestruturados) foram obtidos de Sigma-Aldrich, nomeados aqui BT-MP (CAT n. 338842, lot MKBD3182V, < 2 μm de acordo com o fornecedor) e BT-NP (CAT n. 467634, lot MKBF7837V, < 100 nm, também de acordo com o fornecedor).

5.2 MEIOS DE CULTURA

Três meios de cultura foram utilizados neste trabalho: água do Rio Sena (ARS), *Bold's Basal* (BB) e Meio Mineral (MM). Todos os meios foram autoclavados por 20 min a 121 °C após preparo ou obtenção.

Amostras de ARS representativas de uma região altamente antropizada foram coletadas próximas à *Université de Paris 7 – Diderot*, no *Quai Sant Bernard* (Sistema de Posicionamento Global, GPS: 48,831039°N, 2,381709°E) no dia 15 de junho de 2013, às 10h. As amostras (pH ~ 7,8-8,2) foram imediatamente esterilizadas através de filtração à vácuo utilizando membranas com porosidade de 0,22 μm de diâmetro (Millipore, Alemanha) que mantinham os ácidos fúlvico e húmico. As amostras foram então armazenadas a 4 °C em garrafas de polietileno lavadas previamente com ácido.

A composição do meio BB se encontra na Tabela 2. O meio final foi obtido pela mistura de 10 mL da solução A, 10 mL da solução B, 1 mL da solução-traço e água qsp 1000 mL. Após homogeneização, o pH foi ajustado para 7,0 utilizando solução de NaOH 1M.

Tabela 2 – Composição do meio de cultura *Bold's Basal*.

Solução A	Sal	Massa (g/400 mL água)
	NaNO ₃	10,0
	(ou NaCl)	6,1
	CaCl ₂ 2H ₂ O	1,0
	MgSO ₄ 7H ₂ O	3,0
	Fe-EDTA	0,8
Solução B	Sal	Massa (g/400 mL água)
	K ₂ HPO ₄	3,0
	KH ₂ PO ₄	7,0
	NaCl	0,8
Solução-traço	Sal	Massa (mg/100 mL água)
	H ₃ BO ₃	240,0
	MnCl ₂ 7H ₂ O	180,0
	MoO ₃ 7H ₂ O	10,0
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	22,0
	CuSO ₄ 7H ₂ O	8,0
	CoSO ₄ 7H ₂ O	9,0
	VOSO ₄ 2H ₂ O	4,3

NaNO₃: nitrato de sódio; NaCl: cloreto de sódio; CaCl₂: cloreto de cálcio; MgSO₄: sulfato de magnésio; Fe-EDTA: edetato férrico; K₂HPO₄: fosfato de potássio dibásico; KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico; H₃BO₃: ácido bórico; MnCl₂: cloreto de manganês; MoO₃: trióxido de molibdênio; ZnSO₄: sulfato de zinco; CuSO₄: sulfato de cobre; CoSO₄: sulfato de cobalto; VOSO₄: sulfato de vanadila.

A composição do MM se encontra na Tabela 3. O meio final foi obtido pela mistura de 10 mL da solução A, 10 mL da solução B, 1 mL da solução-traço, 1 mL da solução de vitaminas e água qsp 1000 mL. Após homogeneização, o pH foi ajustado para 4,0 utilizando HCl 1M.

Tabela 3 – Composição do meio de cultura Mineral.

Solução A	Sal	Massa (g/200 mL água)
	NH ₄ Cl	8,0
	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,5
	MgSO ₄ 7H ₂ O	1,5
	Fe-EDTA	0,4
Solução B	Sal	Massa (g/400 mL água)
	K ₂ HPO ₄	1,5
	KH ₂ PO ₄	3,5
	NaCl	0,4
Solução-traço	Sal	Massa (mg/100 mL água)
	H ₃ BO ₃	240,0
	MnCl ₂ 4H ₂ O	180,0
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	10,0
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	22,0
	CuSO ₄ 7H ₂ O	8,0
	CoSO ₄ 7H ₂ O	9,0
	VO ₂ SO ₄ 2H ₂ O	4,3
Solução de vitaminas	Sal	Massa (mg/200 mL)
	Vit. B12	8,0
	Vit. B1	8,0
	Biotina	8,0

NH₄Cl: cloreto de amônia; CaCl₂: cloreto de cálcio; MgSO₄: sulfato de magnésio; Fe-EDTA: edetato férrico; K₂HPO₄: fosfato de potássio dibásico; KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico; NaCl: cloreto de sódio; H₃BO₃: ácido bórico; MnCl₂: cloreto de manganês; (NH₄)₆Mo₇O₂₄: molibdato de amônia; ZnSO₄: sulfato de zinco; CuSO₄: sulfato de cobre; CoSO₄: sulfato de cobalto; VO₂SO₄: sulfato de vanadila.

5.3 ORGANISMOS-TESTE

C. vulgaris (alga verde planctônica eucariota, uni-celular), *A. flos-aquae* (cianobactéria planctônica procariótica, multi-celular, cepa ALCP B24) e *E. gracilis* (euglena eucariótica) foram provenientes da algoteca do *Muséum National d'Histoire Naturelle*, com

densidade inicial de 5×10^5 cels. mL⁻¹. Em todos os experimentos, as algas foram crescidas em frascos *erlenmeyer* de 250 mL (= 75 cm²) com rolhas permeáveis ao ar.

As culturas de *C. vulgaris* e *A. flos-aquae* foram crescidas em ARS e BB, enquanto as de *E. gracilis* foram crescidas em ARS e MM. Todas as culturas foram mantidas em câmaras climáticas para crescimento (Binder, Alemanha) a $20,0 \pm 0,5$ °C com ciclos diários de 16 h de iluminação (densidade de fluxo de fótons = 50-80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *C. vulgaris*, 30-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *A. flos-aquae* e 70-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *E. gracilis*) e aeração constante (condições ambientais de CO₂).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

5.4.1 Difração de raios-X

A difração de raios-X (DRX) dos pós foram registradas com difratômetro X'pert Pro (PANalytical, Holanda) equipado com um detector multicanal X'Celerator, e utilizando a radiação de Co K α (= 1,790307 Å), no intervalo de ângulos 2 θ variando de 5° a 120°, com um passo de varredura de 0,05°/5s. O suporte de amostras utilizado foi de sílica monocristalina.

5.4.2 Observações morfológicas: composição, tamanho e forma

Observações morfológicas dos materiais por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas por meio de um microscópio Supra 40 (Zeiss, Alemanha) equipado com um detector na lente. Baixa tensão de excitação (2,5 kV) e uma pequena distância de observação (3 mm) foram utilizadas, para que os efeitos de carga fossem reduzidos a ponto de a metalização dos pós não ser necessária e suas características verdadeiras não serem mascaradas. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas utilizando um microscópio 100CX -II (JEOL, Japão) operando com uma tensão de aceleração de 100 kV. As amostras foram preparados por dispersão dos pós em EtOH utilizando ultrassom antes de sua deposição nos suportes para MEV ou nas grelhas revestidas de carbono para MET.

5.4.3 Área de superfície

A área superficial específica (S_g) e o tamanho dos poros foram medidos pela coleta das isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio (N_2) em um sistema Gemini V 2380 (Mic America, EUA) a 77 K, após os materiais terem sido secos a 160 °C durante 1 h. A área de superfície de Brunauer-Emmett-Teller (BET) foi calculada a partir da parte linear do gráfico de BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938). A distribuição de tamanho de poro foi obtido a partir de um porosímetro de mercúrio Autoscan 33 (Quantachrome, EUA).

5.4.4 Estado de dispersão e carga de superfície

O estado de dispersão (determinado como tamanho hidrodinâmico) e as forças de carga da superfície/interpartículas (potencial zeta, ζ) das dispersões de pós nos meios de cultura ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou $4,28 \times 10^{-7} M$) foram caracterizados usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), através de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento eletroforético de luz (ELS), respectivamente. Efeitos da variação do pH nos meios (3, 5, 7, 9 e 12, ajustados com HNO_3 ou NaOH em diferentes molaridades) foram avaliados, bem como o grau de agregação como uma função do tempo (0, 24, 48, 72 e 96 h). As dispersões foram sonicadas diariamente antes da análise, a fim de dispersar possíveis aglomerados e para que se possa deduzir que o aumento nos tamanhos hidrodinâmicos fossem devido somente ao fenômeno da agregação.

Superfícies de resposta foram construídas através de planejamento experimental misto 5^2 (MONTGOMERY, 2009), a fim de se avaliar os papéis que cada fator desempenha no estado de agregação ou na carga de superfície das suspensões. Os fatores e seus níveis estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Fatores e níveis do planejamento experimental misto 5^2 para avaliação do estado de agregação e da carga de superfície de suspensões aquosas de titanato de bário.

Fatores	Níveis codificados (em parênteses) e reais				
X_1 (h)	(-1) 0	(-0,5) 24	(0) 48	(0,5) 72	(1) 96
X_2	(-0,88) 3	(-0,44) 5	(0) 7	(0,44) 9	(0,88) 12

X_1 : tempo das partículas em suspensão. X_2 : pH do meio.

A partir dos resultados de cada experimento, os coeficientes de predição para a determinação do modelo estatístico foram calculados de acordo com a equação 1.

$$b = X^t X^{-1} X^t y \quad (1)$$

na qual b é a matriz de coeficientes do modelo e X e y são a Matriz X e o Vetor y , respectivamente. Para obter a equação do modelo ajustado, calculou-se os erros-padrão dos coeficientes usando a equação 2:

$$\varepsilon b = \overline{X^t X^{-1} \cdot \sigma^2} \quad (2)$$

na qual εb é a matriz cuja diagonal principal representa os erros-padrões dos estimadores do modelo (b_i) e σ^2 é a variância populacional dos experimentos, que pode ser estimada como s^2 , utilizando as replicatas no ponto central, a partir da Eq. 3:

$$s^2 = \frac{x_i - \bar{x}}{n-1}^2 \quad (3)$$

5.4.5 Dissolução e análise química da superfície

O grau de dissolução dos materiais nos meios de cultura como uma função de tempo (1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 e 96h) foi avaliado seguindo um protocolo proposto por Sivry *et al.* (2014). A partir de uma solução-estoque ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$, volume final = 100 mL), preparada no momento 0 h, alíquotas (3,5 mL) foram retiradas nos intervalos de tempo especificados e ultra-filtradas usando filtros de 3 kDa (Microsep Advance Centrifugal Device, Pall Corporation, EUA) que foram centrifugados em velocidade máxima (EBA 8, Hettich, Alemanha) por 1h. Após, adicionou-se 50 μL de HNO_3 saturado (sem nenhum traço de Ba^{2+}). Todas as soluções foram imediatamente congeladas até a análise elementar (quantificação do Ba^{2+} dissolvido), a qual foi realizada por plasma indutivamente acoplado a espectrometria de emissão óptica (ICP- OES) (iCAP 6200, Thermo Scientific, EUA). O limite de detecção do método é estabelecido como 1,0 ppb.

O restante das dispersões aquosas (72 mL) foram centrifugadas a $20.000 \times g$ (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific, EUA) e o meio foi completamente evaporado em estufa a 50°C . Os resíduos secos foram, então, analisados por DRX e espectroscopia de

fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) (VG Escalab 250, Thermo Scientific, EUA), usando Al K α de 1486,6 eV, a 15 kV e 150 W, para avaliação de eventuais mudanças químicas na superfície das partículas .

5.5 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE

Suspensões-estoque contendo 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos pós foram obtidas por sonicação de alíquotas de 10 mg de BT MP ou BT NP em 10 mL de ARS, BB ou MM durante 10 min a 200 W (VWR, EUA). A sonicação foi utilizada para quebrar os agregados micrométricos e estabilizar as suspensões. Alíquotas destas suspensões foram, em seguida, adicionadas às culturas (organismos em crescimento exponencial, preparadas 3 dias antes do início dos testes com uma densidade inicial de 5×10^5 cel. mL^{-1}) de modo que se obtivessem concentrações finais de pós correspondentes a 1, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ou $4,28 \times 10^{-8}$, $1,07 \times 10^{-7}$, $2,14 \times 10^{-7}$, $3,22 \times 10^{-7}$ e $4,28 \times 10^{-7}$ M, respectivamente). Os experimentos também foram realizados com Ba²⁺ a 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($7,28 \times 10^{-6}$ M). Todos os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração e controle.

A resposta tóxica foi avaliada por meio da contagem de células às 24, 48, 72 e 96 h após a adição dos materiais, em função da concentração de exposição em comparação com a média de crescimento de culturas controle, não expostas. A contagem das células foi feita em alíquotas de 20 μL do controle ou tratamentos, através de microscopia de campo luminoso, utilizando o Auto Cellometer X4 (Nexcelom, EUA).

Foi avaliada simultaneamente a porcentagem de viabilidade celular utilizando o método de exclusão do azul de tripano, o qual cora seletivamente as células mortas com cor azul. Alíquotas de 40 μL do controle ou tratamentos foram coradas com 10 μL de azul de tripano 0,01% por 10 minutos antes das observações microscópicas em campo luminoso. A densidade celular foi devidamente corrigida em relação à diluição realizada.

5.6 AVALIAÇÃO DOS FATORES LIGADOS À TOXICIDADE

5.6.1 Observação microscópica

As interações entre os organismos e os materiais na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e após 72 h de exposição foram observadas usando MEV e MET. Controle e tratamentos foram fixados com uma mistura contendo 2,5% de glutaraldeído e 1,0 % de ácido pícrico em

tampão fosfato-salino 0,01 M, pH 7,4 por 1 h. Após, lavou-se as células três vezes por 5 min cada com o mesmo tampão. Foi realizada uma etapa de pós-fixação com OsO₄ 0,5% por 1 h, sucedida por nova lavagem das células da mesma forma anterior, e por mais três vezes por 5 min cada com água. Foi realizada então a desidratação das amostras através de uma série de banhos de etanol (50, 70, 90 e 100%), cada banho realizado uma vez por 10 min.

Para MEV, após a desidratação foi realizada secagem utilizando CO₂ em estado supercrítico (*Critical Point Dryer* 030, Bal-Tec, Liechtenstein). Após este processo, as amostras desprovidas de etanol foram montadas em suportes metálicos para observação em microscópio Supra 40 (Zeiss, Alemanha) equipado com um detector na lente, utilizando uma tensão de excitação de 2,5 kV e uma distância de trabalho de 3 mm.

Para MET, após a desidratação as amostras passaram por processo de infiltração e inclusão em resina do tipo Spurr (Agar Scientific, Reino Unido). Secções ultrafinas foram obtidas usando um ultramicrótomo Reicherd E Young Ultracut (Leica, Alemanha). Os cortes foram contrastados com citrato de chumbo antes de sua visualização, realizada em microscópio H-700 (Hitachi, Japão) operando a 75kV e equipado com uma câmera Hamatsu.

5.6.2 Agregação e carga de superfície dos organismos

O tamanho hidrodinâmico e o ζ das culturas contendo BT MP ou BT NP (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a 0, 24, 48, 72 e 96 h de exposição), foi caracterizada utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido).

5.6.3 Estresse oxidativo

A enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do íon superóxido (O₂^{·-}) em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, foi quantificada nos controles e tratamentos (1, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em 24, 48, 72 e 96 h de exposição). Para liberação da SOD intra-celular, as células foram lisadas com o auxílio de esferas de sílica através de agitação mecânica vigorosa em vórtice e posterior centrifugação por 15 min a 2000 $\times g$ (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific, EUA). Os sobrenadantes foram utilizados, e os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a quantificação, utilizou-se um kit de ensaio de SOD-WST 19160 (Sigma-Aldrich, Alemanha), o qual utiliza sal de tetrazólio de Dojindo altamente solúvel em água (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio, sal monossódico), que

produz um corante de formazano também solúvel em água após a redução com o íon superóxido. A taxa de redução com O_2 está linearmente relacionada com a atividade da xantina oxidase (XO) presente no kit, a qual é inibida pela SOD. Desta forma, a IC_{50} (50% de inibição da atividade da SOD) pôde ser determinada por colorimetria. Os controles e os tratamentos, depois de serem incubados a 37 °C durante 20 min, foram lidos a 450 nm utilizando um leitor de placas Envision Multilabel (Perkin-Elmer, EUA).

5.6.4 Eficiência fotossintética

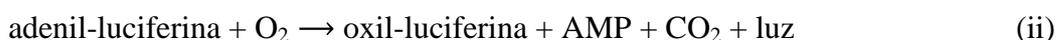
A atividade fotossintética dos controles e tratamentos (1, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a 24, 48, 72 e 96 h de exposição) foram determinados através de fluorometria de amplitude de pulso modulado (PAM) utilizando fluorímetro PEA Handy (Hansatech, Reino Unido). Esta técnica utiliza o princípio do impulso de saturação, em que uma amostra é submetida a um curto feixe de luz que satura os centros reacionais do fotossistema II (FSII) das moléculas de clorofila ativas. Este processo elimina a extinção fotoquímica, que poderia reduzir o rendimento máximo da fluorescência.

A fluorescência inicial (F_0) foi medida nas culturas de micro-organismos previamente adaptados ao escuro por 45 min, usando fluxo de fótons igual a 0,1 $\mu\text{mol cm}^{-2}\text{s}^{-1}$, e a fluorescência máxima (F_m) após um pulso saturante de 0,8 s ($> 3500 \mu\text{mol cm}^{-2}\text{s}^{-1}$). O parâmetro F_v , fluorescência variável, foi estimado pela diferença entre F_m e F_0 . O resultado foi expresso como a média de três réplicas da proporção de variável ao longo de fluorescência máxima (F_v/F_m), a qual se aproxima do rendimento quântico potencial do PSII.

5.8 Atividade mitocondrial

Níveis intracelulares de adenosina-5-trifosfato (ATP) nos controles e tratamentos (1, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em 24, 48, 72 e 96 h de exposição) foram quantificados através de um kit ATP Bioluminescent Assay (Sigma-Aldrich, Alemanha). A lise das células foi conseguida mecanicamente num vórtice usando esferas de vidro seguido de centrifugação por 15 min a $2000 \times g$ (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific, EUA), a fim de obter o ATP livre no sobrenadante.

O kit utilizado contém luciferase de vaga-lume, a qual catalisa a reação de oxidação da D-luciferina, processo dependente de ATP, de acordo com as reações i e ii:



A reação 1 é catalisada pela luciferase, em presença de Mg^{2+} . Quando o ATP é o agente limitante das reações, a luz emitida é proporcional à quantidade de ATP presente. A luminescência produzida foi lida em leitor de placas Envision Multilabel (Perkin-Elmer, EUA) equipado com um filtro óptico luminescente. A concentração de ATP foi determinada utilizando-se uma curva analítica com concentrações conhecidas de ATP na faixa de 2×10^{-5} – $200 \mu\text{M}$.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS v.14.0 (IBM, EUA). Para comparações entre o controle e os tratamentos, análise de variância (*one-way* ANOVA) seguido do teste *post-hoc* de Tukey foi realizado para as variáveis que atendiam aos critérios de normalidade (teste de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$), homocedasticidade (homogeneidade de variância, teste de Levene, $p > 0,05$) e independência (teste de Durbin Watson, $p \sim 2.0$). Para as variáveis que violavam os pressupostos para a validade da ANOVA, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallys. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$ e marginalmente significantes quando $0,05 < p \leq 0,1$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

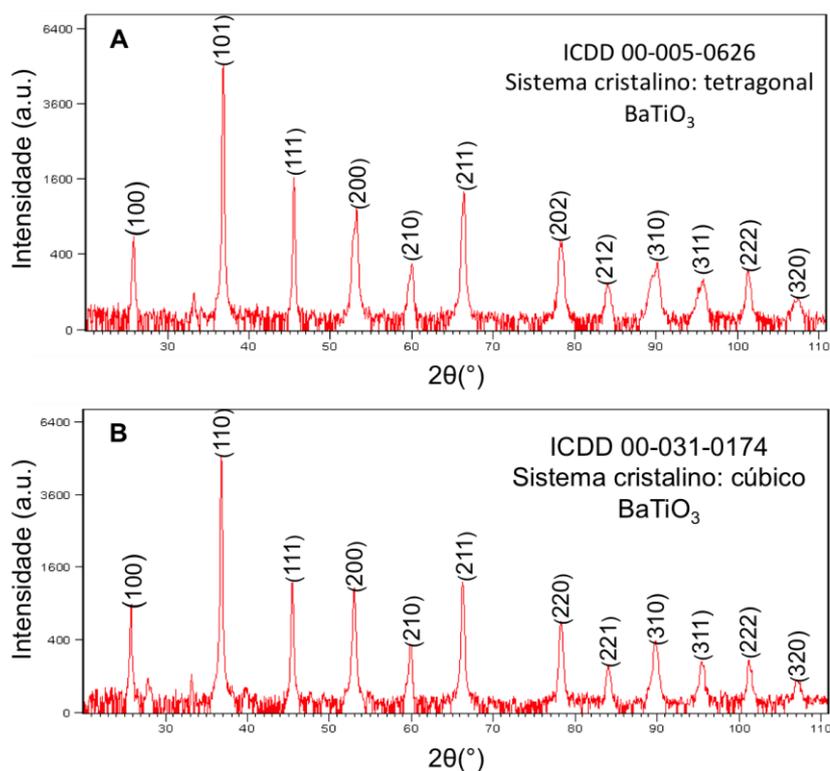
Materiais como o BT são conhecidos por serem solúveis em um grande número de solventes orgânicos, como o tolueno, o *n*-hexano, a acetona e o benzaldeído, gerando suspensões estáveis e bem dispersas (WANG *et al.*, 2000). Este, porém, não é o caso dos meios de cultura aquosos utilizados para os micro-organismos deste estudo, e por isso espera-se que o BT em suspensão nos mesmos não possua estabilidade termodinâmica ou uma boa dispersão, comparativamente aos solventes mencionados. Por isso, uma caracterização não somente dos pós enquanto matéria-prima foi realizada, mas também em estado de suspensão nos meios de cultura. Isso porque é necessário um profundo conhecimento e entendimento do comportamento do BT em meio aquoso para uma melhor compreensão de seus efeitos em estudos toxicológicos.

Dependendo de sua rota de preparação, os pós de BT podem mostrar diferentes morfologias e características cristalográficas (SU *et al.*, 2013), e por isso as primeiras avaliações realizadas foram a verificação do padrão de difração de raios-X e a observação direta por MEV e MET dos materiais em estudo. Os difratogramas (Figura 8) indicam que os materiais sintetizados têm duas estruturas diferentes: BT MP mostra boa concordância com a estrutura tetragonal convencional do BaTiO₃, com o grupo de espaço P4mm (ICDD 00-005-0626). O difratograma de BT NP, por sua vez, indica que o material sintetizado é BaTiO₃ de estrutura cúbica, com o grupo de espaço Pm3m (ICDD 00-031-0174).

Sabe-se que em temperaturas elevadas o BT apresenta a estrutura cúbica de face centrada ABO₃ clássica (com Ba²⁺ como A e Ti⁴⁺ como B), que é uma estrutura cúbica centro-simétrica com A nos vértices do cubo, B no centro e os átomos de oxigênio nas faces do cubo (Figura 6). Esta estrutura tende a sofrer pequenas distorções de sua simetria cúbica quando a temperatura é abaixada (KWEI *et al.*, 1993). Na verdade, de acordo com Megaw (1947) pós de BT são cúbicos somente acima do ponto de Curie (125 °C). Já entre 125 e 0°C, tem-se uma polarização espontânea ao longo do eixo *c* da célula unitária tetragonal.

Usando o modelo de Williamson-Hall calculado pelo *software* do difratômetro (já com correções instrumentais), tem-se que os tamanhos médios de cristalitos foram $172,0 \pm 102,4 \text{ \AA}$ (com $0,19 \pm 0,06\%$ de deformação) e $60,0 \pm 16,7 \text{ \AA}$ ($0,10 \pm 0,05\%$), respectivamente para BT MP e BT NP.

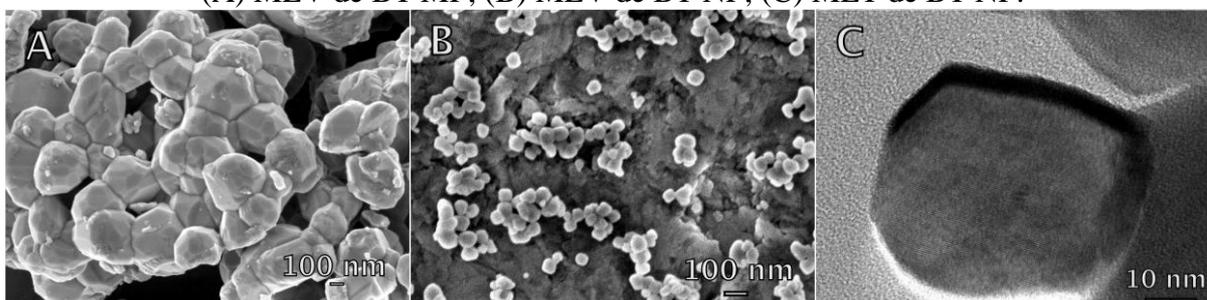
Figura 8 – Difratomogramas de titanato de bário (A) micro e (B) nano.



Sabendo-se que os dois materiais são diferentes em termos de estrutura cristalina e tamanho de seus cristaltos, realizou-se a observação microscópica dos mesmos. Na Figura 9, vê-se a diferença morfológica entre as partículas e confirma-se que o tamanho não é completamente uniforme, particularmente para o pó com partículas maiores (BT MP). Foi realizada a estimativa de tamanho das partículas como sendo da ordem de 170 nm para BT MP e em torno de 60 nm para BT NP.

Figura 9 – Imagens de microscopia eletrônica de titanato de bário.

(A) MEV de BT MP; (B) MEV de BT NP; (C) MET de BT NP.

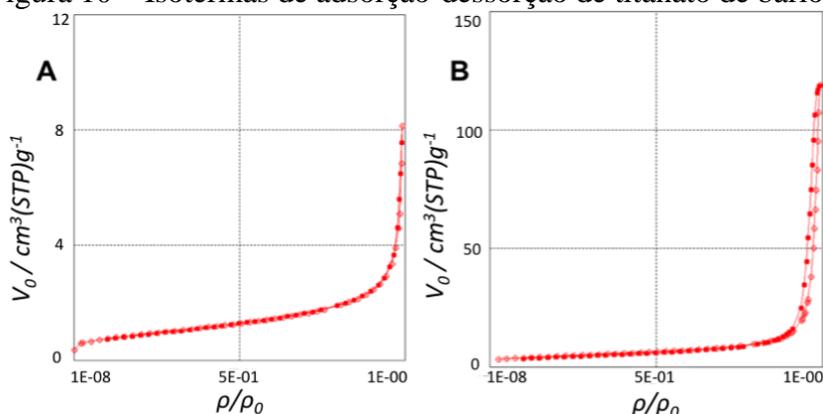


MEV: microscopia eletrônica de varredura; MET: microscopia eletrônica de transmissão;
BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP titanato de bário nanomizado.

Na Figura 10, pode-se ver as isotermas de adsorção-dessorção dos pós de BT. A área de superfície foi calculada como sendo $3,24 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para BT MP e $16,60 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para BT

NP. Os volumes totais dos poros foram, respectivamente, 0,006 e 0,07 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ e os diâmetros médios dos poros foram, respectivamente, 7,34 e 17,46 nm. Também é interessante notar que a isoterma de BT NP mostra uma ligeira histerese em alta pressão relativa, que é um resultado da dessorção de gás no interior dos poros de uma forma diferente do que foi originalmente absorvida, o que geralmente acontece quando o material possui meso- (2-50 nm) ou macroporos ($> 50\text{nm}$) (ZHU *et al.*, 2003). A histerese é, portanto, explicada pelo fato de o nanomaterial apresentar poros maiores do que o micro.

Figura 10 – Isotermas de adsorção-dessorção de titanato de bário.

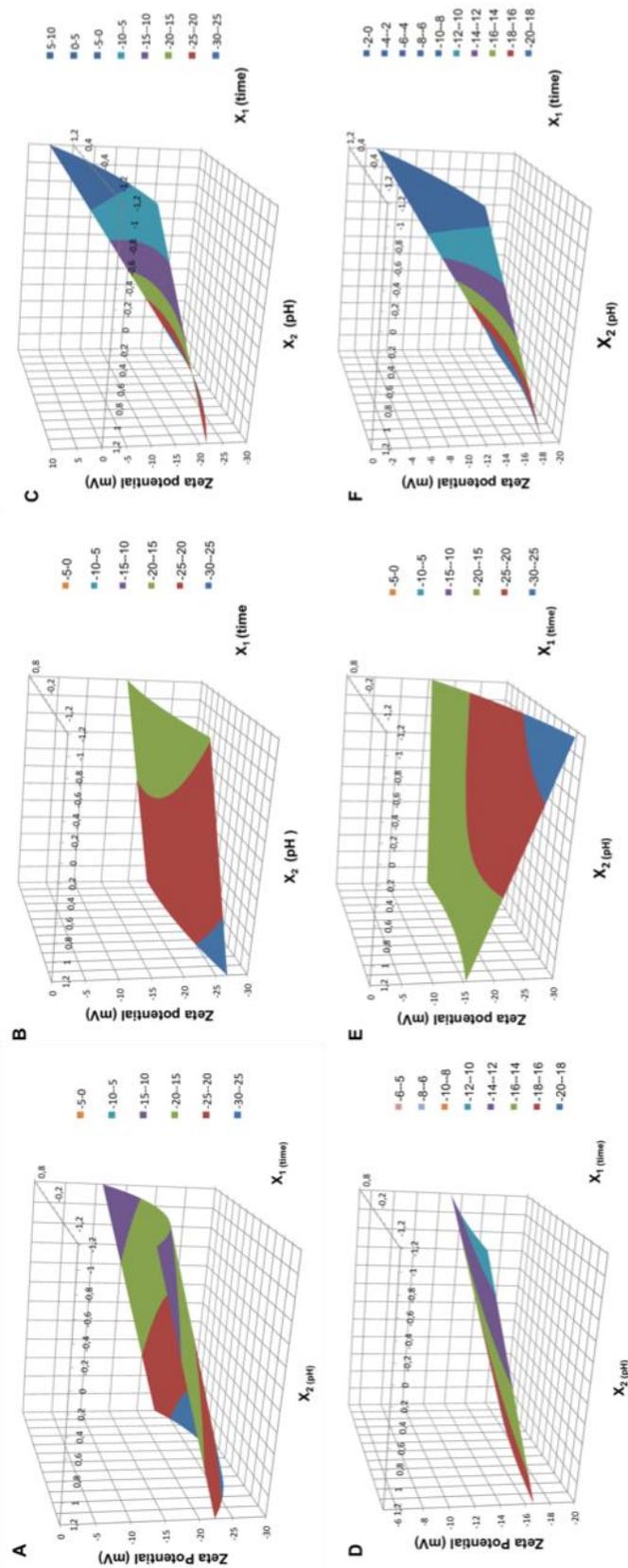


A: titanato de bário micronizado. B: titanato de bário nanoestruturado.

Conhecida a natureza dos pós (composição, tamanho, forma e área de superfície), focou-se em seu comportamento em meio aquoso (estado de dispersão e carga de superfície). Como citado anteriormente, é fundamental que a caracterização das partículas seja realizada em meios relevantes (JIANG *et al.*, 2009), ou seja, aqueles em que os experimentos ecotoxicológicos são realizados. Isso porque possíveis alterações físico-químicas (por exemplo, a aglomeração/agregação e variação de carga de superfície) podem ocorrer com as partículas em soluções diferentes, o que, por sua vez, pode ter impacto direto sobre as respostas toxicológicas (POWERS *et al.*, 2007). Por este motivo, realizou-se os ensaios em ARS, BB e MM.

Como o BT apresenta uma estrutura de perovskita, é esperada a observação de instabilidade termodinâmica e reatividade em meio aquoso (LEE , 1998), e isso foi evidenciado pelas medidas de DLS realizadas. Os resultados de ζ (Figura 11) mostram que, de uma maneira geral, ambas as partículas são carregadas negativamente, e esta carga tende a diminuir em módulo com valores de pH baixos e maior tempo em suspensão.

Figura 11 – Potencial zeta de (A) BT MP em BB, (B) BT MP em MM, (C) BT MP em ARS, (D) BT NP em BB, (E) BT NP em MM e (F) BT NP em ARS.



BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; BB: meio de cultura *Bold's Basal*; MM: meio de cultura mineral; ARS: água do rio Sena.

BT MP apresentou-se mais estável em meios BB e MM, conforme se pode observar pelas superfícies de resposta mais planas e pela carga em ARS ficar próxima a 0 com o tempo em suspensão. O mesmo comportamento foi observado para BT NP, exceto em MM, em que a carga ultrapassou -30 mV no início das experiências, com valores de pH mais baixos, mas em seguida tendeu a aproximar a 0. Excetuando-se este caso, nenhum dos materiais apresentaram valores suficientemente elevados para garantir a estabilidade coloidal, que deve ser no mínimo 25 mV (VERWEY; OBERVEEK, 1948; PLANCHON *et al.*, 2013). Esta instabilidade pode ser observada a olho nu como sedimentação na suspensão após algumas horas de preparo. Quanto aos meios, ARS propiciou uma instabilidade mais acentuada para as partículas. Como a carga de superfície afeta a absorção e a translocação das partículas por organismos vivos (HOSHINO *et al.*, 2004), pode-se esperar que as partículas irão mostrar efeitos distintos sobre os micro-organismos, quer devido à sua própria natureza, ou devido a seu diferente comportamento em cada meio.

Os dados de ζ levam à afirmação de que o tamanho dos agregados não afeta o ζ , pois ele se mantém negativo desde o momento de preparo das suspensões até 96 h após o mesmo. Quanto ao pH, vê-se também uma tendência quase de forma linear: quanto maior o pH, mais negativa a carga é, com apenas algumas exceções. O pH pode ser associado com as variações nos valores ζ uma vez que os meios ácidos lixiviam o Ba^{2+} da superfície do BT, tornando o ζ perto de 0 (suspensão instável). A dissolução (ver adiante) pode ter tornado a superfície de BT rica em Ti, isto é, uma superfície mais ácida. O aumento do pH, por sua vez, diminui a dissolução de Ba^{2+} ou causa reabsorção do cátion.

O pH também pode afetar o ζ das dispersões porque em materiais como o BT a ionização de superfície é diretamente responsável pela carga de superfície (MORRISON; ROSS, 2002). Ainda, espera-se que os pontos isoelétricos (o ponto em que as partículas têm carga zero), como mostrado, sejam inferiores a 3, o que é anômalo, mas já foi relatado em estudos anteriores (CHEN *et al.*, 1992; LEE, 1998) e pode ser devido à remoção de Ba^{2+} da superfície do BT.

Outro parâmetro físico-químico das partículas que está diretamente relacionado com a sua interação com os sistemas vivos é o seu tamanho hidrodinâmico, uma vez que, a exemplo do ζ , o mesmo está relacionado com o grau de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de organismos vivos (JIANG *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2007).

O tamanho hidrodinâmico das partículas é normalmente maior do que na forma de pó, isto é, sua dimensão primária. No entanto, é importante saber se esse tamanho maior é devido às ligações fracas entre as partículas primárias, isto é, aglomeração, ou devido a

ligações fortes, ou seja, agregação (JIANG *et al.*, 2009). Essa inclinação das partículas para formar aglomerados é, por sua vez, regulada pela força de repulsão eletrostática e pelas forças de atração de van der Waals, e também por forças de natureza espacial, de acordo com a teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) (DERJAGUIN; LANDAU, 1941). Isto é importante porque diferentes ligações conduzem a diferentes respostas biológicas.

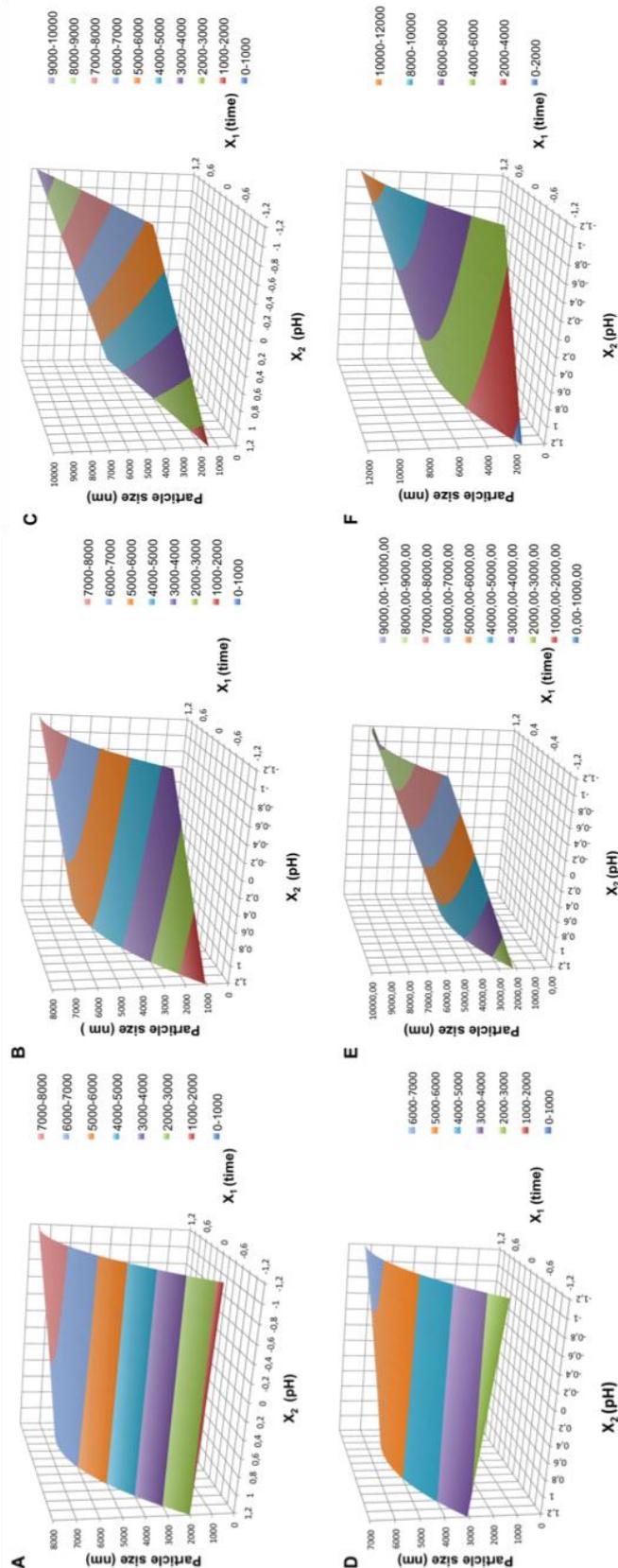
O tamanho hidrodinâmico das partículas foi avaliado como uma função do pH e do tempo (Figura 12), da mesma maneira como foi realizada a medição do ζ . Em meio BB, o pH não influenciou o tamanho de agregados, ao contrário do tempo, que desempenhou um papel importante sobre este parâmetro, como os agregados parecem aumentar em grande medida ao longo dos dias em ambas as partículas. O mesmo fenômeno ocorreu em MM e ARS, mas, nestes casos, a diminuição do pH também levou a um aumento nos tamanhos de agregados. Para MM, os agregados de BT NP foram maiores do que os de BT MP.

De acordo com os resultados, nenhuma tendência pôde ser vista, uma vez que não seguem uma relação linear com o tempo ou o pH. A representação gráfica como uma função de tempo e de pH, na Figura 12, permite uma mais fácil interpretação dos fenômenos. Ambos os fatores atuam em conjunto, mas de uma maneira geral se espera que os maiores aglomerados sejam encontrados em níveis mais elevados de tempo (valores maiores de tempo) e níveis mais baixos de pH.

É também bom lembrar que os resultados da determinação do tamanho hidrodinâmico são dados como uma distribuição média da intensidade de tamanho, mas *in loco* as partículas são muitas vezes dispersas como grupos com tamanhos diferentes (polidispersão). Quanto menos instável a dispersão, mais os grupos de diferentes tamanhos são esperados a coexistir, o que pode explicar em parte os resultados encontrados.

As duas principais características aqui estudadas, o ζ e o tamanho hidrodinâmico, podem ser explicados utilizando os conhecimentos dos efeitos causados pela alteração do pH das dispersões. O quão mais distante é o pH do ponto isoelétrico (ou seja, quanto maior o pH), maior é o valor absoluto de ζ , que está de acordo com os resultados. Neste caso, a força de van der Waals é dominada pela força de repulsão eletrostática, e a aglomeração é reduzida em algum grau, o que explica porque os aglomerados são menores nos valores de pH mais elevados. Por outro lado, próximo do ponto isoelétrico (~ 3) a carga de superfície é menor, assim como a força de repulsão, o que faz com que o tamanho hidrodinâmico aumente.

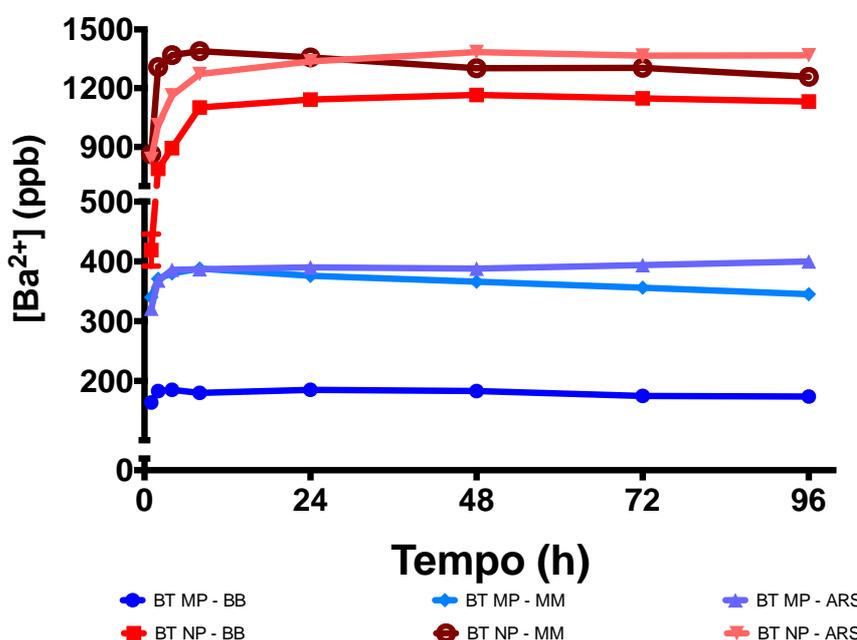
Figura 12 – Tamanho hidrodinâmico de A) BT MP em BB, (B) BT MP em MM, (C) BT MP em ARS, (D) BT NP em BB, (E) BT NP em MM e (F) BT NP em ARS.



BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado;
 BB: meio de cultura *Bold's Basal*; MM: meio de cultura mineral; ARS: água do rio Sena.

Finalmente, o grau de dissolução das partículas também foi avaliado, uma vez que a liberação de íons para os meios de cultura podem ser responsáveis por um diferente grau e mecanismo de toxicidade para os micro-organismos. Esta foi avaliada por meio de ultrafiltração, seguido pela quantificação de Ba^{2+} lixiviado das partículas para os meios de cultura em pH 7,0 para BB, 4,0 para o MM e 8,01 para SRW (pHs nos quais os ensaios de toxicidade foram realizados) (Figura 13).

Figura 13 – Perfil de dissolução de pós de titanato de bário em termos de Ba^{2+} lixiviado da superfície em função do tempo.

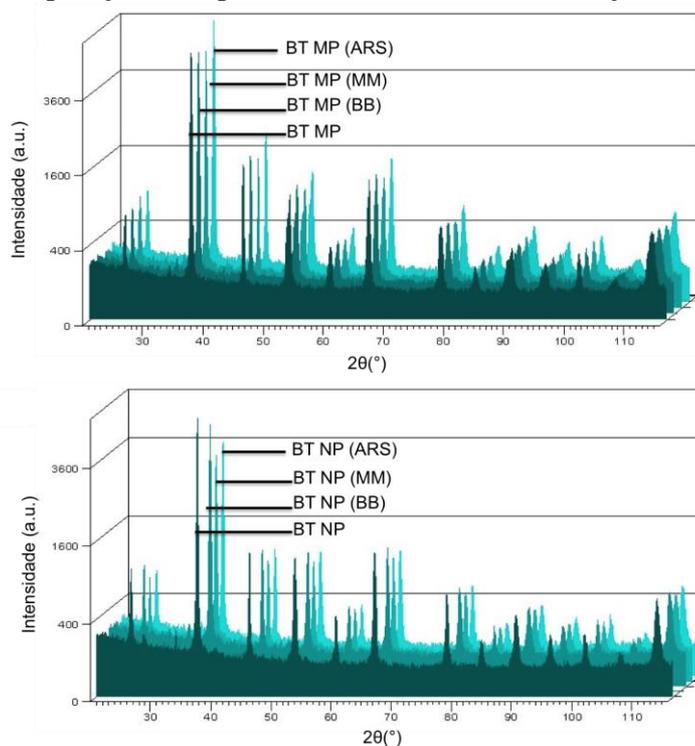


BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; BB: meio de cultura *Bold's Basal*; MM: meio de cultura mineral; ARS: água do rio Sena.

BT NP liberou mais Ba^{2+} nos meios do que BT MP – 1.132 ppb após 96 h em meio BB, 6,5 vezes mais do que BT MP no mesmo meio; 1.258 ppb após 96 h em MM contra 345 ppb de BT MP, 3,6 vezes mais; e 1.368 ppb em SRW após o mesmo período, 3,4 vezes maior do que a BT MP. A ARS teve um efeito mais pronunciado no fenômeno, uma vez que dissolveu BT MP 2,9 vezes mais do que o meio BB e 1,15 mais do que MM, e BT NP 1,2 vezes mais que BB e 1,08 mais que MM. Essas diferenças podem ser atribuídas mais a diferenças de composição entre os dois meios do que a seus pHs, uma vez que a ARS tem um valor de pH apenas ligeiramente maior do que o meio BB – embora a diferença seja grande entre MM e os outros. No entanto, as taxas de dissolução dos pós em BB ou ARS não foram superiores a 1,5%. Esta é a razão pela qual esta foi a concentração de íons Ba^{2+} livre escolhida ($1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $7,28 \times 10^{-6} \text{ M}$) para realizar a avaliação toxicológica.

Após as 96 h de experimento, os difratogramas de DRX dos pós restantes foram avaliados (Figura 14), e não foi observada nenhuma diferença significativa em nenhum meio. Análises por XPS dos resíduos também foram realizadas (química da superfície), e os resultados podem ser vistos na Tabela 5. A relação Ba/Ti/O está em bom acordo com a baixa solubilidade verificada por ICP- OES. O carbono (C) é uma impureza comum em ultra-alto vácuo (UAV), e os sinais ao redor de 285 eV (hidrocarboneto) são normalmente utilizados como padrão interno de referência a outros elementos quando ocorrem fenômenos de carregamento elétrico (LÓPEZ *et al.*, 1999). No entanto, a sua presença em mais de um estado é um indicativo da formação de carbonato de bário, BaCO_3 (também observado pela energia de ligação de Ba em ~ 780 eV). A deconvolução do pico C 1s revelou um pico de carbonato na superfície do BT, em 288-289 eV. O BaCO_3 pode ser um subproduto da síntese de BaTiO_3 , qualquer seja a via de síntese, ou pode também ser derivado da tendência para a adsorção de CO_2 que existe em superfícies de perovskitas, devido a uma interação dipolo-dipolo entre o cristal BaTiO_3 ferroelétrico e a molécula de CO_2 polar (LÓPEZ *et al.*, 1999). Como este componente está presente somente em traços, é mais provável que o carbonato seja formado como uma segunda fase discreta ($\sim 2\%$) em vez de uma película de superfície.

Figura 14 – Difratogramas de resíduos de titanato de bário após 96 h em contato com BB, MM ou ARS e comparação com pós intactos. Nenhuma mudança estrutural foi verificada.



BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; BB: meio de cultura *Bold's Basal*; MM: meio de cultura mineral; ARS: água do rio Sena.

Tabela 5 – Resultados da análise de espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) de resíduos de titanato de bário após 96 h em contato com BB, MM ou ARS.

Amostra	Elemento	Centro (eV)	Átomo%*
BT MP (BB)	C 1s	285,00	24,62
	K 2p	293,07	0,62
	Ti 2p	458,38	12,77
	O 1s	529,84	50,55
	Ba 3d _{5/2}	779,00	11,44
BT NP (BB)	C 1s	284,98	31,11
	K 2p	292,98	0,43
	Ti 2p	458,37	9,91
	O 1s	529,71	47,42
	Ba 3d _{5/2}	779,01	11,12
BT MP (MM)	C 1s	284,97	30,84
	K 2p	292,88	0,31
	Ti 2p	458,58	11,79
	O 1s	529,98	47,10
	Ba 3d _{5/2}	779,15	9,96
BT NP (MM)	C 1s	285,05	21,49
	K 2p	293,02	0,36
	Ti 2p	458,52	11,78
	O 1s	530,03	53,62
	Ba 3d _{5/2}	779,28	12,75
BT MP (ARS)	C 1s	284,93	25,20
	C 1s A	286,62	4,74
	C 1s B	288,97	2,14
	Ti 2p	458,00	12,23
	O 1s	529,31	11,22
	Ba 3d _{5/2}	778,56	44,47
BT NP (ARS)	C 1s	285,01	21,98
	C 1s A	286,51	3,92
	C 1s B	288,83	2,64
	Ti 2p	458,30	12,84
	O 1s	529,45	45,31
	Ba 3d _{5/2}	778,82	13,31

*resultados corrigidos para a contaminação de carbono em ultra-alto vácuo.

BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; BB: meio de cultura *Bold's Basal*; MM: meio de cultura mineral; ARS: água do rio Sena.

5.2 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE

A avaliação toxicológica foi conduzida usando não somente meios de cultura artificiais tradicionais, mas também ARS, no pressuposto de que os meios de cultura podem

não ser sempre representativos do comportamento real de partículas no meio ambiente. Apesar de a extensão da liberação de nanopartículas no meio ambiente ainda ser incógnita, uma certeza é que as águas de superfície desempenham um papel importante como um vetor neste processo (GOTTSCHALK *et al.*, 2009).

Ainda, utilizou-se três organismos-teste neste estudo bastante diferentes morfológica e metabolicamente (Figura 15), o que pode ser útil para se ter uma visão mais ampla dos efeitos destas partículas no ambiente aquático.

Figura 15 – Microscopias ópticas de (A) *C. vulgaris*, (B) *A. flos-aquae* e (C) *E. gracilis*.



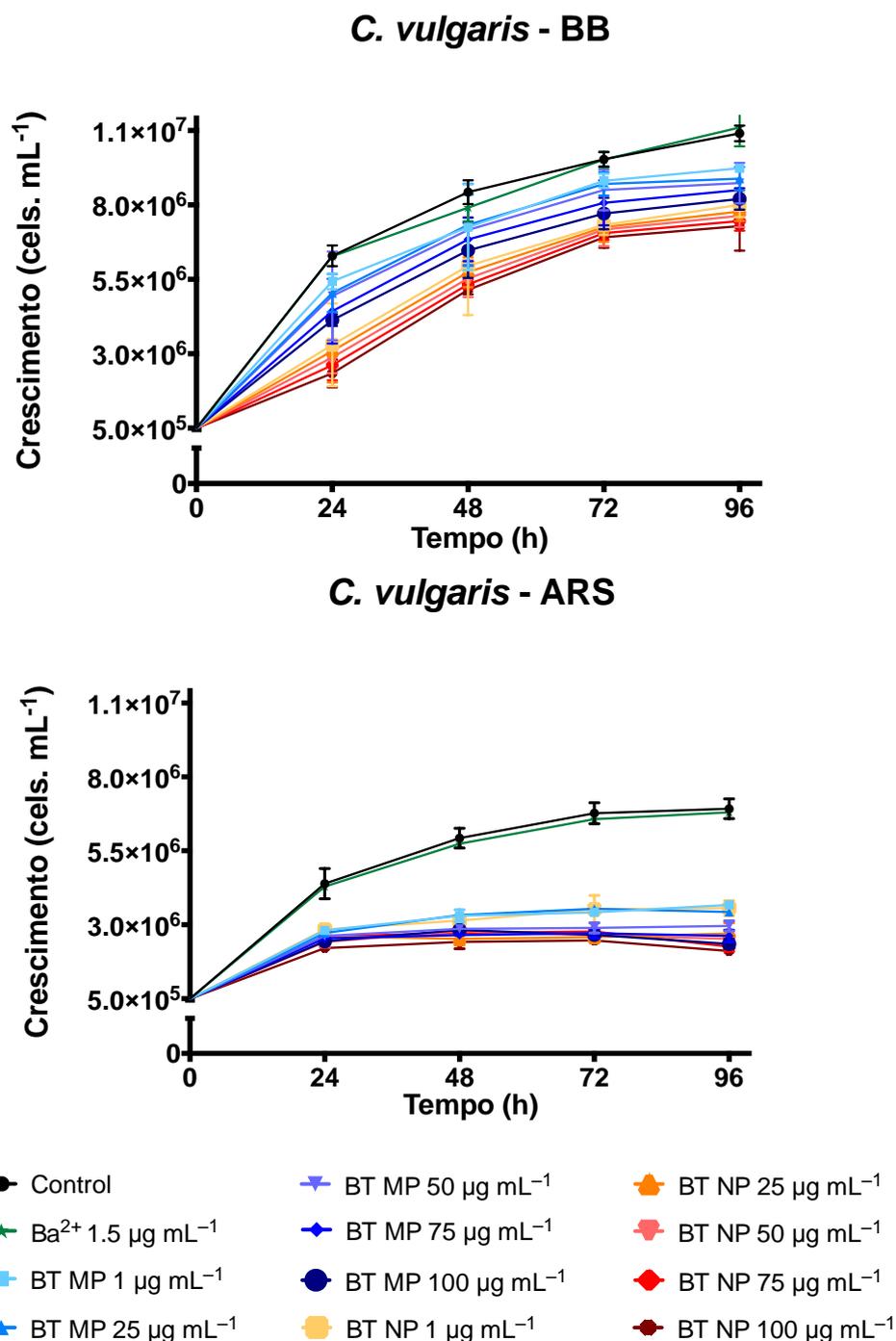
C. vulgaris são algas verdes unicelulares eucariotas de forma arredondada ou elipsoide, com diâmetro médio de 5 µm. Elas possuem um cloroplasto parietal que contém clorofila a e b e carotenoides. O amido é sua reserva majoritária de glicídeos e sua membrana celular externa é composta de três folhas membranas contendo glicosamina (ALLARD *et al.*, 2000; VAN DEN HOEK *et al.*, 1995).

As cianobactérias *A. flos-aquae* são compostas por um série linear de células vegetativas e, geralmente, possuem uma grande quantidade de heterocistos de parede grossa dispersos ao longo de toda o tricoma (BRAYNER *et al.*, 2010; 2011).

As algas *E. gracilis*, por sua vez, apresentam uma plasticidade metabólica notável, uma vez que podem comportar-se tanto como autotróficas e fotossintéticas (quando cultivadas na presença de luz, apresentando-se macroscopicamente na cor verde) quanto como heterotróficas (quando cultivadas no escuro, sendo neste caso incolor) (EINICKER-LAMAS *et al.*, 2002). No presente estudo, modulou-se as culturas para terem um comportamento autotrófico. Além disso, elas possuem a capacidade de endocitar partículas e de se mover por meio de um flagelo, uma estrutura longa em forma de chicote (BRAYNER *et al.*, 2010; 2011).

Na primeira fase, os efeitos diretos sobre o crescimento destes organismos foram avaliados após a adição de BT MP e BT NP em diferentes concentrações (Figuras 16, 17 e 18).

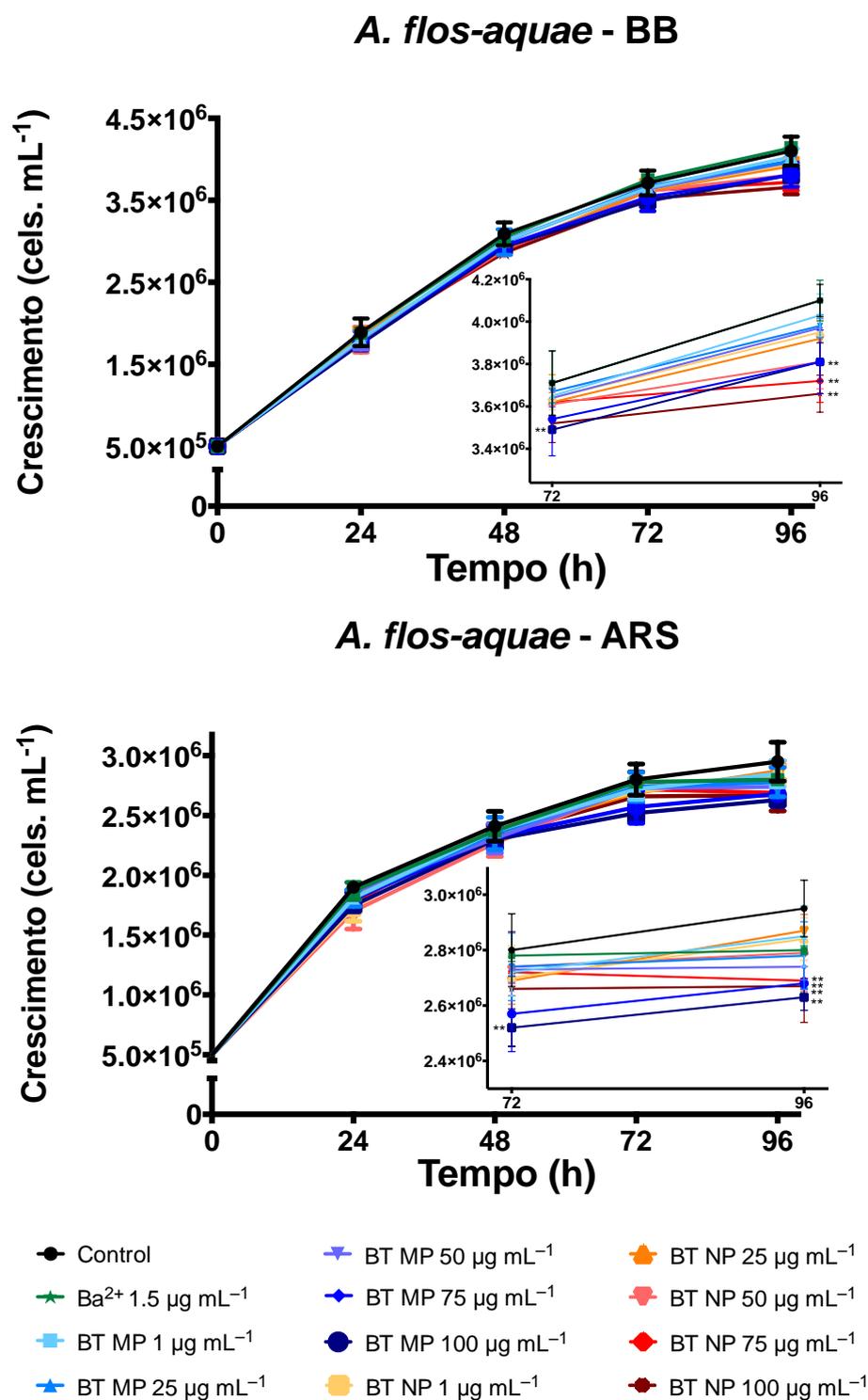
Figura 16 – Contagem celular de *C. vulgaris* em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário.



BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; BB: meio de cultura *Bold's Basal*; ARS: água do rio Sena.

Todas as concentrações de ambos os materiais em todas as contagens(exceto íons Ba²⁺) apresentaram efeito significativo no crescimento das algas ($p < 0,05$).

Figura 17 – Contagem celular de *A. flos-aquae* em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário.



BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; BB: meio de cultura *Bold's Basal*; ARS: água do rio Sena.

A Figura 16 mostra a taxa de crescimento de *C. vulgaris* como uma função do tempo de exposição às partículas de BT. Apesar da relativamente breve duração do teste, os efeitos ao longo de várias gerações podem ser avaliados por causa da taxa de divisão que as

algas possuem. Como a resposta do sistema é a redução do crescimento das células expostas, pode-se inferir que tanto BT MP e BT NP foram tóxicos para *C. vulgaris* em BB e ARS, em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$), embora pareça que este efeito aumente com a concentração. No entanto, este efeito foi observado desde a primeira determinação de contagem de células (24 h).

Para *A. flos-aquae* (Figura 17), os efeitos tóxicos foram significativos apenas após 72 h de exposição, e somente para as maiores concentrações dos materiais (após 96h $\geq 75 \mu\text{g mL}^{-1}$ para BT NP e $= 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para BT MP, em BB; e $\geq 75 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos os materiais em ARS).

Dentre todos os organismos, o efeito mais pronunciado foi visto em *E. gracilis* (Figura 18), para o qual tanto BT MP quanto BT NP levaram a uma inibição significativa do crescimento ($p < 0,05$) em todas as concentrações testadas, em ambos os meios, e desde a primeira contagem de células, após 24 h de contato.

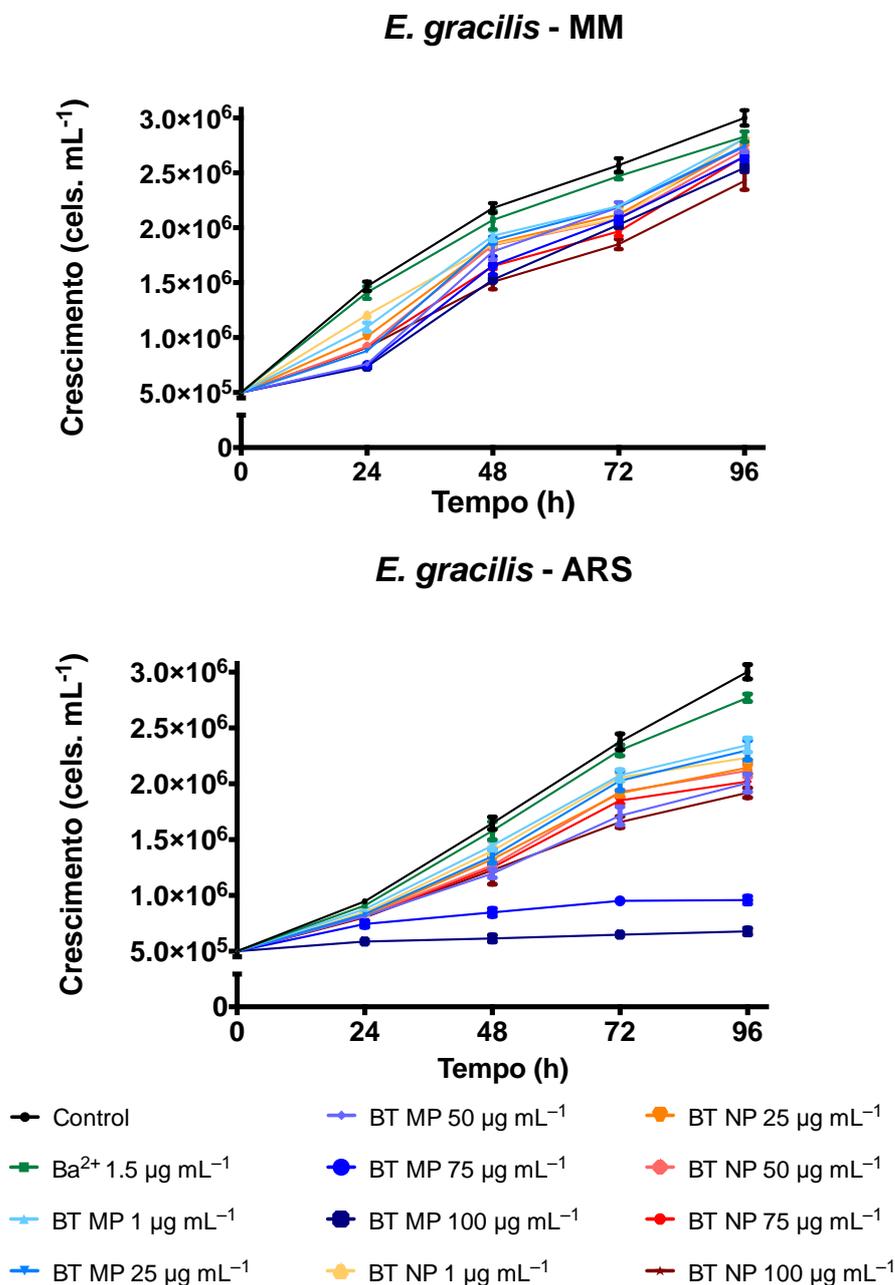
Por outro lado, Ba^{2+} não apresentou redução significativa em relação ao crescimento (nenhum para *C. vulgaris* e *A. flos-aquae* e somente após 96 h para *E. gracilis*). Apesar de o bário ser conhecido por ser reativo com o ar e a água (FROMM, 2013), a sua toxicidade é menor do que a maioria dos metais pesados (LÓPEZ-ROLDAN *et al.*, 2013), e estudos anteriores confirmam que esta metal alcalino terroso é tóxico apenas em concentrações muito elevadas (LAMB *et al.*, 2013; MONTEIRO *et al.*, 2011; KOPITTKKE *et al.*, 2011), inclusive para *C. vulgaris* (DEN DOORE DE JONG, 1965). No entanto, também pode ser observado que a inibição de crescimento foi ligeiramente mais pronunciada em ARS que em BB ou MM.

Em relação aos meios utilizados, a redução no crescimento foi muito mais pronunciada em ARS, o que era esperado ao se avaliar os resultados de caracterização, uma vez que foi detectada maior reatividade neste meio. As contagens celulares mais baixas observadas em ARS também podem ter ocorrido devido a uma escassez de nutrientes (nitrato, fosfato, fontes de carbono como a glicose), o que é frequentemente observado no rio Sena (PLANCHON, 2013). Assim, um pior estado fisiológico dos organismos em ARS pode ocorrer e levar a uma menor resistência. Ainda, a possibilidade de um efeito sinérgico com algum contaminante do rio não pode ser descartada.

Quanto ao ensaio realizado para avaliar a viabilidade dos organismos (Figura 19), observou-se que *C. vulgaris* exposta a BT em ambos os meios apresentou uma diminuição da capacidade de excluir corante, embora em BB as menores concentrações de BT MP ($1-50 \mu\text{g}$

mL^{-1}) parecem não afetar a integridade da membrana, independentemente do tempo de exposição, enquanto BT NP afetou este parâmetro em todas as concentrações.

Figura 18 – Contagem celular de *E. gracilis* em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário.



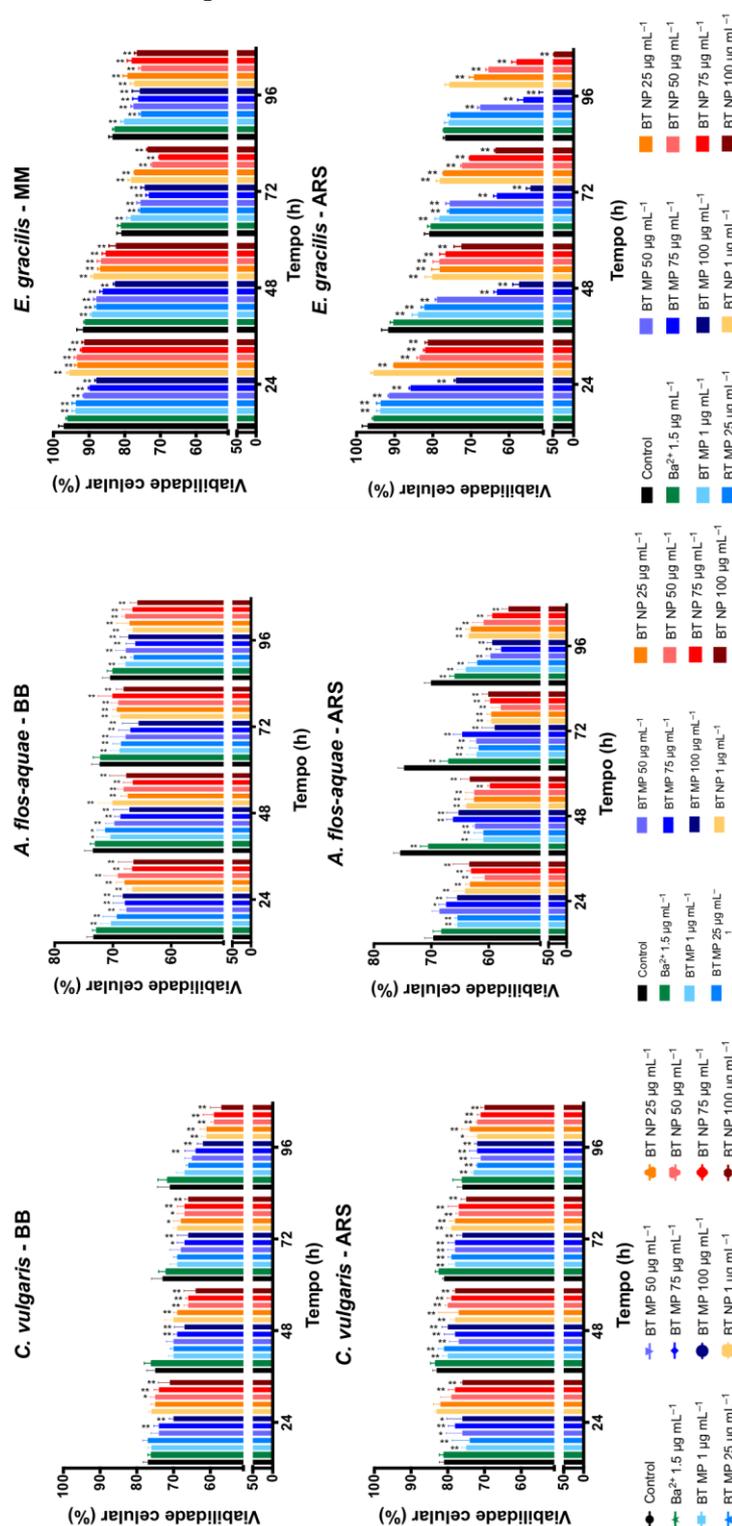
BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; MM: meio de cultura mineral; ARS: água do rio Sena.

Todas as concentrações de ambos os materiais em todas as contagens (íons Ba^{2+} somente após 96 h) apresentaram efeito significativo no crescimento das algas ($p < 0,05$).

A. flos-aquae, por sua vez mostrou resultados discrepantes. Enquanto nenhuma inibição significativa do crescimento foi observada, a viabilidade da sua membrana mostrou-

se diminuída em todas as concentrações, em ambas substâncias, desde o primeiro dia, no meio BB ou ARS – embora as diferenças serem mais pronunciadas neste último.

Figura 19 – Viabilidade celular em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário



BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; BB: meio de cultura *Bold's Basal*; MM: meio de cultura mineral; ARS: água do rio Sena.

Para *E. gracilis*, os resultados seguiram a mesma lógica vista em *C. vulgaris*, e a diminuição na contagem foi acompanhada de diminuição na integridade membranar.

A avaliação da integralidade da membrana celular foi realizada por meio do método de exclusão de corante, com base no princípio de que as células vivas intactas possuem membranas seletivas que excluem determinados corantes diazo, como o azul de tripano, enquanto as células mortas não o fazem (STROBER, 2001). Normalmente os resultados de viabilidade podem ser correlacionados com a mortalidade de células. No entanto, isso pode ser verdade para *C. vulgaris* e *E. gracilis*, mas não para *A. flos-aquae*. Para este último, podemos supor que as células perderam um pouco de sua funcionalidade de membrana, mas isso não representou, necessariamente, um evento fatal. A célula provavelmente desenvolveu algum mecanismo desconhecido para sobreviver nessa situação adversa.

Novamente, a ARS apresentou menores viabilidades celulares que os meios artificiais. Uma possível explicação para este fato é que os meios de cultura podem influenciar a expressão de proteínas da membrana celular (HANIU *et al.*, 2013).

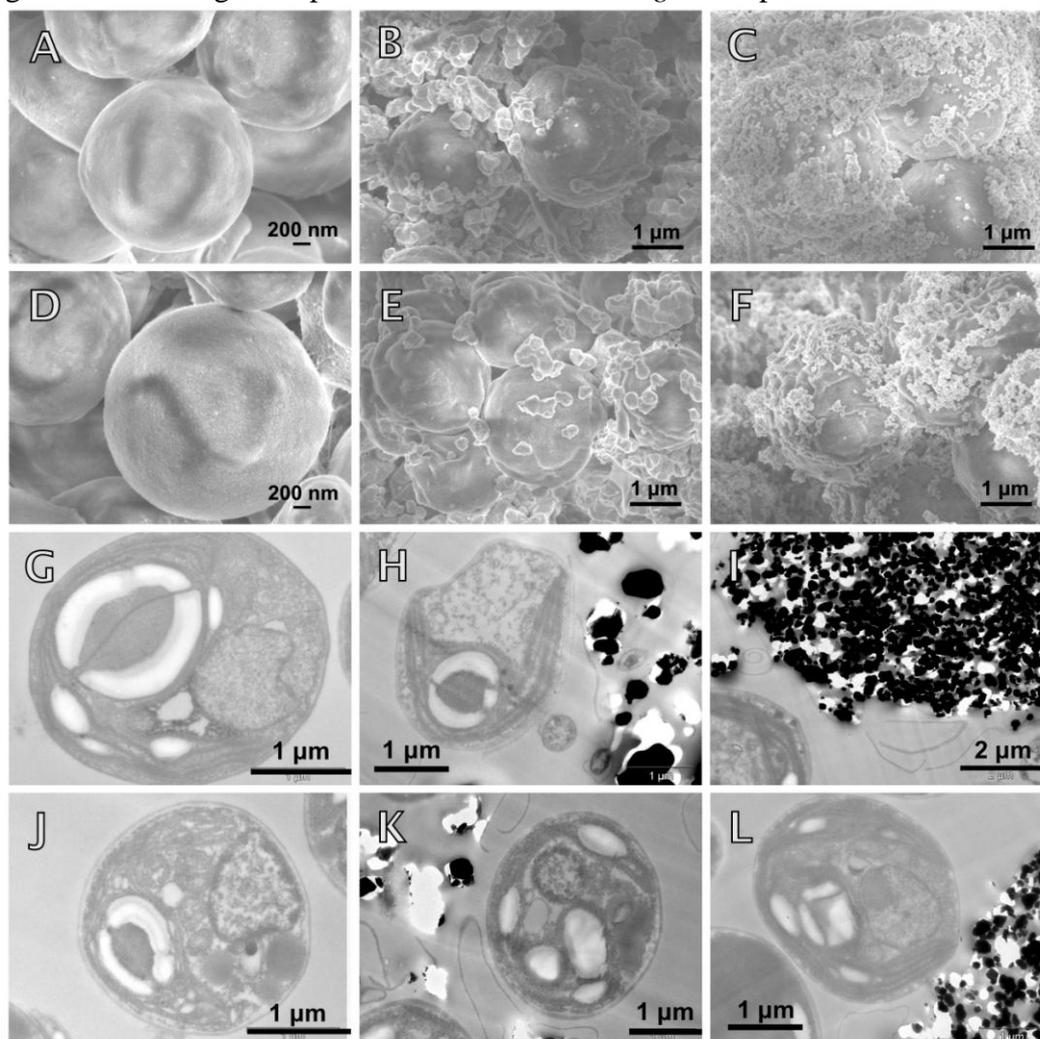
5.3 AVALIAÇÃO DOS FATORES LIGADOS À TOXICIDADE

Uma vez verificada a toxicidade de BT para os organismos-teste, considerou-se que os dois possíveis mecanismos da toxicidade observada seriam: (i) um contato direto das partículas de BT com a parede celular (GOGNIAT *et al.*, 2006), ligado a uma penetração teórica das menores partículas e/ou dos íons liberados (PLANCHON *et al.*, 2013); e/ou (ii) um efeito indireto através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BRAYNER *et al.*, 2006; CHAE *et al.*, 2011). Assim, foram realizados diferentes ensaios para avaliar qual é o possível mecanismo envolvido na toxicidade de BT para os organismos-modelo.

Partindo-se da primeira teoria, ligada à adsorção e penetração de BT pela membrana celular, MEV e MET foram realizados. Para *C. vulgaris*, por MEV (Figura 20) pode-se ver que não há nenhuma partícula de BT MP ou BT NP adsorvido pelas membranas de algas, e por MET pode-se ver que não há nenhuma partícula detectável no interior de vesículas celulares. Ao contrário, o que pode ser observado é a formação de agregados de partículas grandes e compactos dentro das culturas, circundando as células, mas sem contato direto. As imagens mostraram que as células expostas produziram um material de tipo goma, que não foi observado nos controles. Estudos anteriores já detectaram este fenômeno, relacionado com a capacidade das células de *C. vulgaris* de produzir um polímero de alto peso

molecular composto de moléculas de açúcar conhecido como exopolissacarídeo (EPS) como uma forma de proteção adaptativa (PEREIRA *et al.*, 2014). Este EPS não só impediu o contato direto das partículas com as células, mas também propiciou a formação de agregados de partículas inertes cercando as algas, o que impediu a internalização de partículas.

Figura 20 – Micrografias por MEV e MET de *C. vulgaris* expostas a titanato de bário.



MEV em BB [(A) controle, (B) exposto a BT MP, (C) exposto a BT NP] e em ARS [(D) controle, (E) exposto a BT MP, (F) exposto a BT NP]. MET em BB [(G) controle, (H) exposto a BT MP, (I) exposto a BT NP] e em ARS [(J) controle, (K) exposto a BT MP, (L) exposto a BT NP].

MEV: microscopia eletrônica de varredura; MET: microscopia eletrônica de transmissão;

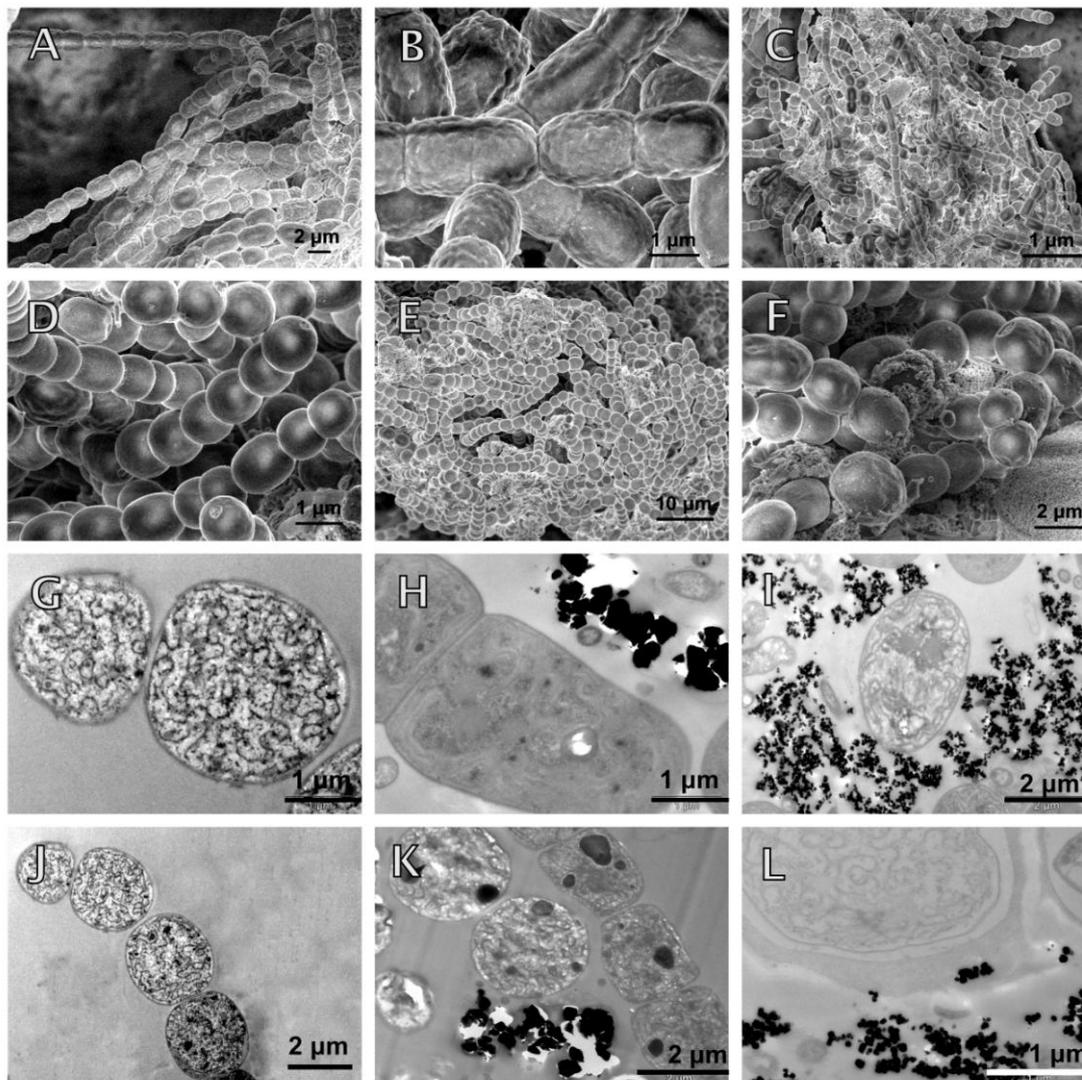
BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado;

BB: meio de cultura *Bold's Basal*; ARS: água do rio Sena.

Para *A. flos-aquae* exposta a partículas de BT por 72 h em uma concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, as imagens de MEV (Figura 21) mostram que não houveram alterações morfológicas das células com os tratamentos, embora se apresentem um pouco mais alongadas quando cultivadas em BB que em ARS. Agregados de células e de partículas foram observados (Figura 21E). O principal aspecto a ser destacado é que as partículas foram

encontradas em torno da parede celular composta por polissacarídeos, e as imagens de MET confirmam que as mesmas não penetram as células.

Figura 21 – Micrografias por MEV e MET de *A. flos-aquae* expostas a titanato de bário.



MEV em BB [(A) controle, (B) exposto a BT MP, (C) exposto a BT NP] e em ARS [(D) controle, (E) exposto a BT MP, (F) exposto a BT NP]. MET em BB [(G) controle, (H) exposto a BT MP, (I) exposto a BT NP] e em ARS [(J) controle, (K) exposto a BT MP, (L) exposto a BT NP].

MEV: microscopia eletrônica de varredura; MET: microscopia eletrônica de transmissão;

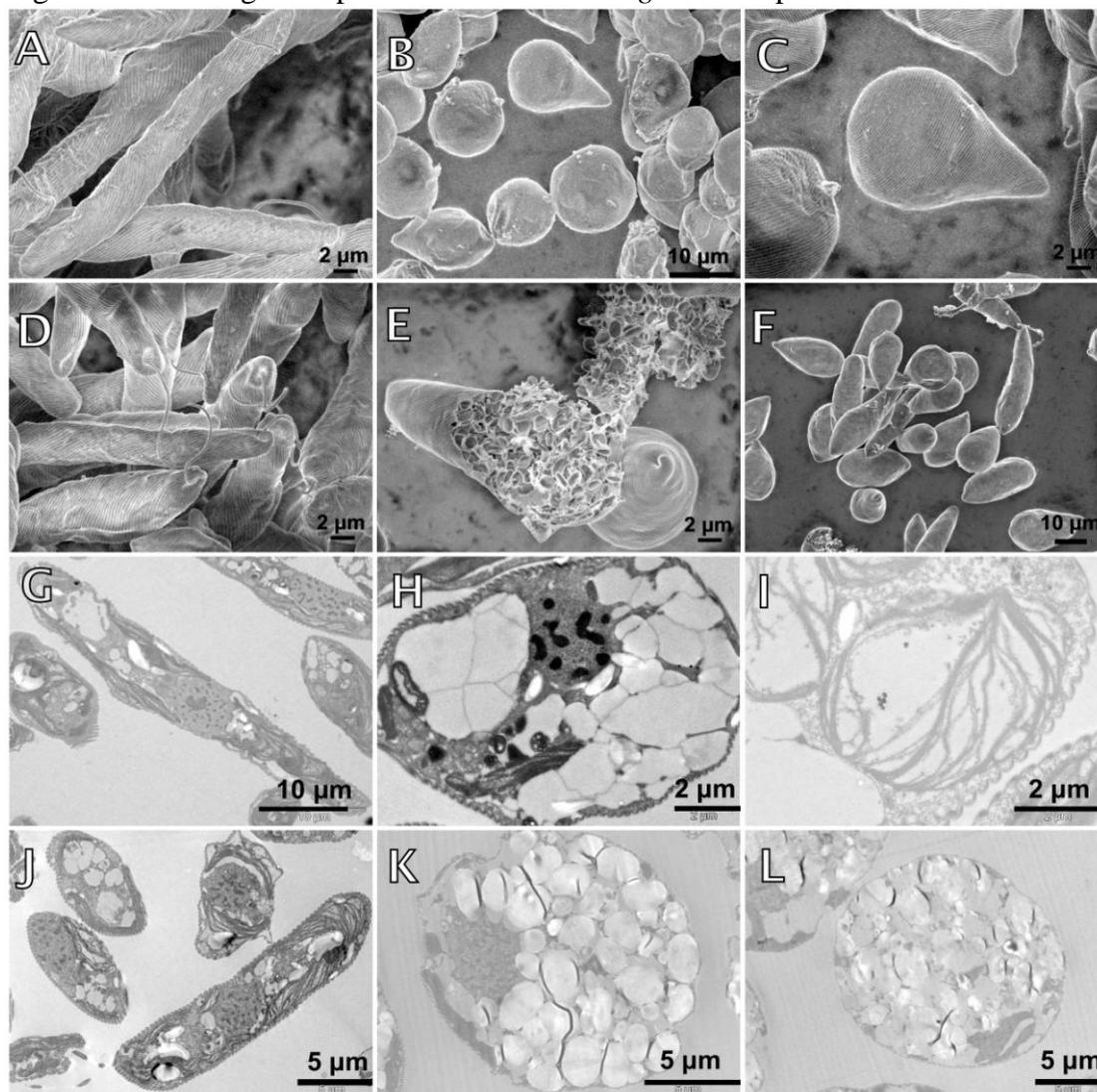
BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado;

BB: meio de cultura *Bold's Basal*; ARS: água do rio Sena.

No caso de *E. gracilis* (Figura 22), o comportamento das células sob as mesmas condições foi completamente diferente. As imagens de MEV do controle de *E. gracilis*, em ambos os meios, mostram células alongadas bem definidas com seus flagelos em forma de chicote. Os tratamentos, no entanto, diferem sobremaneira. Pode-se ver que as células expostas a ambas partículas são menores, com uma forma de peão, e sem flagelo visível. Isso acontece provavelmente por causa da endocitose das partículas de BT e também de outras

substâncias contidas nos meios de cultura. As células realizaram endocitose num tal grau que a membrana não pôde resistir e efetivamente se rompeu, como evidenciado na Figura 22E.

Figura 22 – Micrografias por MEV e MET de *E. gracilis* expostas a titanato de bário.



MEV em BB [(A) controle, (B) exposto a BT MP, (C) exposto a BT NP] e em ARS [(D) controle, (E) exposto a BT MP, (F) exposto a BT NP]. MET em BB [(G) controle, (H) exposto a BT MP, (I) exposto a BT NP] e em ARS [(J) controle, (K) exposto a BT MP, (L) exposto a BT NP].

MEV: microscopia eletrônica de varredura; MET: microscopia eletrônica de transmissão;

BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado;

BB: meio de cultura *Bold's Basal*; ARS: água do rio Sena.

As imagens de MET, por sua vez, mostram duas características principais: as nanopartículas de fato internalizadas por endocitose (Figura 22I) e um relevante aumento da produção de corpos de paramilo, um carboidrato semelhante ao amido (Figuras 22H, K e L). A clorofila encontrada em cloroplastos de *E. gracilis* é do tipo a e b, e elas participam na síntese de carboidratos que são armazenados nas células euglenófitas numa forma peculiar

conhecida como paramilo, um B-1,3 polímero de glicose. Estes corpos paramilo podem ser visualizados como bastões rígidos incolores ou brancos, e quando eles atingem uma concentração demasiado elevada para a célula manusear, as paredes celulares acabam por explodir (BRAYNER *et al.*, 2011). Neste sentido, MEV e MET foram complementares, ambos confirmando que a alta endocitose das partículas conduziu a uma superprodução de paramilo, o que causou a explosão e, conseqüentemente, a morte das células. Isto explica o fato de o número de células e sua viabilidade em *E. gracilis* serem baixos, mas em *A. flos-aquae* apenas a viabilidade ser baixa – devido ao fato de as células terem morrido ou perdido sua função, mas ainda estarem em sua forma normal quando a contagem foi realizada.

Algumas correlações podem ser encontradas entre estas observações e os resultados da carga de superfície. Por exemplo, o fenômeno da não-intervalização das partículas por *C. vulgaris* pode ser compreendido também em termos de potencial zeta. Na Figura 23, pode-se ver que as células de algas sem materiais a serem adicionados a eles são normalmente carregadas negativamente. Na Figura 23, podemos ver que ambas as partículas são também, naturalmente, carregadas negativamente. Isto é, portanto, coerente com uma repulsão eletrostática que as algas exercem sobre as partículas, e vice-versa, o que dificulta a absorção. Isto ainda seria ajudado pela produção e liberação de EPS para o meio.

Outro indicador da importância do tamanho dos agregados de BT em contato com *C. vulgaris* em sua toxicidade é o fato de que os resultados para o tamanho hidrodinâmico (Figura 23) em ambos os meios foram semelhantes, mas houve um aumento nos valores através do tempo que se seguiu a um aumento na inibição do crescimento e na viabilidade das células. Este aumento pode ser devido a um aumento da produção e liberação de EPS, que gradualmente aprisionam uma maior quantidade de partículas.

O mesmo raciocínio em relação aos efeitos de carga vale para *A. flos-aquae*: a carga das células é negativa (Figura 23), bem como as próprias partículas (Figura 11). Isto é coerente com uma repulsão eletrostática entre partículas e algas, o que dificulta a absorção.

Quanto a *E. gracilis*, a sua carga de superfície também é negativa, mas muito próxima de 0, e por isso esta força repulsiva não seria forte o suficiente para impedir a endocitose.

Figura 23 – Efeito de titanato de bário na agregação (tamanho hidrodinâmico) e carga de superfície (potencial Zeta) de *C. vulgaris*, *A. flos-aquae* e *E. gracilis* em função do tempo de exposição.

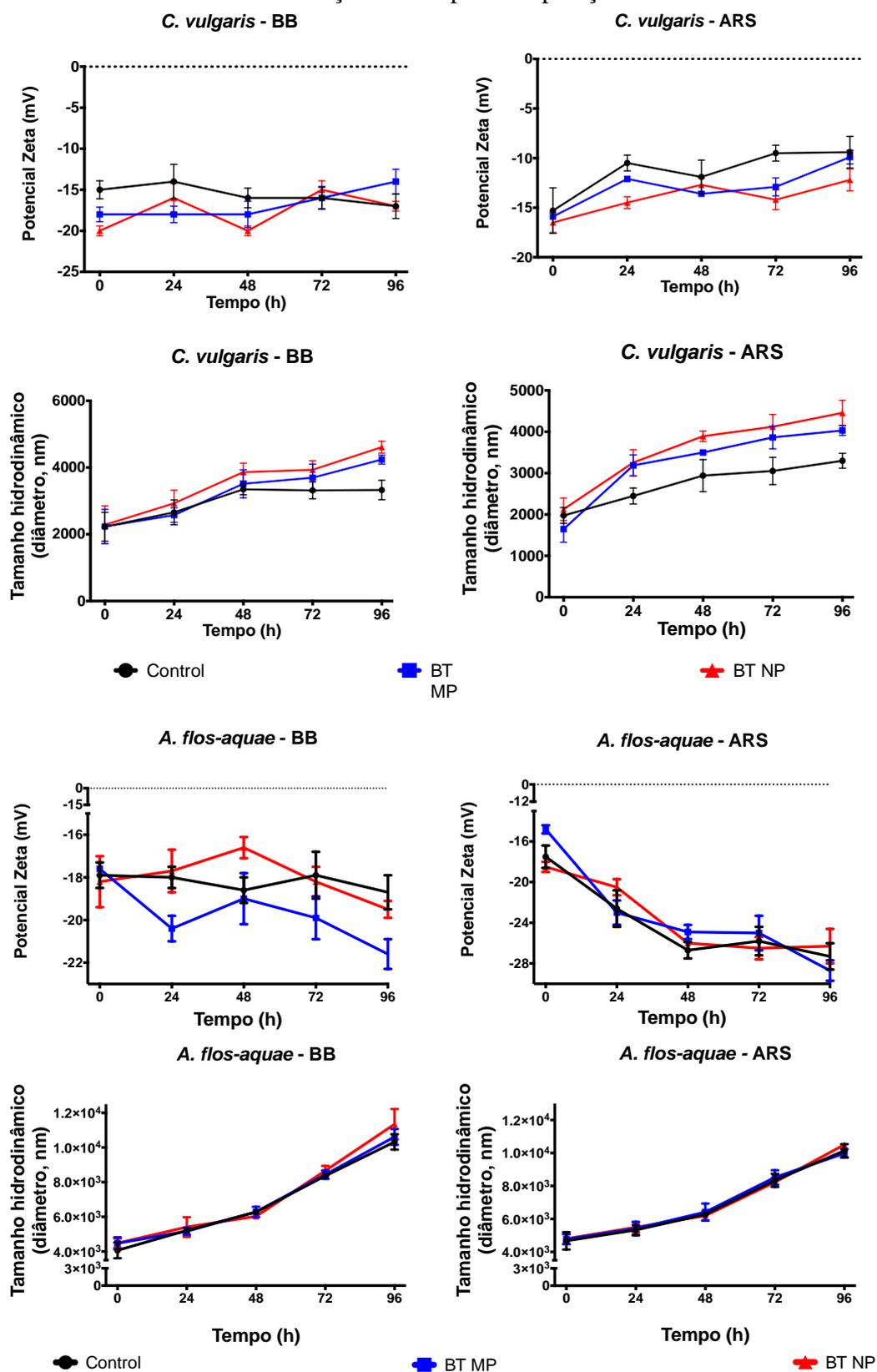
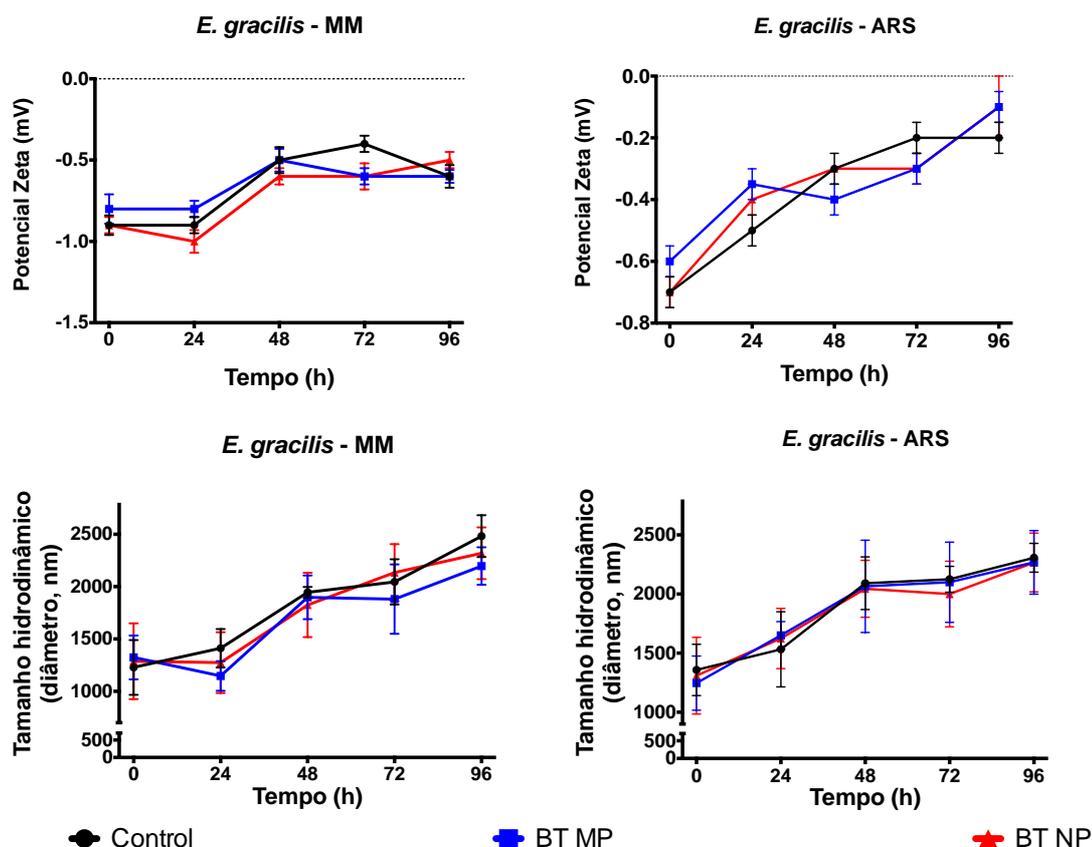


Figura 23 – continuação.



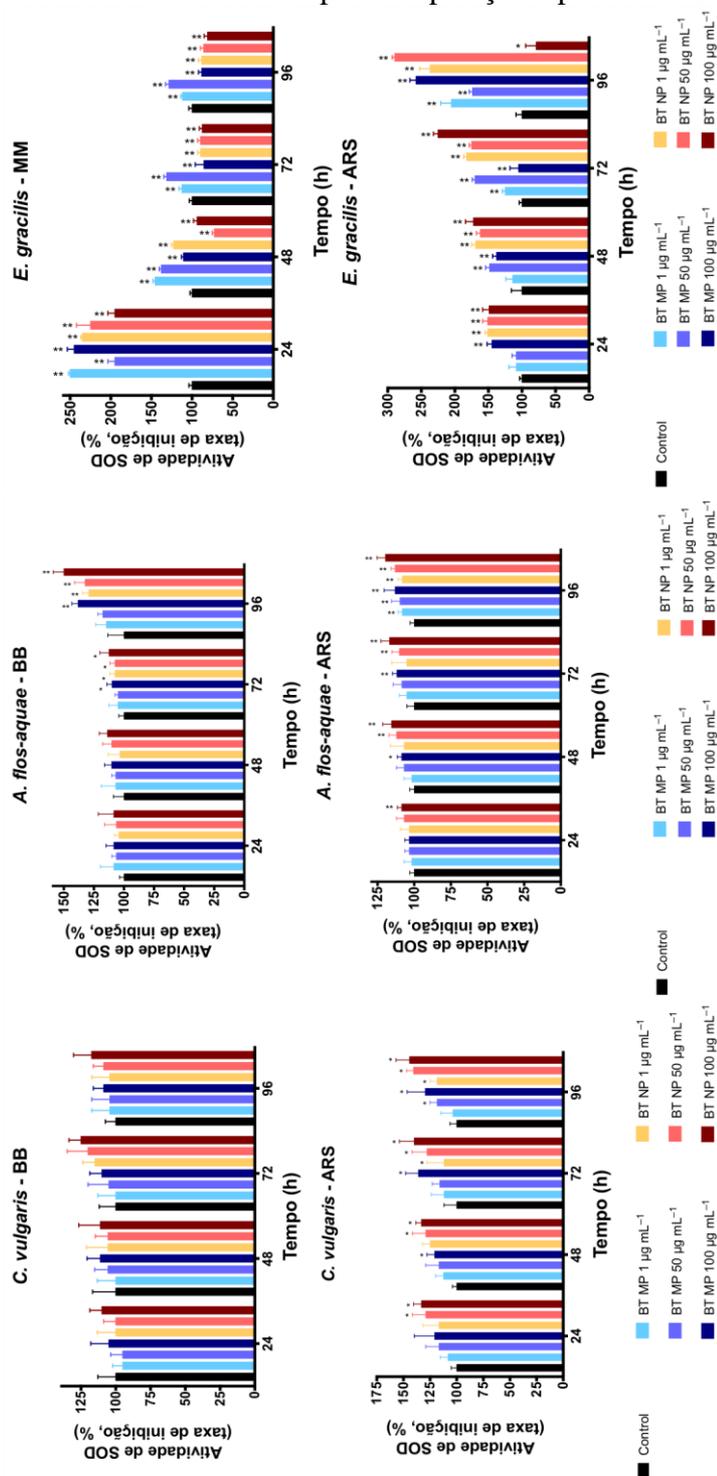
BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; BB: meio de cultura *Bold's Basal*; MM: meio de cultura mineral; ARS: água do rio Sena.

Em relação ao tamanho hidrodinâmico das suspensões de células destes organismos em ausência ou presença de partículas, nenhuma diferença significativa foi observada, exceto pelo notável crescimento do tamanho das culturas de *A. flos-aquae* – o que é esperado uma vez que este é um micro-organismo filamentar.

O efeito que as partículas causaram no estresse oxidativo foi também avaliado (Figura 24). Quando se olha para a taxa de inibição da atividade da SOD em *C. vulgaris*, pode-se ver que não diferiram dos controles em meio BB. Após 48 h, houve um ligeiro aumento na atividade, mas nenhuma das concentrações testadas foram estatisticamente superiores ao respectivo controle. Os tratamentos em ARS, por sua vez, apresentaram uma inibição superior a partir do primeiro dia de exposição, para as concentrações mais elevadas de BT NP, e após as 72 h para a maior concentração de BT MP e todas as concentrações de BT NP. A atividade da SOD é crucial para as células, uma vez que as protege da ação de EROs. Ainda, uma atividade aumentada de SOD pode ser um reflexo de uma maior exposição/produção de EROs que, por sua vez, está associada com a ativação da apoptose das células através da mitocôndria (CHENG *et al.*, 2011). Neste sentido, a mortalidade mais

elevada observada em ARS pode estar ligada ao aumento da atividade da SOD – ou seja, a toxicidade pode ter ocorrido por meio de exposição a EROs gerado pelo BT.

Figura 24 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) de *C. vulgaris*, *A. flos-aquae* e *E. gracilis* em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário.



BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; BB: meio de cultura *Bold's Basal*; MM: meio de cultura mineral; ARS: água do rio Sena.

À medida em que as partículas conduziram à formação de grandes agregados de partículas em torno das algas, pode-se esperar que este causou uma diminuição na disponibilidade de nutrientes necessários para o crescimento de algas, porque o seu transporte pela membrana celular foi perturbado – e mesmo a disponibilidade de luz poderia ser ameaçada por estes grandes agregados metálicos – o que, em certa medida, poderia ter submetido as células ao estresse, levando ao aumento na produção de EROs (ROGERS *et al.*, 2010; XIN *et al.*, 2010).

A atividade da SOD foi encontrada aumentada também em *A. flos-aquae* crescida em BB quando exposta a BT MP a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e BT NP em todas as concentrações testadas, após 72 h. Quando cultivadas em ARS, BT NP em $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ aumentou significativamente a atividade da SOD a partir do primeiro dia de ensaio, seguido de concentrações mais baixas nos dias seguintes, e BT MP em $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ alterou esta atividade após 48 h de exposição.

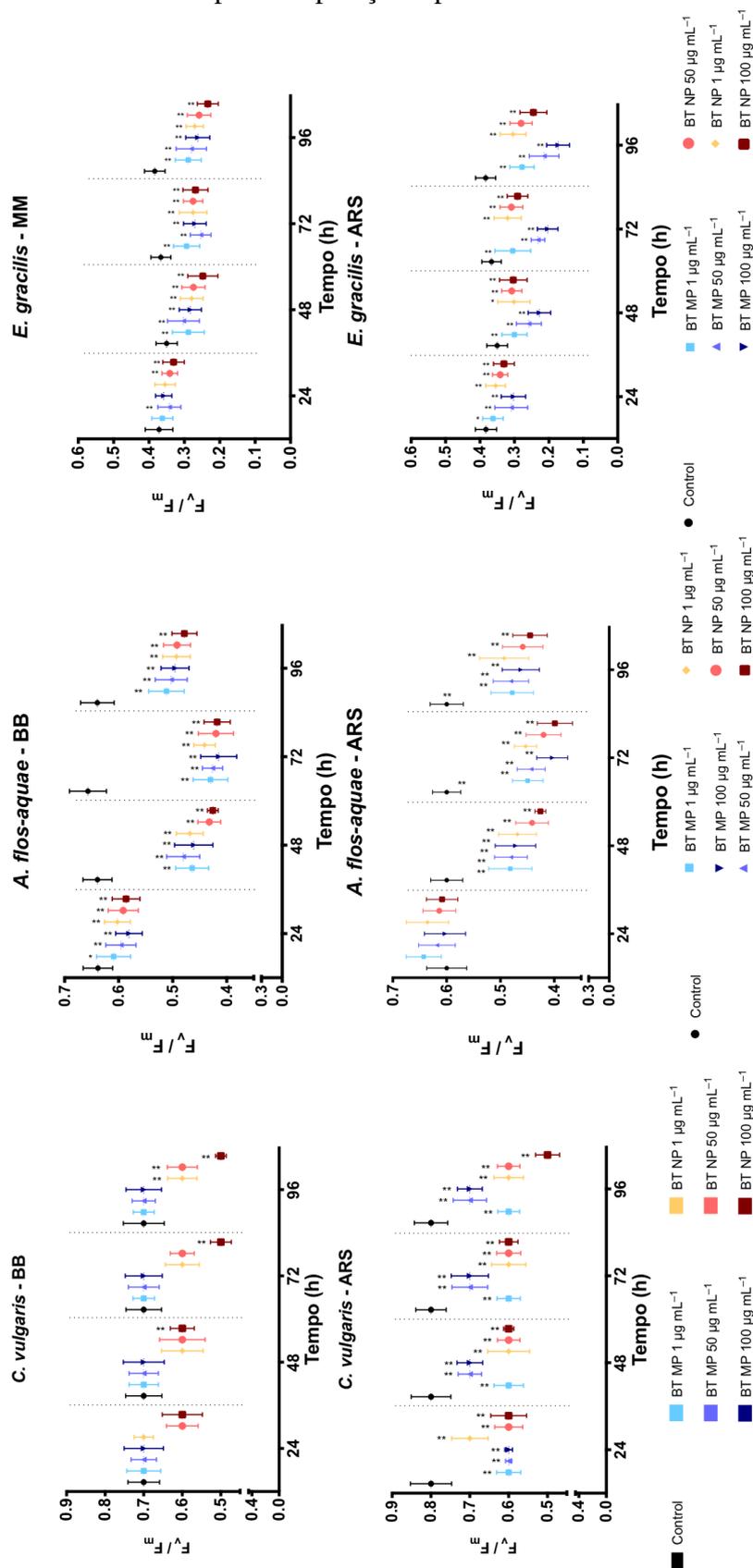
Para *E. gracilis*, ambas partículas em todas as concentrações, exceto BT MP em $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, exerceram algum efeito sobre a atividade da SOD.

O aumento da produção de EROs também é conhecida por afetar a fotossíntese (Figura 25) (RODEA-PALOMARES *et al.*, 2012). De fato, a atividade fotossintética de *C. vulgaris* foi mais reduzida em ARS que em meio BB, no qual houve diminuição estatística da atividade somente após 96 h, para BT NP. No entanto, em ARS esta atividade foi reduzida desde a primeira até a última análise, para todos os materiais e concentrações, o que está em conformidade com a mortalidade mais elevada encontradas neste meio e a atividade mais elevada da SOD. Alguns estudos anteriores já demonstraram a diminuição da atividade após exposição a nanopartículas tais como ZnO (BRAYNER *et al.*, 2010) e nanotubos de carbono (PEREIRA *et al.*, 2014).

Em *A. flos-aquae*, tratamentos diferiram de seus controles em relação à capacidade fotossintética em meio BB desde a primeira hora de avaliação, para ambas as partículas; e em ARS, a atividade diminuiu também para ambas as partículas, mas após 48 h de exposição. Para *E. gracilis*, o efeito foi observado a partir da primeira hora para ambas as partículas e em ambos os meios.

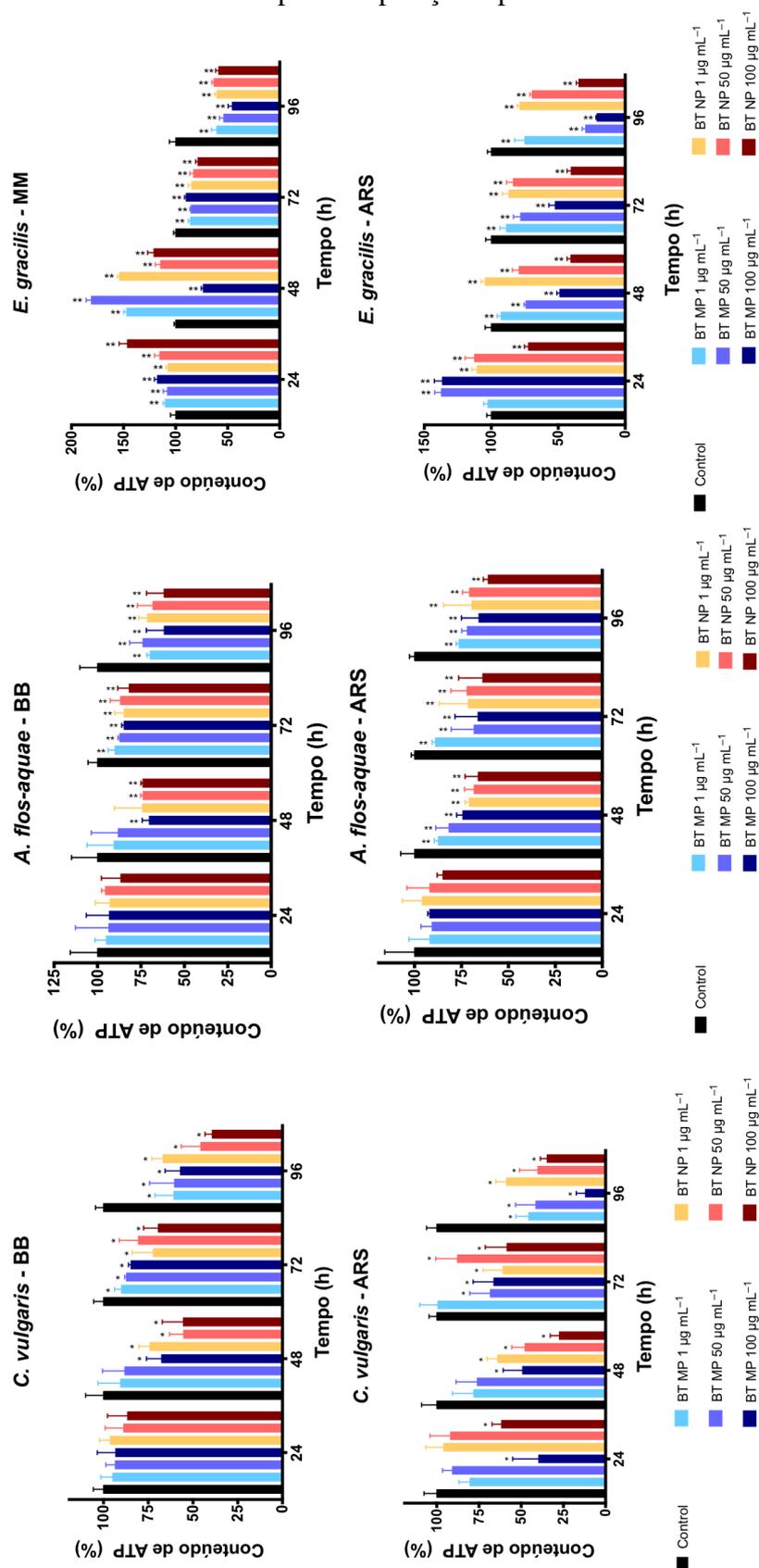
Juntamente com a atividade da SOD, uma outra medição da atividade mitocondrial das células é o teor de ATP intracelular (Figura 26). As mitocôndrias estão diretamente relacionadas com a viabilidade celular, uma vez que são responsáveis não só pela produção de ATP, mas também pela geração de EROs e pela liberação de proteínas que controlam a apoptose (PEREIRA *et al.*, 2014).

Figura 25 – Eficiência fotossintética de *C. vulgaris*, *A. flos-aquae* e *E. gracilis* em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário.



BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; BB: meio de cultura *Bold's Basal*; MM: meio de cultura mineral; ARS: água do rio Sena.

Figura 26 – Conteúdo intra-celular de ATP de *C. vulgaris*, *A. flos-aquae* e *E. gracilis* em função da concentração e do tempo de exposição a partículas de titanato de bário.



BT MP: titanato de bário micronizado; BT NP: titanato de bário nanoestruturado; BB: meio de cultura *Bold's Basal*; MM: meio de cultura mineral; ARS: água do rio Sena.

Em *C. vulgaris*, o teor de ATP foi encontrado diminuído após 48 h de exposição à concentração mais elevada de BT MP ($> 100 \mu\text{g mL}^{-1}$, e após 72 h em todas as concentrações) e todas as concentrações de BT NP, tanto em BB quanto em ARS.

Em *A. flos-aquae*, o teor de ATP começou a diminuir após 48 h de exposição – em BB, isto ocorreu inicialmente nas concentrações mais elevadas, mas após 72 h todas as concentrações exerceram algum efeito, da mesma forma que foi observado em ARS.

Para *E. gracilis*, os efeitos foram vistos desde o primeiro dia. A queda no teor de ATP pode refletir uma diminuição na atividade mitocondrial, e assim as partículas de BT levaram a distúrbios no metabolismo energético dos organismos. Para as células eucarióticas de *Euglena*, a elevada atividade de endocitótica também desempenhou um papel na diminuição de ATP, uma vez que o processo de endocitose utiliza energia a partir do ATP, (DUKHIN *et al.*, 2001).

Em suma, os efeitos foram diversos nos três organismos-teste, e por isso é recomendado que testes nanoecotoxicológicos sejam realizados sempre em mais de um organismo, devido às diferenças de sensibilidade apresentadas por organismos de diferentes espécies frente às substâncias químicas. Além disso, como foi evidenciado que BT apresentou perfil de toxicidade diferente para os três micro-organismos, fica claro que não é possível extrapolar o efeito tóxico de uma substância sobre organismos de determinada espécie para organismos de outras espécies.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, as principais conclusões que se pode depreender deste estudo foram:

- Tanto BT MP (~170nm, tetragonal) quanto BT NP (~60 nm, cúbico de face centrada) se mostraram negativos, facilmente agregáveis e precipitáveis (instáveis) em todos os meios de cultura aquoso estudados, com uma taxa de liberação de íons Ba^{2+} para os mesmos que não ultrapassa 1,5%;
- BT tem um efeito tóxico estatisticamente significativo no crescimento e na viabilidade celular de *C. vulgaris* desde a menor concentração testada (1 ppm), o que parece ser mediado por um estresse oxidativo induzido pelas próprias partículas ou pelos íons Ba^{2+} liberados no meio de cultura;
- BT tem um efeito tóxico muito baixo no crescimento de *A. flos-aquae*, porém ambas partículas afetam a viabilidade celular desde a menor concentração testada, o que ocorre por efeito indireto das mesmas no estresse oxidativo das células;
- BT tem um efeito tóxico estatisticamente significativo no crescimento e na viabilidade celular de *E. gracilis* desde a menor concentração testada (1 ppm), efeito relacionado à endocitose das partículas numa quantidade tal que levou a uma ruptura de suas membranas;
- BT foi capaz de estressar todos os organismos-teste, o que foi evidenciado pelo aumento na atividade da SOD, pela diminuição da eficiência fotossintética e pela diminuição dos níveis intracelulares de ATP;
- O comportamento de BT em meios de cultura sintéticos e naturais são diferentes, sendo os efeitos tóxicos mais pronunciados quando o crescimento é dado em ARS – neste caso, um pior estado fisiológico dos micro-organismos em ARS pode ocorrer e ocasionar uma resistência mais baixa das células, provavelmente ligada a uma escassez de nutrientes ou até mesmo um efeito sinérgico com um contaminante do rio;
- O tamanho de BT parece não influenciar os efeitos produzidos sobre o crescimento dos micro-organismos – embora a inibição do crescimento tenha sido pronunciada com o nanomaterial.

REFERÊNCIAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Norma Técnica NBR12648, Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae), 2ª. ed., Rio de Janeiro, 2005.
- ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Em Handbook of Ecotoxicology; HOFFMAN, D. J. et al. eds.; 2nd ed., Lewis Publishers: Boca Raton, 2003, cap. 2.
- ALLARD, B.; TEMPLIER, J. Comparison of neutral lipid profile of various trilaminar outer cell wall (TLS)-containing microalgae with emphasis on algaenan occurrence. **Phytochemistry**, v. 54, n. 4, p. 369-380, 2000.
- APHA – American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., American Public Health Association: Washington, 1998.
- BALL, J. P. et al. Biocompatible evaluation of barium titanate foamed ceramic structures for orthopedic applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2013. No prelo.
- BERGSTRM, L, et al. Colloidal processing of a very fine BaTiO₃ powder—effect of particle interactions on the suspension properties, consolidation, and sintering behavior. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 80, n. 2, p. 291-300, 1997.
- BIDDLESTONE-THORPE, L. et al. Nanomaterial-mediated CNS delivery of diagnostic and therapeutic agents. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 7, p. 605-613, 2012.
- BLAISE, C. Microbiotesting: An expanding field in aquatic toxicology. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 40, n. 1, p. 115-119, 1998.
- BRAYNER, R. et al. Micro-algal biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 581-597, 2011.
- BRAYNER, R. et al. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. **Nano Letters**, v. 6, n. 4, p. 866-870, 2006.
- BRAYNER, R. et al. ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. **Langmuir**, v. 26, n. 9, p. 6522-6528, 2010.
- BRUNAUER, S.; EMMET, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309-319, 1938.
- BUSCAGLIA, M. et al. Atomistic simulation of dopant incorporation in barium titanate. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 84, n. 2, p. 376-84, 2001.
- BUZEA, C.; PACHECO, I. L.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. MR17-MR71, 2007.

CHAE, S.; WATANABE, Y.; WIESNER, M. R. Comparative photochemical reactivity of spherical and tubular fullerene nanoparticles in water under ultraviolet (UV) irradiation. **Water research**, v. 45, n. 1, p. 308-314, 2011.

CHEN, Z.; RING, T.; LEMAITRE, J. Stabilization and processing of aqueous BaTiO₃ suspension with polyacrylic acid. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 75, n. 12, p. 3201-3208, 1992.

CHENG, W. et al. Single-walled carbon nanotube induction of rat aortic endothelial cell apoptosis: reactive oxygen species are involved in the mitochondrial pathway. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 43, n. 4, p. 564-572, 2011.

CHOI, H. et al. Renal clearance of quantum dots. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1165-1170, 2007.

CIOFANI, G. et al. Barium titanate nanoparticles: highly cytocompatible dispersions in glycol-chitosan and doxorubicin complexes for cancer therapy. **Nanoscale research letters**, v. 5, n. 7, p. 1093-1101, 2010b.

CIOFANI, G. et al. Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 312-320, 2013.

CIOFANI, G. et al. Preparation of stable dispersion of barium titanate nanoparticles: Potential applications in biomedicine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 2, p. 535-543, 2010a.

CLEUVERS, M.; WEYERS, A. Algal growth inhibition test: does shading of coloured substances really matter? **Water research**, v. 37, n. 11, p. 2718-2722, 2003.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CULLEN, L. G. et al. Assessing the impact of nano- and micro-scale zerovalent iron particles on soil microbial activities: Particle reactivity interferes with assay conditions and interpretation of genuine microbial effects. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1675-1682, 2011.

DA ROCHA, A. Impact écotoxicologique de nanoparticules de ZnO et CdS préparées par la méthode polyol, sur la microalgue verte *Chlorella vulgaris* dans l'eau de Seine. 2014. Tese (Doutorado em Química)-Université Paris Diderot, Paris, 2014.

DE JONG, LE den Doore; ROMAN, W. B. Tolerance of *Chlorella vulgaris* for metallic and non-metallic ions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 31, n. 1, p. 301-313, 1965.

DERJAGUIN, B.; LANDAU, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. **Progress in Surface Science**, v. 43, n. 1, p. 30-59, 1993.

DUKHIN, A. S. et al. Peculiarities of live cells' interaction with micro- and nanoparticles. **Advances in colloid and interface science**, v. 159, n. 1, p. 60-71, 2010.

- EINICKER-LAMAS, M. et al. *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. **Environmental Pollution**, v. 120, n. 3, p. 779-786, 2002.
- ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V.. Toxicology of nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 2, p. 129-137, 2012.
- ENYASHIN, A. et al. Structure and stability of molybdenum sulfide fullerenes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 4, p. 623-627, 2007.
- FEYNAM, R. **There's plenty of room at the bottom**. Caltech's Engineering and Science, 1960.
- FROMM, K. M. Barium bright and heavy. **Nature chemistry**, v. 5, n. 2, p. 146-146, 2013.
- GAO, H.; PANG, Z.; JIANG, X.. Targeted delivery of nano-therapeutics for major disorders of the central nervous system. **Pharmaceutical research**, v. 30, n. 10, p. 2485-2498, 2013.
- GOGNIAT, G. et al. The bactericidal effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. **FEMS microbiology letters**, v. 258, n. 1, p. 18-24, 2006.
- GOTTSCHALK, F. et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 24, p. 9216-9222, 2009.
- HAGENS, W. I. et al. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 49, n. 3, p. 217-229, 2007.
- HANDY, R. D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicology**, [S.l.], v. 17, n. 5, p. 315-325, 2008.
- HANIU, H. et al. Culture medium type affects endocytosis of multi-walled carbon nanotubes in BEAS-2B cells and subsequent biological response. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1679-1685, 2013.
- HANSEN, S. F. et al. Categorization framework to aid exposure assessment of nanomaterials in consumer products. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 438-447, 2008.
- HENNINGS, D. F. K; METZMACHER, C.; SCHREINEMACHER, B. Seriyati. Defect chemistry and microstructure of hydrothermal barium titanate. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 84, n. 1, p. 179-182, 2001.
- HERR, U. Et al. Near-field effects and energy transfer in hybrid metal-oxide nanostructures. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 3, p. 306-317, 2013.

HOSHINO, A. et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. **Nano Letters**, v. 4, n. 11, p. 2163-2169, 2004.

HSIEH, C. et al. Bioconjugation of barium titanate nanocrystals with immunoglobulin G antibody for second harmonic radiation imaging probes. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2272-2277, 2010.

ISO – INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. ISO/TS 27687: Nanotechnologies – Terminology and definitions for nano-objects – Nanoparticle, nanofiber and nanoplate. Geneva, 2008.

JEFFERS. Introducing nano. Disponível em: <<http://ywang13.myweb.usf.edu/nanotech/jeffers/nano.html>>. Acesso em: 20 mar 2014.

JIANG, J. et al. Synthesis of nanoparticles in a flame aerosol reactor with independent and strict control of their size, crystal phase and morphology. **Nanotechnology**, v. 18, n. 28, p. 285603, 2007.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 1, p. 77-89, 2009.

JIANG, W. et al. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. **Nature nanotechnology**, v. 3, n. 3, p. 145-150, 2008.

JOSÉ-YACAMÁN, M. et al. Maya blue paint : An ancient nanostructured material. **Science**, Washington, v. 273, n. 5272, p. 223-225, 1996.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v. 269, n. 2, p. 105-119, 2010.

KENDALL, R. J. et al. Ecotoxicology. **USDA National Wildlife Research Center-Staff Publications**, p. 516, 2001.

KHASTGIR, D.; ADACHI, K. Rheological and dielectric studies of aggregation of barium titanate particles suspended in polydimethylsiloxane. **Polymer**, v. 41, n. 16, p. 6403-6413, 2000.

KOLAKOVIC, R. et al. Spray-dried cellulose nanofibers as novel tablet excipient. **AAPS PharmSciTech**, v.12, p. 1366-1373, 2011.

KOPITTKE, P. M. et al. Toxicity of metals to roots of cowpea in relation to their binding strength. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 1827-1833, 2011.

KWEI, G. H. et al. Structures of the ferroelectric phases of barium titanate. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 10, p. 2368-2377, 1993.

LAMB, D. T. et al. Bioavailability of Barium to Plants and Invertebrates in Soils Contaminated by Barite. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 9, p. 4670-4676, 2013.

LEE, B. I. Chemical variations in barium titanate powders and dispersants. **Journal of electroceramics**, v. 3, n. 1, p. 53-63, 1999.

LEE, B. I. Electrokinetic behavior of barium titanate powders in water. **Journal-Korean Physical Society**, v. 32, p. S1152-S1155, 1998.

LIU, J.M. et al. A new phosphorimetry for the determination of trace alkaline phosphatase using multi-wall carbon nanotubes and its diagnosis of human diseases. **Journal of Fluorescence**, v. 20, n. 4, p. 933-941, 2010.

LOPEZ, M. C. B. et al. Characterization of barium titanate powders: barium carbonate identification. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 82, n. 7, p. 1777-1786, 1999.

LÓPEZ-ROLDÁN, R. et al. Ecological screening indicators of stress and risk for the Llobregat river water. **Journal of hazardous materials**, v. 263, p. 239-247, 2013.

MAHMOOD, M. et al. Engineered nanostructural materials for application in cancer biology and medicine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, p. 10–19, 2012.

MEGAW, H. D. Origin of ferroelectricity in barium titanate and other perovskite-type crystals. **Acta Crystallographica**, v. 5, n. 6, p. 739-749, 1952.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STRØMME, M.. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in materials science**, v. 57, n. 5, p. 875-910, 2012.

MONTEIRO, F. A. et al. Effect of barium on growth and macronutrient nutrition in Tanzania guineagrass grown in nutrient solution. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 42, n. 13, p. 1510-1521, 2011.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 7th ed. John Wiley & Sons, 2008.

MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**, v.32, n. 8, p. 967-976, 2006.

MORRISON, I. D.; ROSS, S. **Colloidal dispersions: suspensions, emulsions, and foams**. Wiley Interscience, New York, 2002.

NAYDENOV, B.; BOLAND, J. J. Engineering the electronic structure of surface dangling bond nanowires of different size and dimensionality. **Nanotechnology**, v. 24, n. 27, p. 270252.1-270252.7, 2013.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.

NEWMAN, M. C., ZHAO, Y. Ecotoxicology nomenclature: LC, LD, LOC, LOEC, MAC. In: Jorgensen, S.E., Fath, B. (Eds.), *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier, pp. 1187–1193. 2008.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 1, p. 5-22, 2007.

OBERDÖRSTER, G. et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 8, 2005a.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823, 2005b.

PAIK, U. et al. The effect of electrostatic repulsive forces on the stability of BaTiO₃ particles suspended in non-aqueous media. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 135, n. 1, p. 77-88, 1998.

PANG, C. et al. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. **Aquatic toxicology**, v. 106, p. 114-122, 2012.

PARK, S. et al. Crystallographically engineered BaTiO₃ single crystals for high-performance piezoelectrics. **Journal of applied physics**, v. 86, n. 5, p. 2746-2750, 1999.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química nova**, v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010.

PEREIRA, M. M. Avaliação d toxicidade de nanomateriais em diferentes modelos biológicos e aplicações na transfecção gênica. 2013. Tese (Doutorado em Saúde) – Programa de Pós-graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

PEREIRA, M. M. Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cotton cellulose nanofibers in the green microalga *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**. No prelo.

PLANCHON, M. et al. Interaction between *Escherichia coli* and TiO₂ nanoparticles in natural and artificial waters. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 158-164, 2013.

POWERS, K. W. et al. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. **Nanotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2007.

POWERS, K. W. et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. **Toxicological Sciences**, v. 90, n. 2, p. 296-303, 2006.

RAY, P. C.; YU, H.; FU, P. P. Toxicity and environmental risks of nanoparticles: challenges and future needs. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 1-35, 2009.

REIBOLD, J. et al. Materials: carbono nanotubes in ancient Damascus sabre. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 286, 2006.

RODEA-PALOMARES, I. et al. An insight into the mechanisms of nanoceria toxicity in aquatic photosynthetic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 122, p. 133-143, 2012.

ROGERS, N. J. et al. Physico-chemical behaviour and algal toxicity of nanoparticulate CeO₂ in freshwater. **Environmental chemistry**, v. 7, n. 1, p. 50-60, 2010.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P.. 1 Conceptos Generales. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidadde aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones, p. 17, 2004.

ROYAL SOCIETY and Royal Academy of Engineering. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. London, UK: The Royal Society. 2004.

RYMAN-RASMUSSEN, J. P.; RIVIERE, J. E.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. **Toxicological Sciences**, v. 91, n. 1, p. 159-165, 2006.

SANVICENS, N.; MARCO, M. P.. Multifunctional nanoparticles–properties and prospects for their use in human medicine. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 425-433, 2008.

SAYES, C. M.; WARHEIT, D. B. Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, n. 6, p. 660-670, 2009.

SCOTT, J. F. Applications of modern ferroelectrics. **Science**, v. 315, n. 5814, p. 954-959, 2007.

SIVRY, Y. et al. Behavior and fate of industrial zinc oxide nanoparticles in a carbonate-rich river water. **Chemosphere**, v. 95, p. 519-526, 2014.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, p. A. 3B. 1-A. 3B. 2, 2001.

SU, C. Y. et al. Grain growth and crystallinity of ultrafine barium titanate particles prepared by various routes. **Ceramics International**, v. 39, n. 6, p. 6673-6680, 2013.

TONELLI, F. M. et al. Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 4511-4529, 2011.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 1, n. 2, p. 151-173, 1977.

TSANTILIS, S.; PRATSINIS, S. E. Soft-and hard-agglomerate aerosols made at high temperatures. **Langmuir**, v. 20, n. 14, p. 5933-5939, 2004.

VAN DEN HOEK, C. et al. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge university press, 1995.

VERWEY, E. J. W.; OVERBEEK, J. Th G.; OVERBEEK, J. T. G.. **Theory of the stability of lyophobic colloids**. Courier Dover Publications, 1999.

WANG, L. et al. DC humidity sensing properties of BaTiO₃ nanofiber sensors with different electrode materials. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 153, n. 2, p. 460-464, 2011.

WANG, X. Y. et al. Dispersion and aging behavior of BaTiO₃ and PZT in water. **Materials research bulletin**, v. 35, n. 14, p. 2555-2563, 2000.

WICHMANN, H. E. et al. **Sources and elemental composition of ambient particles in Erfurt, Germany**. Ecomed, 2002.

XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494-5500, 2010.

ZHANG, G.; ZENG, X.; LI, P. Nanomaterials in cancer-therapy drug delivery system. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 9, n. 5, p. 741-750, 2013.

ZHU, W. Z. et al. Characterization of multiwalled carbon nanotubes prepared by carbon arc cathode deposit. **Materials chemistry and physics**, v. 82, n. 3, p. 638-647, 2003.

APÊNDICE A – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo aceito

Periódico: Química Nova

Qualis Medicina I: B2

Título: Transdermal formulations containing human sexual steroids: development and validation of methods and *in vitro* drug release

Autores: Hudson C. Polonini¹, Pedro Paulo Soldati¹, Marccone Augusto Leal de Oliveira², Marcos Antônio F. Brandão¹, Maria das Graças M. Chaves¹, Nádia R. B. Raposo^{1,*}

1. Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330 Juiz de Fora – MG, Brasil
2. Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ), Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330 Juiz de Fora – MG, Brasil

Resumo: *In vitro* release of bioidentical hormones in four different liposomal transdermal emulsions (containing testosterone or progesterone or estradiol or estradiol + estriol) was assessed. For that, new high performance liquid chromatography (HPLC) methods were developed and validated for each emulsion, in an eco-friendly manner, and used to determine the *in vitro* release of such products. The methods were suitable for the intended goals, and the emulsions are good candidates for human sexual steroids transdermal delivery, once the vehicle used releases in high rates the hormones incorporated into it.

Keywords: *in vitro* drug release; transdermal steroids; semisolid formulations.

Artigo submetido**Periódico:** International Journal of Pharmaceutical Compounding**Qualis Medicina I:** não avaliado pela câmara.**Título:** Evaluation of percutaneous absorption performance for human female sexual steroids into Pentravan cream**Autores:** Hudson C. Polonini^a, Marcos Antônio F. Brandão^a, Anderson O. Ferreira^b, Cristiano Ramos^a, Nádia R. B. Raposo^a^a Universidade Federal de Juiz de Fora, Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS)^b Ortofarma Laboratório de Controle de Qualidade

Resumo: In this work, a widespread transdermal vehicle used by compounding pharmacies was evaluated, as there is a lack of studies regarding it. The permeation performance for progesterone (P), oestradiol (E2) and oestriol (E3) in formulations containing each drug separately, as well as an association of E2 + E3 (Biest), was evaluated – regarding their manufacture process and their potential biological application. An excised female human skin model was used to predict the permeation and the retention of the active compounds in every skin layer in lieu of conventional *tape stripping*. P was the drug with the highest permeation ($37.02 \mu\text{g cm}^{-2}$ at the end of the experiment). E2 and E3 in Biest had permeations approximately 4-fold lower ($9.44 \mu\text{g cm}^{-2}$ for E2- Biest and $14.02 \mu\text{g cm}^{-2}$ for E3- Biest), and the profiles of E2 in E_{emuls} and in Biest were almost the same ($9.46 \mu\text{g cm}^{-2}$ for E_{emuls}). All permeations followed pseudo-first order kinetics. For progesterone, using the percentage of permeation by dose (%), one can infer that a patient using the 1-g emulsion dose released by the pump containing 50 mg of P will have 38.4 mg of progesterone liberated into his bloodstream, gradually and continuously for 48 h. The results indicate that the vehicle was able to provide percutaneous absorption rates compatible with and higher than clinical treatment needs. Using the same rationale, the E_{emuls} would deliver practically the entire amount of E2 load per dose (1.0 mg), approximately 0.5 mg of E2 per day. As for the Biest, the dosing used would deliver almost 0.5 mg E2/day and 2.0 mg E3/day. Thus, according to the results, human female sexual hormones incorporated in the oil-in-water vanishing cream base and applied topically are expected to exert their biological activities systemically with good efficacy due to their satisfactory permeation through human skin. However, one must take into account that a high quantity of drug was delivered. Thus, care has to be taken regarding the quantity of emulsion used to avoid patient overdose.

Keywords: Percutaneous absorption / skin permeation. Human female steroids. Oestrogens. Progestin. Cutaneous retention. Permeation kinetics.

Artigo submetido**Periódico:** Water Research**Qualis Medicina I:** A1**Título:** Size-dependent ecotoxicity of barium titanate particles: the case of *Chlorella vulgaris* green algae**Autores:** Hudson C. Polonini ^a, Humberto M. Brandão ^b, Nádia R. B. Raposo ^a, Marcos Antônio F. Brandão ^a, Ludovic Mouton ^c, Alain Couté ^d, Claude Yéprémian ^d, Yann Sivry ^e, Roberta Brayner ^c^a Universidade Federal de Juiz de Fora, Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-900, Juiz de Fora, Brasil^b Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Leite), Juiz de Fora, Brasil^c Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS), UMR 7086, CNRS, 15 rue Jean-Antoine de Baïf, F-75205 Paris, France^d Muséum National d'Histoire Naturelle, Département RDDM, USM 505, 57 rue Cuvier, F-75005 Paris, France^e Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Institute de Physique du Globe de Paris (IPGP), UMR 7154, CNRS, 1 rue Jussieu, F-75238 Paris, France

Resumo: Studies have been demonstrating that smaller particles can lead to unexpected and diverse ecotoxicological effects when compared to those caused by the bulk material. In this study, the chemical composition, size and shape, state of dispersion, and surface charge, area and chemistry of barium titanate (BT) in two different sizes were characterized. We also used the green algae *Chlorella vulgaris* grown both in artificial and natural culture medium (Bold's Basal, BB, or Seine River water, SRW, respectively) as a model organism to assess, for the first time, its aquatic toxicology. For the aquatic toxicology: (i) BT has a statistically significant effect on *C. vulgaris* growth even at the lower concentration tested (1ppm), what seems to be mediated by induced oxidative stress caused by the particles; (ii) the BT behavior was different when in synthetic or in natural culture media, the toxic effects in *C. vulgaris* being more pronounced when grown in SRW (in this case, a worse physiological state of the algae growing in SRW can occur and account for the lower resistance, probably linked to a paucity of nutrients or even to a synergistic effect with a contaminant from the river); and (iii) size does not seem to be an issue influencing the toxicity in BT particles toxicity since micro- and nano-particles produced significant effects on algae growth – although the growth inhibition was more pronounced with the nanomaterial.

Keywords: barium titanate, Seine river water, ecotoxicology, characterization, nanotechnology.

Artigo submetido**Periódico:** Aquatic Toxicology**Qualis Medicina I:** A2**Título:** Ecotoxicological studies of micro- and nanosized barium titanate on aquatic photosynthetic microorganisms**Autores:** Hudson C. Polonini[†], Humberto M. Brandão[‡], Nádia R. B. Raposo[†], Ludovic Mouton[§], Claude Yéprémian[¥], Alain Couté[¥], Roberta Brayner[§][†] Universidade Federal de Juiz de Fora, Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-900, Juiz de Fora, Brasil[‡] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Leite), 36038-330, Juiz de Fora, Brasil[§] Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS), UMR 7086, CNRS, 15 rue Jean de Baïf, F-75205 Paris Cedex 13, France[¥] Muséum National d'Histoire Naturelle, Département RDDM, USM 505, 57 rue Cuvier, F-75005 Paris, France

Resumo: The interaction between live organisms and micro- or nanosized materials has become a current focus in toxicology. As nanosized barium titanate has gained momentum lately in the medical field, the aims of the present work are: (i) to assess BT toxicity and its mechanisms on the aquatic environment, using two photosynthetic organisms (*Anabaena flos-aquae* and *Euglena gracilis*); (ii) to study and correlate the physicochemical properties of BT with its toxic profile; (iii) to compare the BT behavior and the toxic profile in synthetic (Bold's Basal, BB, or Mineral Medium, MM) and natural culture media (Seine River Water, SRW); and (iv) to address whether size is an issue in BT particles toxicity. Responses such as growth inhibition, cell viability, superoxide dismutase activity, adenosine-5-triphosphate content and photosynthetic activity were evaluated. The main conclusions are: (i) BT have a statistically significant toxic effect on *E. gracilis* growth since the lower concentration tested (1 ppm), and also a significant effect on cell viability to this microorganism and to *A. flos-aquae*; (ii) the BT behaviors in synthetic and natural culture media were slightly different, being the toxic effects more pronounced when grown in SRW – in this case, a worse physiological state of the algae in SRW can occur and account for the lower resistance, probably linked to a paucity of nutrients or even a synergistic effect with a contaminant from the river; and (iii) size does not seem to be an issue in BT particles toxicity since micro- and nano-particles produced significant effects on algae growth – although the growth inhibition was more pronounced with the nanomaterial.

Keywords: Barium titanate; Ecotoxicology; Nanoparticles.

Artigo aceito**Periódico:** Química Nova**Qualis Medicina I:** B2**Título:** Green tea in transdermal formulation: HPLC method for quality control and *in vitro* drug release assays

Michele Campos Alves¹, Priscila Aparecida de Almeida¹, Hudson Caetano Polonini¹, Nádia Rezende Barbosa Raposo¹, Anderson de Oliveira Ferreira², Marcos Antônio Fernandes Brandão^{1,2}

1. Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330 Juiz de Fora-MG, Brazil

2. Ortofarma - Laboratório de Controle de Qualidade, 36120-000, Matias Barbosa, MG, Brazil

Resumo: Epigallocatechin 3-gallate (EGCG) is the most abundant and active component of green tea, been poorly absorbed in the gastrointestinal tract. A transdermal system could be an alternative drug delivery mechanism. In this light, the present work developed and validated a HPLC method for quality control of green tea emulsion and determined the *in vitro* EGCG release. The release rate was found to be $8896.01 \mu\text{g cm}^{-2}$, following a pseudo-first-order model. The data showed that EGCG is expected to be able to exert its biological activities systemically when used from tested formulation, due to its good flux rates.

Keywords: Camellia sinensis; Quality Control; In Vitro Drug Release.

Artigo aceito**Periódico:** Química Nova**Qualis Medicina I:** B2**Título:** Synthesis and evaluation of octocrylene-inspired compounds for UV-filter activity**Autores:** Hudson C. Polonini^a, Rosângela S. Lopes^b, A. Beatriz, R.S. Gomes^b, A. O. Silva^b, R. V. de Lima^b, G. A. Nunes^b, Marcos Antônio F. Brandão^a, Nádia R.B. Raposo^a and Dênis P. de Lima^b^aNúcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora – MG, Brazil^bLaboratório de Síntese e Transformações de Moléculas Orgânicas (SINTMOL), Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79074-460, Campo Grande – MS, Brazil**Resumo:** Octocrylene (2-ethylhexyl 2-cyano-3,3-diphenyl-2-propenoate) is present in several sunscreens and it is known to work synergistically with UV filters. We prepared eight octocrylene related-compounds to test their photoprotective activity using diffuse transmittance technique. The compounds had a varied profile of photoprotection with the Sun Protection Factor (SPF) ranging from 1 to 5 and the UVA Protection Factor (UVAPF) from 1 to 8. Compounds 4, 5 and 7 showed the best protection against UVB sunrays, while compounds 5, 6 and 7 presented the best results for protection from UVA, being then the compound 7 the most balanced regarding both protections.**Keywords:** sunscreens; octocrylene; photoprotective activity

Artigo publicado

Periódico: Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications
v. 947, p. 23-31, 2013.

Qualis Medicina I: A2

Título: *In vitro* drug release and *ex vivo* percutaneous absorption of resveratrol cream using HPLC with zirconized silica stationary phase

Autores: Hudson Caetano Polonini^a, Carina de Almeida Bastos^b, Marccone Augusto Leal de Oliveira^b, Carla Grazieli Azevedo da Silva^c, Carol Hollingworth Collins^c, Marcos Antônio Fernandes Brandão^a, Nádia Rezende Barbosa Raposo^a

^a Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil

^b Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ), Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil

^c Institute of Chemistry, University of Campinas, P.O. Box 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Resumo: Since the designs of optimal formulations for resveratrol permeation *via* the skin are lacking, the aim of this study was to establish the profile of resveratrol permeability into and across human skin. For that, a laboratory-made chromatographic column was used (Zr-PMODS), with its performance being compared to a traditional C18 column. *In vitro* drug release was conducted with polysulfone membranes, and the flux (J_S) was $30.49 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, with a lag time (L_T) of 0.04 h, following a pseudo-first-order kinetics. For *ex vivo* percutaneous absorption using excised female human skin, the kinetic profile was the same, but J_S was $0.87 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ and L_T was 0.97 h. From the initials 49.30 μg applied to the skin, 9.50 μg were quantified in the receptor medium, 20.48 μg was retained at the *stratum corneum* (do not account as permeated) and 21.41 μg was retained at the viable epidermis + dermis (account as permeated), totalizing 30.90 μg of resveratrol permeated after 24h of application (62.6%). From these results, one can conclude that a person using the 1-g emulsion dose released by the pump containing 20 mg of resveratrol will have, theoretically, 12.53 mg of it liberated into his bloodstream, gradually and continuously for 24 h.

Keywords: *In vitro* drug release. Percutaneous absorption. Transdermal dosage form. Resveratrol. Factorial design. Validation studies.

Artigo publicado

Periódico: Latin American Journal of Pharmacy
v. 32, p. 67-73, 2013.

Qualis Medicina I: B3

Título: Development and validation of analytical method for determination of medroxyprogesterone acetate in capsules: a chemometrical approach

Autores: Lívia N. Grossi¹, Hudson C. Polonini², Michele C. Alves², Anderson O. Ferreira¹, Magda N. Leite², Marccone A. L. Oliveira³, Nádia R. B. Raposo², Marcos A. F. Brandão^{1,2}

¹ Ortofarma Laboratório de Controle da Qualidade, BR 040, Empresarial Park Sul, 39, 36120-000 Matias Barbosa-MG, Brasil

² Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330 Juiz de Fora-MG, Brasil

³ Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330 Juiz de Fora-MG, Brasil

Resumo: Medroxyprogesterone acetate (MPA) is used in oral dysfunction uterine bleeding, secondary amenorrhea, endometriosis, mild to moderate, as opposed to progestin to estrogen in hormone replacement therapy. There isn't any pharmacopeic method to assay this drug in capsules. It was proposed and validated a method for determining the content of medroxyprogesterone acetate in capsules by HPLC methodology. The method was validated for specificity, linearity, precision, accuracy and robustness. The security of data was guaranteed by a varied statistical analysis with the aid of a statistics approach.

Keywords: Liquid Chromatography, Medroxyprogesterone Acetate, Validation Studies.

Artigo publicado

Periódico: Latin American Journal of Pharmacy
v.32, p. 378-383, 2013.

Qualis Medicina I: B3

Título: Alternative methodology for folic acid analysis in capsules by reverse phase liquid chromatography under isocratic mode

Autores: Lívia Do N. Grossi¹, Hudson C. Polonini², Edilene B. Baptista², Anderson de O. Ferreira¹, Nádia R. B. Raposo², Magda N. Leite², Marcone A. L. De Oliveira³ & Marcos A. F. Brandão¹

¹Ortofarma Laboratório de Controle da Qualidade, BR 040, Empresarial Park Sul, 39, 36120-000 Matias Barbosa-MG, Brasil

²Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330 Juiz de Fora-MG, Brasil

³Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-900 Juiz de Fora-MG, Brasil

Resumo: Folic acid is an important vitamin (Vitamin B9) for biochemical processes such as DNA synthesis and repair. There is no pharmacopeic method to assay this drug in capsules. It was proposed, developed and validated a method for determining the content of folic acid in capsules by reverse phase liquid chromatography (RP-HPLC). The method was validated for specificity, linearity, precision, accuracy and robustness. The robustness was evaluated through experimental design approach.

Keywords: experimental design; folic acid; reverse phase liquid chromatography; validation.

Artigo publicado

Periódico: Trends in Psychiatry and Psychotherapy
v. 35, p. 76-80, 2013

Qualis Medicina I: B4

Título: Fatty acid and phospholipase A2 plasma levels in children with autism

Autores: Márcia Helena Fávero de Souza Tostes,¹ Hudson Caetano Polonini,² Rosemeri Mendes,² Marcos Antônio Fernandes Brandão,¹ Wagner Farid Gattaz,³ Nádia Rezende Barbosa Raposo¹

1 PhD. Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG, Brazil. 2 PhD candidate, Graduate Program in Health Sciences, Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, UFJF. 3 PhD. Departamento e Instituto de Psiquiatria, Laboratório de Neurociências (LIM 27), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil.

Resumo: Objective: To evaluate fatty acid plasma levels, phospholipase A2 activity, and the developmental profiles of children with autism vs. control subjects.

Methods: Twenty four children with autism underwent laboratory analysis for fatty acid quantification using gas chromatography and PLA2 activity determination by fluorometric assay.

Results: No correlation was observed between the developmental quotient and fatty acid plasma levels. Phospholipase A2 activity was significantly higher among autistic children compared with controls.

Conclusion: The study did not show a correlation between fatty acid and phospholipase A2 plasma levels and the developmental profile of children with autism.

Keywords: Autistic disorder, fatty acids, phospholipase A2.

Artigo publicado

Periódico: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters
v. 23, p. 4506-4510, 2013.

Qualis Medicina I: B1

Título: Quinolines derivatives as novel sunscreens agents

Autores Hudson C. Polonini ^a, Rafael M. P. Dias ^b, Isabela O. Souza ^b, Karla Mara Gonçalves ^a, Tiago B. B. Gomes ^a, Nádia R. B. Raposo ^a and Adilson David da Silva ^{b,*}

^a Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da saúde (NUPICS), Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, 36036-900, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, 36036-900, Brazil

Resumo: Currently, the research and development of sunscreens play an important role on the synthesis of actives that are stable in various kinds of formulations - in addition to their efficiency and broad spectrum of protection against ultraviolet radiation. Our objective here was to synthesize new sunscreens chemical agents using quinoline as a base molecule. Twelve quinoline derivatives were synthesized, four of them novel molecules, and their photoprotective activity was determined *in vitro* using diffuse transmittance spectrophotometry. We determined their SPF, UVAPF, UVA/UVB ratio, critical wavelength and Boots Star Rating. The quinolines derivatives presented a varied profile of photoprotection, their SPF ranging from 2 to 11 and their UVAPF from 2 to 7. In terms of the critical wavelength, all molecules were considered of broad-spectrum by different classifications. Regarding the Boots Star Rating, one compound received no rating, seven of them received a three stars rating, three received a four stars rating and three were given a five stars rating. The molecules showed in the present work have a wide range of possibilities for creating new sunscreen products, once they have good SPF or UVAPF for single molecules, and they also possess other different qualities that can act synergistically.

Keywords: Photoprotective activity. Sunscreens agents/UV Filters. Chemical Synthesis. Ultraviolet Radiation. Quinolines, Structure-activity relationship.

Artigo publicado

Periódico: Latin American Journal of Pharmacy
v. 302, p. 1082-1087, 2013.

Qualis Medicina I: B3

Título: New HPLC method for quality control of B-escin in *Aesculus Hippocastanum* L. hydroalcoholic extract

Autores: Priscila Aparecida De Almeida¹, Michele Campos Alves¹, Hudson Caetano Polonini¹, Lidiane Silva Dutra¹, Magda Narciso Leite¹, Nádia Rezende Barbosa Raposo¹, Anderson De Oliveira Ferreira², Marcos A. F. Brandão^{1,2}

1. Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330 Juiz de Fora – MG, Brasil

2. Ortofarma Laboratório de Controle de Qualidade, BR 040, Empresarial Park Sul, 39, 36120-000 Matias Barbosa – MG, Brasil

Resumo: The major phytoconstituent present in *Aesculus hippocastanum* L. is a complex mixture of triterpene saponin glycosides known as escin, and the objective of this study was to develop and validate a simple and fast HPLC method for quantification of β -escin in *A. hippocastanum* L. hydroalcoholic extract. It was proposed, developed and validated a method by liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV). The method was validated for specificity, linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy and robustness and was proven adequate for quality control of this natural product.

Keywords: *Aesculus hippocastanum*; Quality Control; Chromatography, High Pressure Liquid.

Artigo publicado**Periódico:** Molecules

v. 18, p. 12561-12570, 2013.

Qualis Medicina I: B1**Título:** Antifungal activity of *Copaifera langsdorffii* Desf oleoresin against dermatophytes**Autores:** Danielle C. Zimmermann-Franco¹, Edilene B. Bolutari¹, Hudson C. Polonini¹, Antônio Márcio R. do Carmo², Maria das Graças A. M. Chaves² and Nádia R. B. Raposo¹

¹ Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil; E-Mails: dannyzimmermann@yahoo.com.br; dibolutari@gmail.com; h.c.polonini@gmail.com

² Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil; E-Mails: antoniomarcio.resende@ufjf.edu.br; duque05@gmail.com.

Resumo: Dermatophytoses are mycoses that affect keratinized tissues in both humans and animals. The aim of this study was to investigate the antifungal activity of the oleoresin extracted from *Copaifera langsdorffii* Desf. against the strains: *Microsporum canis* ATCC 32903, *Microsporum gypseum* ATCC 14683, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481 and *Trichophyton rubrum* CCT 5507. The antimicrobial activity was determined by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC). Ketoconazole and terbinafine were used as reference drugs. The copaiba oleoresin showed moderate fungicidal activity against *T. mentagrophytes* ATCC 11481 (MIC and MFC = 170 µg mL⁻¹) and weak fungicidal activity against *T. rubrum* CCT 5507 (MIC = 1,360 µg mL⁻¹ and MFC = 2,720 µg mL⁻¹). There was no activity against *M. canis* ATCC 32903 and *M. gypseum* ATCC 14683. SEM analysis revealed physical damage and morphological alterations such as compression and hyphae clustering in the structure of the fungi exposed to the action of the oleoresin. The results stimulate the achievement of *in vivo* assays to confirm the benefits of the application of oleoresin extracted from copaiba in the treatment of dermatophytoses, both in humans and in animals.

Keywords: antifungal agent; *Copaifera* spp.; dermatophytosis.

Artigo publicado

Periódico: Latin American Journal of Pharmacy
v. 31, p. 353-361, 2012.

Qualis Medicina I: B3

Título: *In vitro* efficacy of photoprotection in sunscreens: a comparison between methods

Autores: Hudson C. Polonini, Tiago B.B. Gomes, Karla M. Gonçalves, Marcos A.F. Brandão & Nádia R.B. Raposo

NUPICS – Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, Federal University of Juiz de Fora, Campus da Universidade – São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, MG – Brazil.

Resumo: Sunscreens are known to play an important role on the prevention of skin cancer, as they act by blocking the carcinogenic solar radiations. The currently methods for determining the sun protection efficacy of these products are all based on *in vivo* tests. In this light, the aim of the present study was to compare the performance of two spectrophotometric *in vitro* methods, in order to determine which one generates more trustworthy Sun Protection Factors (SPF) values: the classical UV spectrophotometry or the diffuse transmittance reflectance spectrophotometry. For that, twenty-five SPF 30 commercial sunscreen samples were used. The methods generated different results, being the diffuse transmittance spectrophotometry more appropriate and reliable for determining the SPF of these products. Moreover, it provides as additional advantage the possibility of quantifying the protection against UVA radiation through the UVA/UVB Ratio and the Critical Wavelength.

Keywords: Photoprotective activity. Sunscreening agents/UV Filters.

Artigo publicado

Periódico: Revista Brasileira de Farmácia
v. 93, p. 102-108, 2012.

Qualis Medicina I: B5

Título: Amazon native flora oils: photoprotective activity and major fatty acids constituents

Autores: Hudson Caetano Polonini¹, Karla Mara Gonçalves¹, Tiago Brum Braga Gomes¹, Marcos Antônio Fernandes Brandão¹, Maria das Graças Afonso Miranda Chaves² & Nádia Rezende Barbosa Raposo¹

1. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).
2. Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Resumo: The oils from *Astrocaryum vulgare* Mart. (tucumã), *Bertholletia excelsa* Bonpl. (castanha do Brasil), *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba), *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (pequi), *Euterpe oleracea* M. (açai), *Mauritia flexuosa* L.f. (buriti), *Oenocarpus bataua* Mart. (pataua), and *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (pracaxi) were studied in order to verify their photoprotective activity, either alone or in association with a 10% TiO₂ emulsion. The activity was assessed by the determination of the Sunburn Protection Factor, UVA/UVB Ratio and Critical Wavelength. Their fatty acid composition was assessed by gas chromatography – flame ionization detection, in order to determine their major components. None of the analyzed species achieved satisfactory photoprotection values, therefore not being useful as raw materials for marketable sunscreen products, although they can be used for other purposes since they can act as emollients, moisturizers and lubricants.

Keywords: Plant oils, Fatty acids, Sunscreening agents, Diffuse transmittance spectrophotometry, Gas chromatography.

Artigo publicado

Periódico: Química Nova
v. 35, p. 623-626, 2012.

Qualis Medicina I: B2

Título: Quantification of tryptophan in plasma by eco-friendly High Performance Liquid Chromatography

Autores: Renata Romanholi Pinhati^a, Hudson Caetano Polonini^a, Marcos Antônio Fernandes Brandão^a, Felipe D'Alessandro Ferreira Corchs^b, Wagner Farid Gattaz^b, Nádia Rezende Barbosa Raposo^{a,b}

^a NUPICS – Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil.

^b Laboratory of Neuroscience (LIM-27), Department and Institute of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of São Paulo, 01246-903, São Paulo, SP, Brazil.

Resumo: A simple, rapid, sensitive and specific high-performance liquid chromatography (HPLC) method with ultraviolet (UV) detection was used for determination of tryptophan (a serotonin synthesis precursor related to humoral and behavioral alterations) in plasma. The separation was carried out in an ACE C18 column (150 mm x 4.6 mm internal diameter, 5 µm particle size) in 10 min and the eluate was monitored by the programmed wavelength detection set at 267 nm. The mobile phase consisted of 5mM sodium acetate and acetonitrile (92:8, v/v). Sample preparation consisted of plasma deproteinization with 8% perchloric acid solution. The method was found to be linear over the range of 0.5 to 30.0 µg mL⁻¹ and the limit of detection was found to be 0.27 µg mL⁻¹. Satisfactory precision, accuracy and recovery were obtained by this method. Due to the low cost of analysis, the methodology is easily applicable in clinical laboratories for determining tryptophan in human plasma.

Keywords: tryptophan; serotonin; HPLC

Artigo publicado

Periódico: Trends in Psychiatry and Psychotherapy
v. 34, p. 161-163, 2012.

Qualis Medicina I: B4

Título: Low serum levels of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) in children with autism

Autores: Márcia HFS Tostes¹, Hudson Caetano Polonini², Wagner Farid Gattaz³, Nádia Rezende Barbosa Raposo⁴, Edilene Bolutari Baptista⁵

¹ Doutora. Núcleo de Pesquisa e Inovação em, Ciências da Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora. ² Doutorando. Programa de Pós-graduação em Saúde, Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora. ³ Doutor. Departamento e Instituto de Psiquiatria, Universidade de São Paulo. ⁴ Doutora. Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora. ⁵ Doutoranda. Programa de Pós-graduação em Saúde, Núcleo de Pesquisa e Inovação em, Ciências da Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora

Resumo: Introduction: There is evidence of the association between the occurrence of autism and low vitamin D serum levels.

Methods: Our study aimed to make the first exploratory investigation of the 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) circulating levels of infantile patients with autism and in typically developing controls from Juiz de Fora, Brazil.

Results and Discussion: We observed that serum levels of 25-OHD were lower in children with autism ($26.48 \pm 3.48 \text{ ng mL}^{-1}$) compared to typically developing subjects ($40.52 \pm 3.13 \text{ ng mL}^{-1}$) ($p < 0.001$). These findings are important for clinicians once it represents the need for vitamin supplementation during pregnancy and for treating children with autism whose vitamin D consumption is low.

Keywords: autism, children, vitamin D.

Artigo publicado

Periódico: Natural Product Communications
v. 7, p. 841-843, 2012.

Qualis Medicina I: B2

Título: PLA₂ and sPLA₂ activities were inhibited by *Centella asiatica* water extract in primary cultures of rat cortical neurons

Autores: P.P. Defillipo^a, A.H. Raposo^b, A.G. Fedoce^b, A.S. Ferreira^{a,b}, H.C. Polonini^b, W.F. Gattaz^a, N.R.B. Raposo^{a,b}

^aLaboratory of Neuroscience, Department and Institute of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

^bNúcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Minas Gerais, Brazil.

Resumo: Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that is characterized by cognitive deficits and memory impairment. Phospholipase A₂ (PLA₂) has been implicated in neurodevelopmental processes and in the early development of the nervous system. Extract from the leaves of *Centella asiatica* have been used as an alternative medicine for memory improvement in Indian Ayurvedic system of medicine for a long time. Although several studies have revealed its effect in ameliorating the cognitive impairment in rat models of AD, the molecular mechanism of *Centella asiatica* on neuroprotection still remains unexplained. In this study, we investigated the effects of *Centella asiatica* water extract on activity of subtypes of PLA₂ in primary cultures of rat cortical neurons and quantified by HPLC a possible molecule responsible for the activity. The cPLA₂ and sPLA₂ activities were inhibited *in vitro* by asiaticoside present in the water extract of *C. asiatica*. *C. asiatica* water extract may be an excellent candidate, with pharmacological activities in brain and with a very low toxicity, as attested by its long popular use as a natural product in the treatment of neurodegenerative processes.

Keywords: *Centella asiatica*, Umbelliferae, neurons, phospholipase A₂, primary culture.

Artigo publicado

Periódico: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences
v. 48, p. 399-404, 2012.

Qualis Medicina I: B3

Título: Mushroom tyrosinase inhibitory activity and major fatty acids constituents of Amazonian native flora oils

Autores: Raquel da Silva Teixeira¹, Paula Rafaela Rocha¹, Hudson Caetano Polonini^{1,2}, Marcos Antônio Fernandes Brandão^{1,2}, Maria das Graças Afonso Miranda Chaves², Nádia Rezende Barbosa Raposo^{1,2}

¹NIQUA, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

²NUPICS, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

Resumo: In order to treat the hyperpigmentation-related problems, there is a world tendency in developing cosmetics claiming to have skin-whitening properties, which act inhibiting the melanin biosynthesis. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* mushroom tyrosinase inhibitory activity of five Amazonian native flora oils, and so to verify the possibility of their incorporation into cosmetics products. In addition, the fatty acids composition of the essential oils was determined by gas chromatography – flame ionization detection, in order to determine the main components of these oils. The tyrosinase inhibitory activity of tested oils was found to be in the following order: açai (IA₅₀ = 66.08 µg mL⁻¹) > tucumã > patauá > pracaxi > castanha do Brasil. This study suggests that açai oil have a great potential for the treatment of hyperpigmentation and other related disorders, due to its considerable tyrosinase inhibitory activity.

Keywords: Amazonian plants/ evaluation/ dermatological use. Skin lightening agents. Tyrosinase. Melanin.

Artigo publicado

Periódico: Bioorganic & Medicinal Chemistry
v. 21, p. 964-968, 2012.

Qualis Medicina I: A2

Título: Photoprotective activity of resveratrol analogues

Autores: Hudson Caetano Polonini^a, Larissa Lavorato Lima^b, Karla Mara Gonçalves^a, Antônio Márcio Resende do Carmo^c, Adilson David da Silva^b and Nádia Rezende Barbosa Raposo^a

^aNúcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da saúde (NUPICS), Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, 36036-900, Brazil

^bDepartamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora 36036-900, Brazil

^cFaculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora 36036-900, Brazil.

Resumo: Resveratrol is a promising agent for protecting human skin from UV radiation and to reduce the occurrence of cutaneous malignancies. We describe the photoprotective activity of six resveratrol analogues using the diffuse transmittance technique to determine the SPF and the protection against UVA radiation. The analogues presented a varied profile of photoprotection, the SPF ranging from 2 to 10 and the UVAPF from 0 to 9. Among the six compounds tested, the protection against UVB sunrays provided by compound B was more significant than the protection provided by resveratrol; compounds C, D, E and F show photoprotection similar to resveratrol.

Keywords: Photoprotective Activity. Sunscreening Agents/UV Filters. Chemical Synthesis. Ultraviolet Radiation. Resveratrol, Structure-Activity Relationship

Artigo publicado:

Periódico: Revista Brasileira de Farmácia
v. 93, p. 487-492, 2012.

Qualis Medicina I: B5

Título: Estudo comparativo de preparações orais sólidas contendo carbamazepina: teste e perfil de dissolução

Autores: Michele Campos Alves¹, Hudson Caetano Polonini¹, Urias Pardócimo Vaz¹, Anderson de Oliveira Ferreira² & Marcos Antônio Fernandes Brandão^{1*}

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil

²Ortofarma - Laboratório de Controle de Qualidade, 36120-000, Matias Barbosa, MG, Brasil

Resumo: O presente trabalho teve como principal objetivo comparar a qualidade de preparações orais sólidas contendo carbamazepina na dosagem de 200 mg, através do Estudo de Perfil de Dissolução Comparativo. Foram incluídos no estudo dois lotes de cada fabricante para os medicamentos de referência (R1 e R2), genérico (G1 e G2) e similar (S1 e S2) e dois lotes de cápsulas manipuladas (M1 e M2). As propriedades físico-químicas foram avaliadas quanto ao peso médio, teor de fármaco, teste de dissolução, perfil de dissolução e eficiência de dissolução. Em seguida, foram considerados os valores calculados do fator de semelhança (f2) para o perfil de dissolução comparativo da forma farmacêutica comprimido. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que lotes testados estão em conformidade com as especificações estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Todos os lotes testados, exceto G2, apresentaram maior eficiência de dissolução que os lotes do medicamento de referência. Pelos resultados obtidos, o lote G2 não apresentou equivalência farmacêutica ao medicamento de referência.

Palavras-chave: Carbamazepina. Controle de Qualidade. Dissolução.

APÊNDICE B – RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

POLONINI, H.C. ; BRANDÃO, M. A. F. ; FERREIRA, A. O. ; RAMOS, C. ; CHAVES, M.G.A.M. ; RAPOSO, N. R. B. Human female sexual steroids into compounded semisolid formulations: evaluation of percutaneous absorption performance. 2013. 5th International BBBB Conference, Abstract Book. In: European Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 50, supl. 1, 2013.

ALMEIDA, P. A. ; ALVES, M. C. ; POLONINI, H.C. ; FERREIRA, A. O. ; CHAVES, M.G.A.M. ; BRANDÃO, M. A. F. ; RAPOSO, N. R. B. . Improving bioavailability of resveratrol: in vitro studies on drug release and percutaneous absorption from transdermals. 2013. 5th International BBBB Conference, Abstract Book. In: European Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 50, supl. 1, 2013.

ALVES, M. C. ; ALMEIDA, P. A. ; POLONINI, H.C. ; RAPOSO, N. R. B. ; FERREIRA, A. O. ; BRANDÃO, M. A. F. . Green tea in transdermal formulation: quality control and in vitro drug release assays. In: 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery: advances in local drug delivery, 2013, Pisa - Itália. 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery: Advances in Local Drug Delivery - Programme and Abstracts. Pisa - Itália: ADRITELF & ISDDST, 2013. p. 153-153.

FOCHAT, R. C. ; POLONINI, H. C. ; BATISTA, G. R. ; RODRIGUES, M. A. C. ; CHAVES, M. G. A. M. ; CHICOUREL, E. L. ; RAPOSO, N. R. B. . Cardiac function in Brazilian frail elderly. European Journal of Epidemiology, v. 27, p. S181-S182, 2012.

FOCHAT, R.C ; FARINAZZO, S. M. M. ; SILVA JUNIOR, A. ; BARBOSA, E. M. S. ; POLONINI, H. C. ; VIEIRA, R. C. P. A. ; BRANDÃO, M. A. F. ; BRANDÃO, M. A. F. ; Raposo, N.R. . Prevalence of cognitive impairment in Brazilian frail elderly. European Journal of Epidemiology, v. 27, p. S181-S181, 2012.

APÊNDICE C – TRABALHOS APRESENTADOS

POLONINI, H.C. ; BRANDÃO, M. A. F. ; FERREIRA, A. O. ; RAMOS, C. ; CHAVES, M.G.A.M. ; RAPOSO, N. R. B. . Human female sexual steroids into compounded semisolid formulations: evaluation of percutaneous absorption performance. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso: 5th BBBBB International Conference, Atenas, Grécia).

ALMEIDA, P. A. ; ALVES, M. C. ; POLONINI, H.C. ; FERREIRA, A. O. ; CHAVES, M.G.A.M. ; BRANDÃO, M. A. F. ; RAPOSO, N. R. B. . Improving bioavailability of resveratrol: in vitro studies on drug release and percutaneous absorption from transdermals. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso: 5th BBBBB International Conference, Atenas, Grécia).

POLONINI, H. C. ; SANTOS, J. A. ; GONÇALVEZ, K. M. ; GOMES, T. B. B. ; CARMO, A. M. R. ; RAPOSO, N. R. B. ; SILVA, A. D. Photoprotective activity of resveratrol analogues. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso: 14th Tetrahedron Symposium, Viena, Áustria).

ALVES, M. C. ; ALMEIDA, P. A. ; POLONINI, H.C. ; RAPOSO, N. R. B. ; FERREIRA, A. O. ; BRANDÃO, M. A. F. . Green tea in transdermal formulation: quality control and in vitro drug release assays. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso: 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery: Advances in Local Drug Delivery, Pisa, Itália).

POLONINI, H. C. ; LOURES, S. ; GROSSI, L. N. ; FERREIRA, A. O. ; CHAVES, M. G. A. M. ; BRANDAO, M. A. F. ; RAPOSO, N. R. B. . Quantification of Bioidentical Testosterone in Transdermal Dosage Forms by Eco-Friendly Liquid Chromatography. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio: 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, California, EUA).

POLONINI, H. C. ; LOURES, S. ; GROSSI, L. N. ; FERREIRA, A. O. ; CHAVES, M. G. A. M. ; BRANDAO, M. A. F. ; RAPOSO, N. R. B. . Development of an Eco-Friendly Method for Determination of Bioidentical Progesterone in Transdermal Dosage Forms. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio: 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, California, EUA).

POLONINI, H. C. ; LOURES, S. ; GROSSI, L. N. ; FERREIRA, A. O. ; CHAVES, M. G. A. M. ; BRANDAO, M. A. F. ; RAPOSO, N. R. B. . Simultaneous Determination of Bioidentical Estradiol and Estriol in Transdermal Dosage Forms by Eco-Friendly Liquid Chromatography. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio: 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, California, EUA).

ALVES, M. ; OLIVEIRA, A. A. ; POLONINI, H. C. ; LOURES, S. ; GROSSI, L. N. ; FERREIRA, A. O. ; OLIVEIRA, M. A. L. ; RAPOSO, N. R. B. ; BRANDAO, M. A. F. . Development of a New Eco-Friendly Method for Quality Control of Green Tea. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio: 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, California, EUA).

GROSSI, L. N. ; POLONINI, H. C. ; FERREIRA, A. O. ; BRANDAO, M. A. F. ; OLIVEIRA, M. A. L. ; RAPOSO, N. R. B. . A New Method for Determination of Folic Acid in Capsules by Reversed Phase Liquid Chromatography Under Isocratic Mode. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio: 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, California, EUA).

GROSSI, L. N. ; POLONINI, H. C. ; BRANDAO, M. A. F. ; FERREIRA, A. O. ; OLIVEIRA, M. A. L. ; RAPOSO, N. R. B. . Development and Validation of Analytical Method for Determination of Medroxyprogesterone Acetate in Capsules: A Chemometrical Approach. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio: 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, California, EUA).