

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
Curso de Química Medicinal

Felipe Schlichta de Gouveia

**Desenvolvimento e otimização de microemulsões para a entrega transdérmica de
cloridrato de donepezila**

Porto Alegre

2022

Felipe Schlichta de Gouveia

Desenvolvimento e otimização de microemulsões para a entrega transdérmica de cloridrato de donepezila

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao curso de Química Medicinal da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química Medicinal.

Orientadora: Profa. Dra. Tanira Alessandra Silveira Aguirre

Porto Alegre

2022

Catálogo na Publicação

Gouveia, Felipe Schlichta de

Desenvolvimento e otimização de microemulsões para a entrega transdérmica de cloridrato de donepezila / Felipe Schlichta de Gouveia. -- 2022.

37 p. : 30 cm.

Monografia (trabalho de conclusão de curso) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Curso de Química Medicinal, 2022.

Orientador(a): Prof. Dra. Tanira Alessandra Silveira Aguirre.

1. Físico-Química. 2. Sistemas emulsionados. 3. Química Analítica. 4. Microemulsões. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me ofereceram uma oportunidade de estudar jornada de estudar longe casa.

A minha orientadora Tanira, que me acolheu desde o iniciou do curso em 2017 no programa de iniciação científica, me iniciou na pesquisa e acompanhou meu desenvolvimento e evolução durante todo este processo, isto mudou minha vida.

A todos os meus irmãos, amigos e a minha namorada, pelos momentos de companheirismo e alegrias. E em especial a Douglas e Karin, que me ajudaram muito na trajetória final do curso, oferecendo abrigo em Porto Alegre, para que eu pudesse finalizar todos os experimentos do TCC.

Muito obrigado!

PREÂMBULO

O presente trabalho de conclusão de curso será apresentado no formato de artigo científico, conforme o modelo de manuscrito requerido para a submissão na revista científica Química Nova, disponível no site (<http://quimicanova.sbq.org.br/conteudo.asp?page=2>), ocorrendo a submissão do manuscrito após a avaliação da banca examinadora.

A apresentação neste formato está prevista no Art. 4º da Resolução Nº 11/2020/CONSEPE, de 23 de janeiro de 2020, que regulamenta os trabalhos de conclusão de curso de Bacharelado em Química Medicinal. Segundo o Art. 4º, “*Os resultados oriundos da pesquisa do TCC serão escritos na forma de artigo científico ou monografia, à critério do professor orientador do TCC.*”.

Contudo, optou-se por adicionar ao documento final do trabalho partes do conteúdo do projeto incluindo referencial teórico e objetivos, a fim de propiciar um maior aprofundamento aos tópicos abordados caso seja de interesse do leitor. Assim, o artigo científico contendo os resultados e discussão é apresentado ao final do documento.

RESUMO

O cloridrato de donepezila é um fármaco utilizado para a doença de Alzheimer e com possível aplicação para o tratamento da hipertensão o qual possui um amargor elevado desagradável e efeitos adversos gastrointestinais, o que dificulta na adesão dos pacientes ao tratamento pela via oral. As microemulsões são sistemas nanoestruturados que possuem a versatilidade de poder serem aplicadas nas mais variadas vias de administração. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e caracterização de microemulsões para a entrega transdérmica de cloridrato de donepezila (DONE). A composição da formulação foi investigada por diagramas pseudoternários obtendo uma microemulsão A/O na composição mássica: óleo de babaçu (17,8%), TCM (26,2%), água (10%), Span[®] 83 (29,7%), Tween[®] 80 (7,1%) e Transcutol[®] HP (9,2%). Esta foi caracterizada por pH, condutividade, teor de fármaco, tamanho de gotícula e índice de polidispersão resultando em $7,80 \pm 0,19$; $1,0 \mu\text{S cm}^{-1} \pm 0,1$; $0,54 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0,05$; $22,64 \text{ nm} \pm 0,49$; $0,093 \pm 0,045$; respectivamente. A cinética de saída do fármaco foi investigada através de ensaios de permeação e liberação. Os resultados corroboram que o sistema desenvolvido é uma microemulsão A/O com o potencial de controlar a liberação do DONE para possível administração pela via transdérmica.

Palavras-chave: microemulsão; cloridrato de donepezila; CLAE; óleo de babaçu.

ABSTRACT

Donepezil hydrochloride is a drug used for Alzheimer's disease and with possible application for the treatment of hypertension which has a high bitterness and gastrointestinal adverse effects, making it difficult for patients to adhere to oral treatment. Microemulsions are nanostructured systems that have the versatility to be applied in the most varied routes of administration. The aim of this study is the development and characterization of microemulsions for the transdermal delivery of donepezyl hydrochloride (DONE). The formulation composition was investigated by pseudoternary diagrams obtaining a W/O microemulsion in the following mass composition: babassu oil (17.8%), TCM (26.2%), water (10%), Span[®] 83 (29.7%), Tween[®] 80 (7.1%) and Transcutol[®] HP (9,2%). This was characterized for pH, conductivity, drug content, droplet size and polydispersity index resulting in 7.80 ± 0.19 ; $1.0 \mu\text{S cm}^{-1} \pm 0.1$; $0.54 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0.05$; $22.64 \text{ nm} \pm 0.49$; 0.093 ± 0.045 ; respectively. The drug exit kinetics was investigated using permeation and release assays. The results corroborate that the developed system is an A/O microemulsion with the potential to control the release of DONE for possible administration by the transdermal route.

Keywords: microemulsion; donepezil hydrochloride; HPLC; babassu oil.

SUMÁRIO

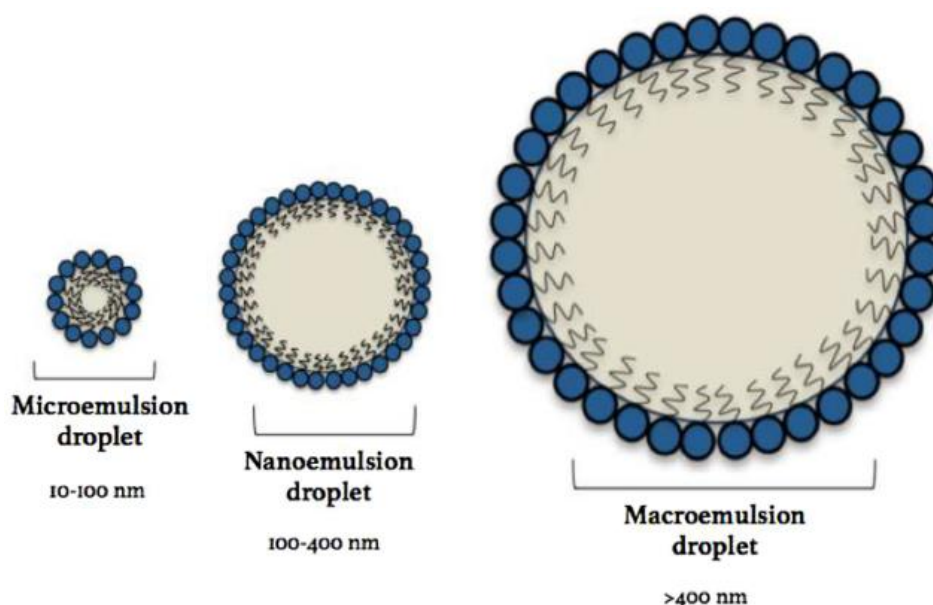
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
1.1 SISTEMAS EMULSIONADOS	9
1.1.1 Microemulsões	10
1.2 VIA TRANSDÉRMICA	11
1.3 COMPONENTES MULTIFUNCIONAIS.....	12
1.4 CLORIDRATO DE DONEPEZILA	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
ARTIGO CIENTÍFICO COMPLETO A SER SUBMETIDO NA REVISTA QUÍMICA NOVA.	20

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 SISTEMAS EMULSIONADOS

Existem os mais variados sistemas emulsionados, possuindo organizações e estabilidades e objetivos/funções diferentes, por isso podem ser encontrados no nosso dia a dia em alimentos (como a maionese que é uma emulsão), nas indústrias e nos medicamentos. Os sistemas emulsionados são formados por 3 principais grupos de substâncias: dois líquidos imiscíveis (água e óleos) e moléculas anfifílicas chamadas de tensoativos, sendo este, essencial para a sua estabilização. Emulsões, nanoemulsões e microemulsões são alguns exemplos desses sistemas (Figura 1). Esses se organizam microscopicamente de uma maneira semelhante, em monocamada de tensoativos formando uma micela simples. Apesar disso, cada uma dessas formulações tem características específicas e são classificadas, de uma maneira geral, pelo tamanho de gotícula, sistemas com gotículas maiores que 400 nanômetros são chamados de emulsões (ou macroemulsões), sistemas com gotículas entre 100 a 400 nanômetros são chamadas de nanoemulsões e sistemas que possuem gotículas de 10 a 100 nanômetros são classificadas como microemulsões (CALLENDER *et al.*, 2017).

Figura 1 – Diferentes tipos de sistemas emulsionados.



Fonte: (CALLENDER *et al.*, 2017).

As macroemulsões possuem uma metodologia simples de produção necessitando de uma aplicação de energia externa para a sua formação. Já as nanoemulsões necessitam de uma metodologia mais complexa para ser produzida, com aplicação de energia externa mecânica ou por potencial químico dos componentes. Macroemulsões e nanoemulsões possuem uma estabilidade cinética, e esta última foi descoberta/inventada posteriormente às microemulsões, o que ocasionou uma nomenclatura confusa na literatura, em que a nanoemulsão, apesar de possuir um diâmetro de gotícula maior que a microemulsão, possui o prefixo NANO no nome. A nanoemulsão é um sistema bastante eficiente e utilizado pela indústria farmacêutica, exercendo a função de carreador de fármacos, existem diversos trabalhos na literatura para essa aplicação. Para a microemulsão também existem diversos trabalhos na literatura como função carreadora de fármacos além disso é um sistema com características interessantes em diversos aspectos que serão abordados em mais detalhes a seguir.

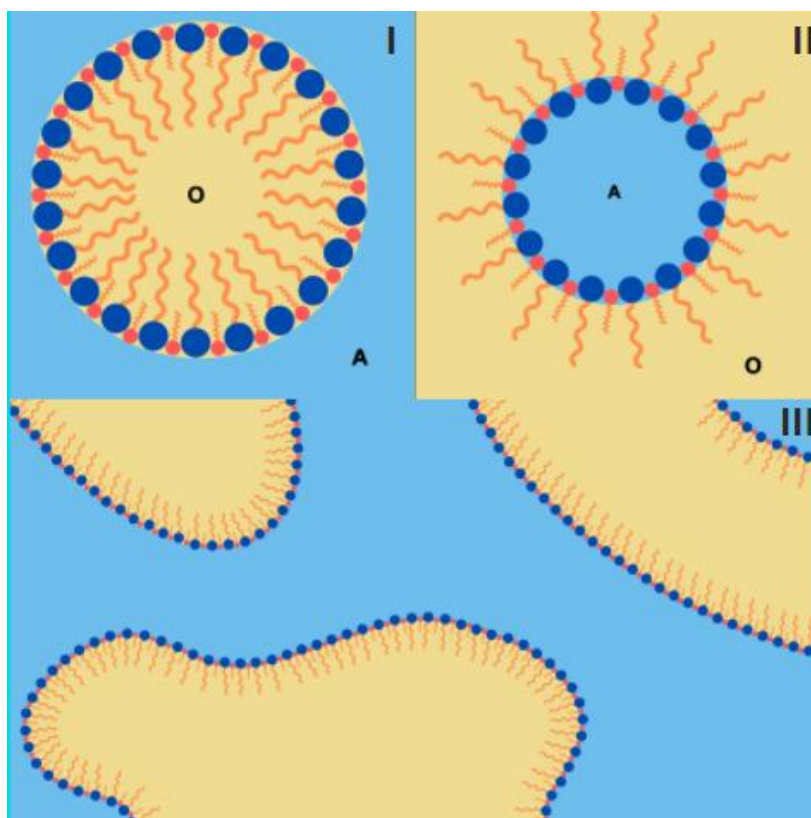
1.1.1 Microemulsões

Microemulsões são sistemas nanoestruturados homogêneos formados por dois líquidos imiscíveis estabilizados por um filme de tensoativos (DAMASCENO *et al.*, 2011). Tensoativos são moléculas anfifílicas, ou seja, são constituídos por uma parte apolar (cauda) e por uma parte polar (cabeça). Quando incorporados em um sistema coloidal os tensoativos se organizam de forma a minimizar a interação entre as fases imiscíveis, minimizando a tensão interfacial existente. No caso das microemulsões, os tensoativos geralmente organizam/se na forma de micelas em uma monocamada (DA SILVA *et al.*, 2015). O diferencial das microemulsões para os outros sistemas coloidais é a presença de pequenas moléculas denominadas co-tensoativos (geralmente álcoois pequenos) que conseguem alcançar espaços na micela que os próprios tensoativos não conseguem, devido a um impedimento estérico, e então reduzir a quase zero a tensão interfacial do sistema (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Isto torna espontâneo o processo de formação das microemulsão, levando a certas características importantes das microemulsões como a estabilidade termodinâmica, auto-organização e isotropia óptica (KARASULU, 2008).

As microemulsões são sistemas versáteis com um baixo custo e uma metodologia simples para a sua produção, além de facilmente escalonáveis. Esses nanossistemas são opticamente translúcidos ao não difratarem a luz (FORMARIZ *et al.*, 2005), devido ao tamanho interno reduzido das gotículas, de 10 a 100 nm (TARTARO *et al.*, 2020). As microemulsões se

organizam de diferentes formas e as principais formas são a óleo em água (O/A), a água em óleo (A/O) e bicontínuas (Figura 2). Por tal motivo, dependendo da sua composição, esses sistemas possuem a capacidade de incorporar tanto moléculas hidrofílicas (GIBAUD; ATTIVI, 2012) quanto moléculas lipofílicas (SARIBEY *et al.*, 2021). Esses sistemas apresentam uma alta aplicabilidade desde recuperação de óleos a carreadores de fármacos, podendo ser administradas por diversas vias como a ocular (NAZ *et al.*, 2020), nasal (KATDARE *et al.*, 2020), oral (SANG *et al.*, 2005), tópica (AGGARWAL; GOINDI; KHURANA, 2013), transdérmica (MISHRA; PRABHAVALKAR; BHATT, 2016), parenteral (ABOUMANEI *et al.*, 2018), vaginal (BACHHAV; PATRAVALE, 2009) e retal (WANG *et al.*, 2016).

Figura 2 – Organização das microemulsões. I – óleo em água; II – água em óleo, III – bicontínua.

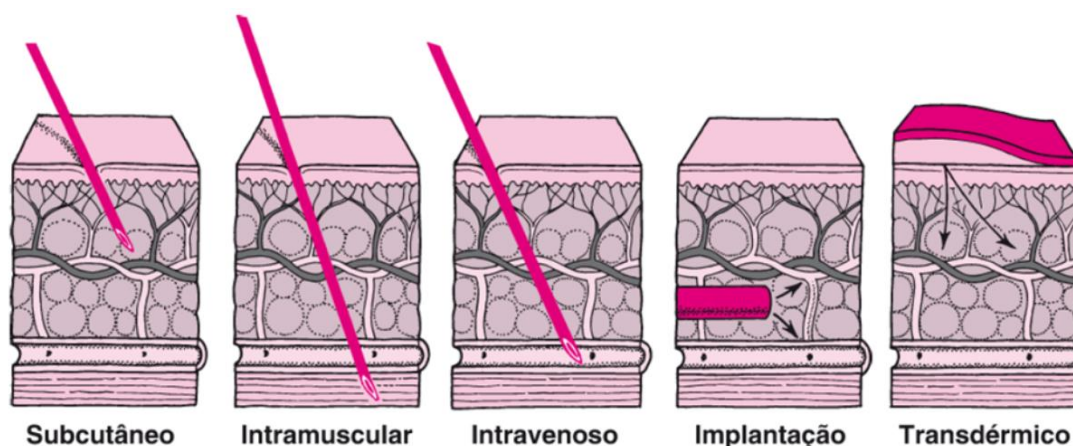


1.2 VIA TRANSDÉRMICA

A pele, nos seres humanos, funciona como uma barreira para a proteção contra microrganismos e moléculas exógenas. É um órgão complexo de 2 a 3 mm de espessura formado por várias camadas como a epiderme, derme e hipoderme, que são subdivididas em

mais subcamadas (FOX *et al.*, 2011). A pele tem a função de manutenção da homeostase corporal evitando a perda de água pelo estrato córneo (PANAPISAL; CHAROENSRI; TANTITUVANONT, 2012). A via transdérmica tem como objetivo principal a administração de moléculas de forma que a distribuição dela seja sistêmica, através de uma maneira não invasiva. A Figura 3 ilustra o mecanismo de entrega de medicamentos dessa via em comparação a outras. A via transdérmica traz diversas vantagens: evita o metabolismo de primeira passagem das moléculas, pode reduzir a frequência de dosagem de um fármaco, aumenta a biodisponibilidade, torna o nível plasmático dos fármacos uniforme, o que pode reduzir efeitos colaterais, além de sua aplicação ser simples e fácil (YANG *et al.*, 2017). Porém, existem certos requisitos biológicos e físico-químicos para que as moléculas possam ser administradas pela via transdérmica com uma boa eficiência. Geralmente são administradas por essa via, pequenas moléculas lipofílicas com peso molecular inferior a 500 Da (SOZIO *et al.*, 2012).

Figura 3 – Diferentes vias de administração de medicamentos.



Fonte: Adaptado de (JENNIFER LE, 2020).

1.3 COMPONENTES MULTIFUNCIONAIS

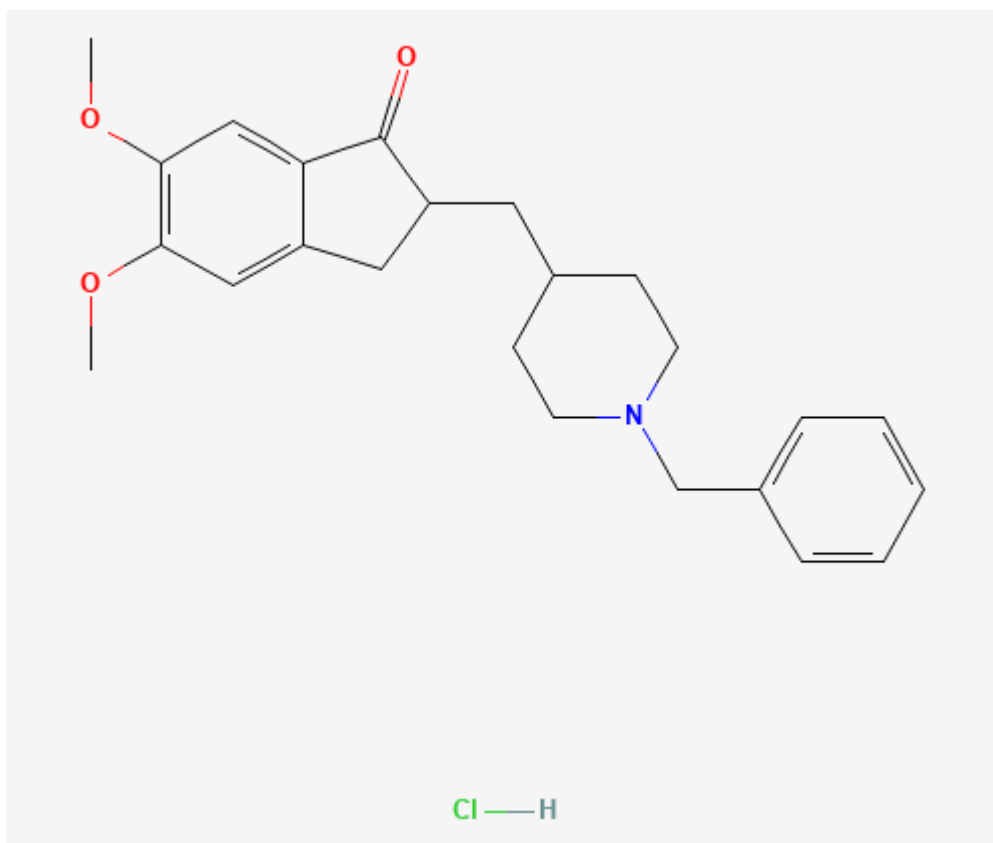
Uma estratégia interessante para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas é a utilização de moléculas/excipientes dito multifuncionais. Essas são multifuncionais, pois além de serem essenciais para a organização e estruturação da formulação (função principal), também apresentam outros benefícios, como uma atividade terapêutica ou promotora de absorção. O óleo de babaçu é um produto natural brasileiro, que pode ser obtido de diferentes espécies da palmeira de babaçu. Esse óleo apresenta diversas propriedades terapêuticas como

anti-inflamatória, analgésica e entre outras (DA SILVA; PARENTE, 2001), além de possuir características emolientes importantes para formulações farmacêuticas, nas quais já foi incorporado com sucesso (PESSOA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015). É interessante ressaltar que o óleo de babaçu já demonstrou atividade promotora de absorção intestinal para moléculas hidrofílicas *in vitro* e *ex-vivo* (BRAYDEN; DEE, 2002). O óleo de babaçu será incorporado na formulação desenvolvida neste trabalho com o intuito de ser um componente estruturante da fase oleosa da microemulsão bem como conferir uma ação emoliente e possível efeito de incremento na absorção do cloridrato de donepezila pela via transdérmica.

1.4 CLORIDRATO DE DONEPEZILA

O cloridrato de donepezila (Figura 4) é uma substância amplamente empregada para o tratamento da doença de Alzheimer, sendo a mais aceita por pacientes por ser o fármaco mais efetivo, dentre os aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para essa doença, e desencadear menores efeitos indesejados (MOHSIN; AHMAD, 2020). Esta molécula é um inibidor da acetilcolinesterase (AChE), reduzindo ações das colinesterases o que leva a um aumento do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica, resultando em uma melhora das funções colinérgicas dos pacientes com Alzheimer (GREEN; FOSSO; GARNEAU-TSODIKOVA, 2018) e induz uma modulação parassimpática (LATARO *et al.*, 2015; SANTANA_JB_ME_SJC, 2016). Além disso, possui alguns indícios que pode atuar na regulação da hipertensão arterial (LATARO *et al.*, 2015). Ensaios *in vivo* demonstram um efeito positivo deste fármaco, na remodelação cardíaca, hemodinâmica (OKAZAKI *et al.*, 2010) e na prevenção de insuficiência cardíaca (HANDA *et al.*, 2009). O cloridrato de donepezila possui a habilidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica atuando diretamente no sistema nervoso central, que por mecanismos não totalmente elucidados, tem potencial de atenuar o desenvolvimento da hipertensão arterial (LATARO *et al.*, 2015).

Figura 4 – Estrutura química do cloridrato de donepezila.



Fonte: (DONEPEZIL HYDROCHLORIDE, 2021).

Existem produtos para administração da donepezila pela via oral no Brasil (CMED, 2017) e também pela via transdérmica (ADLARITY®) aprovado nos Estados Unidos (FDA, 2022). Além disso, existem pesquisas para outras vias de administração para a donepezila como a intranasal por exemplo (ESPINOZA *et al.*, 2019). A via de administração oral é a via mais convencional e, geralmente, mais aceita por pacientes, porém para o caso do cloridrato de donepezila existem algumas complicações para esta via (ZHAO *et al.*, 2021). Primeiramente, este fármaco é o mais aplicado para a doença de Alzheimer e muitas vezes, devido às condições clínicas dos pacientes, esses ou seus cuidadores possuem dificuldades na administração oral de medicamentos. Outro fator que dificulta administração do cloridrato de donepezila pela via oral, é que esta substância tem a característica possuir um sabor muito amargo, além de causar efeitos gastrointestinais indesejados (náusea, vômito, entre outros), fatores esses que dificultam a adesão ao tratamento (SUTTHAPITAKSAKUL; DASS; SRIAMORNSAK, 2021). Portanto a via transdérmica pode ser uma interessante alternativa para contornar esse problema. O cloridrato de donepezila possui um peso molecular de 415,96 Da, um log *P* de 3,58, uma solubilidade de 9.60×10^{-4} mg/mL e 2.31×10^{-6} mol/L em água e não viola nenhuma regra de

Lipinski, segundo a ferramenta de predição SwissADME, sendo possível a administração deste fármaco pela via transdérmica.

Segundo a organização mundial da saúde (OMS), doenças não comunicáveis são a causa da morte de 41 milhões de pessoas por ano, sendo aproximadamente 71% das mortes ao redor do globo (FOROUZANFAR; AFSHIN; ALEXANDER, 2016). Dentre essas, as doenças cardiovasculares são as que representam a maior parcela dessa morte, cerca de 17,9 milhões de pessoas por ano (NONCOMMUNICABLE DISEASES, 2021). A hipertensão arterial é uma doença cardiovascular e é um fator de risco importante para outras doenças cardiovasculares, como o infarto, doenças cerebrais, a doença de Alzheimer e o acidente vascular cerebral (AVC), doenças renais, como doença renal crônica, entre outras e em casos mais graves, a hipertensão pode levar ao falecimento. Nos últimos 30 anos, o número de adultos entre 30 e 79 anos diagnosticados com hipertensão aumentou de 650 milhões para 1,28 bilhões, ou seja, a quantidade de pessoas com hipertensão desde 1990 até o momento, dobrou; além disso, segundo um estudo realizado pela OMS, metade dos participantes não sabiam que possuíam essa condição (ZHOU *et al.*, 2021). Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), cerca de 30% da população brasileira é hipertensa (SOUZA, 2021). A hipertensão também é um fator de risco para a doença Covid-19, em que os pacientes hipertensos devem se esforçar ainda mais para manter a pressão arterial controlada. Devido à grande quantidade de pessoas diagnosticadas com hipertensão arterial, novos tratamentos que combatam essa patologia se fazem necessários, bem como novas opções não invasivas, como por exemplo, adesivos transdérmicos.

Assim, o objetivo do trabalho engloba a preparação e caracterização de microemulsões contendo óleo de babaçu com o cloridrato de donepezila incorporado visando a administração transdérmica para possível tratamento da hipertensão arterial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Preparar e caracterizar microemulsões contendo óleo de babaçu com o cloridrato de donepezila incorporado visando a administração transdérmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir diagramas pseudoternários combinando água, óleo de babaçu com diferentes tensoativos e co-tensoativos a fim de identificar as condições e proporções dos componentes em que o sistema formem microemulsões;
- Caracterizar as microemulsões através de ensaios físico-químicos, a fim de obter informações sobre esse sistema coloidal;
- Desenvolver e validar um método de quantificação do cloridrato de donepezila por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Realizar estudos de liberação e permeação do cloridrato de donepezila das microemulsões *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUMANEI, Mohamed H. *et al.* Design and development of microemulsion systems of a new antineoplaston A10 analog for enhanced intravenous antitumor activity: In vitro characterization, molecular docking, 125I-radiolabeling and in vivo biodistribution studies. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 545, n. 1–2, p. 240–253, 2018.

AGGARWAL, Nidhi; GOINDI, Shishu; KHURANA, Ranjit. Formulation, Characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 105, p. 158–166, 2013.

BACHHAV, Yogeshwar G.; PATRAVALE, Vandana B. Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, in vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 365, n. 1–2, p. 175–179, 2009.

BRAYDEN, David J.; DEE, Jacqueline M. **Composition and method for enhancing transport across gastrointestinal tract cell layers**. US Patent 6423334 B1. Concessão: 2002.

CALLENDER, Shannon P. *et al.* Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 526, n. 1–2, p. 425–442, 2017.

CMED. **CÂMARA DE REGULAÇÃO DO MERCADO DE MEDICAMENTOS SECRETARIA-EXECUTIVA *VERSÃO CONSOLIDADA***. [S. l.: s. n.], 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/comunicadoscmcd>,. .

DA SILVA, José Dilson F. *et al.* Microemulsões: Componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, [s. l.], v. 38, n. 9, p. 1196–1206, 2015.

DA SILVA, B P; PARENTE, J P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 72, n. 8, p. 887–893, 2001.

DAMASCENO, B. P.G.L. *et al.* Microemulsão: Um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 9–18, 2011.

DONEPEZIL HYDROCHLORIDE. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Donepezil-hydrochloride>. Acesso at: 31 Jan. 2022.

ESPINOZA, Lupe Carolina *et al.* Formulation strategies to improve nose-to-brain delivery of donepezil. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2019.

FDA. **JUNE 2022-APPROVED DRUG PRODUCT LIST APPENDIX A-PRODUCT NAME INDEX**. [S. l.: s. n.], 2022.

FORMARIZ, Thalita Pedroni *et al.* Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 301–313, 2005.

FOROUZANFAR, M. H.; AFSHIN, A.; ALEXANDER, L. T. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, [s. l.], v. 388, n. 10053, p. 1659–1724, 2016.

FOX, Lizelle T. *et al.* Transdermal drug delivery enhancement by compounds of natural origin. **Molecules**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 10507–10540, 2011.

GIBAUD, Stéphane; ATTIVI, David. Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 937–951, 2012.

GREEN, Keith D.; FOSSO, Marina Y.; GARNEAU-TSODIKOVA, Sylvie. Multifunctional donepezil analogues as cholinesterase and BACE1 inhibitors. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 1–22, 2018.

HANDA, Takemi *et al.* Anti-Alzheimer's Drug, Donepezil, Markedly Improves Long-Term Survival After Chronic Heart Failure in Mice. **Journal of Cardiac Failure**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 805–811, 2009.

JENNIFER LE. **Administração de medicamentos**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/casa/medicamentos/administração-de-medicamentos-e-farmacocinética/administração-de-medicamentos>. Acesso at: 26 Jan. 2022.

KARASULU, H. Yesim. Microemulsions as novel drug carriers: The formation, stability, applications and toxicity. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 119–135, 2008.

KATDARE, Aakash *et al.* Comparative evaluation of fish oil and butter oil in modulating delivery of galantamine hydrobromide to brain via intranasal route: pharmacokinetic and oxidative stress studies. **Drug Delivery and Translational Research**, [s. l.], 2020.

LATARO, Renata M. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibition Attenuates the Development of Hypertension and Inflammation in Spontaneously Hypertensive Rats. **American Journal of Hypertension**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 1201–1208, 2015.

MISHRA, Ratnesh; PRABHAVALKAR, Kedar S.; BHATT, Lokesh Kumar. Preparation, optimization, and evaluation of Zaltoprofen-loaded microemulsion and microemulsion-based gel for transdermal delivery. **Journal of Liposome Research**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 297–306, 2016.

MOHSIN, Noor Ul Amin; AHMAD, Matloob. Donepezil: A review of the recent structural modifications and their impact on anti-alzheimer activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 56, p. 1–16, 2020.

NAZ, Tehreem *et al.* The Study of Stability and Location of Chloramphenicol in Newly Formed Microemulsion Based Ocular Drug Delivery System. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, [s. l.], v. 53, n. 11, p. 1047–1052, 2020.

NONCOMMUNICABLE DISEASES. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. Acesso at: 16 Dec. 2021.

OKAZAKI, Yoshihisa *et al.* Effect of the cholinesterase inhibitor donepezil on cardiac remodeling and autonomic balance in rats with heart failure. **Journal of Physiological Sciences**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 67–74, 2010.

OLIVEIRA, Anselmo Gomes De *et al.* Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 131–138, 2004.

PANAPISAL, Vipaporn; CHAROENSRI, Sawitree; TANTITUVANONT, Angkana. Formulation of microemulsion systems for dermal delivery of silymarin. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 389–399, 2012.

PESSOA, Rafael Souza *et al.* Microemulsion of babassu oil as a natural product to improve human immune system function. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 9, p. 21–31, 2014.

RODRIGUES, Escarlethda da C.R. *et al.* Development of babassu oil based nanoemulsions. **Latin American Journal of Pharmacy**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 338–343, 2015.

SANG, Kyoon Kim *et al.* Tricaprylin microemulsion for oral delivery of low molecular weight heparin conjugates. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 105, n. 1–2, p. 32–42, 2005.

SANTANA_JB_ME_SJC. [s. l.],

SARIBEY, Güler *et al.* Design and characterisation of colloidal nanocarriers for enhanced skin delivery of etodolac. **Journal of Research in Pharmacy**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 22–33, 2021.

SOUZA, Ludmilla. **Cerca de 30% dos brasileiros são hipertensos, aponta SBC**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2021-04/cerca-de-30-dos-brasileiros-sao-hipertensos-aponta-sbc>. Acesso at: 17 Dec. 2021.

SOZIO, Piera *et al.* Transdermal donepezil on the treatment of Alzheimer's disease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, [s. l.], v. 8, p. 361–368, 2012.

SUTTHAPITAKSAKUL, Lalinthip; DASS, Crispin R.; SRIAMORNSAK, Pornsak. Donepezil—an updated review of challenges in dosage form design. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 63, n. March, p. 102549, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102549>.

TARTARO, Giuseppe *et al.* **Microemulsion microstructure(s): A tutorial review**. [S. l.]: MDPI AG, 2020.

WANG, Lu Lu *et al.* In situ delivery of thermosensitive gel-mediated 5-fluorouracil microemulsion for the treatment of colorectal cancer. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 10, p. 2855–2867, 2016.

YANG, Rong *et al.* Getting Drugs Across Biological Barriers. **Advanced Materials**, [s. l.], v. 29, n. 37, 2017.

ZHAO, Ze Qiang *et al.* An Update on the Routes for the Delivery of Donepezil. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 2482–2494, 2021.

ZHOU, Bin *et al.* Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. **The Lancet**, [s. l.], v. 398, n. 10304, p. 957–980, 2021.

ARTIGO CIENTÍFICO COMPLETO A SER SUBMETIDO NA REVISTA QUÍMICA NOVA.

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES PARA A ENTREGA TRANSDÉRMICA DE CLORIDRATO DE DONEPEZILA

Felipe Schlichta de Gouveia^a, Tanira Alessandra Silveira Aguirre^b

^a Curso de Química Medicinal, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 90050-170, Porto Alegre, Brasil.

^b Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 90050-170, Porto Alegre, Brasil.

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF MICROEMULSIONS FOR TRANSDERMAL DELIVERY OF DONEPEZIL HYDROCHLORIDE. O cloridrato de donepezila é um fármaco utilizado para a doença de Alzheimer e com possível aplicação para o tratamento da hipertensão o qual possui um amargor elevado desagradável e efeitos adversos gastrointestinais, o que dificulta na adesão dos pacientes ao tratamento pela via oral. As microemulsões são sistemas nanoestruturados que possuem a versatilidade de serem aplicadas nas mais variadas vias de administração. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e caracterização de microemulsões para a entrega transdérmica de cloridrato de donepezila (DONE). A composição da formulação foi investigada por diagramas pseudoternários obtendo uma microemulsão água em óleo (A/O) na composição mássica: óleo de babaçu (17,8%), TCM (26,2%), água (10%), Span[®] 83 (29,7%), Tween[®] 80 (7,1%) e Transcutol[®] HP (9,2%). Esta foi caracterizada por pH, condutividade, teor de fármaco, tamanho de gotícula e índice de polidispersão resultando em $7,80 \pm 0,19$; $1,0 \mu\text{S cm}^{-1} \pm 0,1$; $0,54 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0,05$; $22,64 \text{ nm} \pm 0,49$; $0,093 \pm 0,045$; respectivamente. A cinética de saída do fármaco foi investigada através de ensaios de permeação e liberação. Os resultados corroboram que o sistema desenvolvido é uma microemulsão A/O com o potencial de controlar a liberação do DONE para possível administração pela via transdérmica.

Palavras-chave: microemulsão; cloridrato de donepezila; CLAE; óleo de babaçu

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é um problema que atinge muitas pessoas ao redor do mundo, é caracterizada quando o indivíduo possui uma pressão arterial acima de 140/90 mmHg.^{1,2} Ela é uma doença cardiovascular e um fator de risco para outras doenças como por exemplo: infarto, insuficiência renal, aterosclerose, doença de Alzheimer e outras.³ Esta patologia está associada a um desequilíbrio na modulação do sistema nervoso autônomo, através de uma hiperativação simpática.⁴

O cloridrato de donepezila (DONE) é uma substância amplamente empregada para o tratamento da doença de Alzheimer⁵ e possui alguns indícios que pode atuar na regulação da

hipertensão arterial.⁶ Esse fármaco é um inibidor da acetilcolinesterase, levando a um aumento do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica, induzindo uma modulação parassimpática^{6,7} o que é benéfico para a regulação cardíaca.⁸ O DONE tem a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica⁶ e alguns estudos *in vivo* mostram os efeitos benéficos deste fármaco na remodelação cardíaca, hemodinâmica⁸ e na prevenção de insuficiência cardíaca.⁹ Existem produtos para administração da donepezila pela via oral no Brasil¹⁰ e também pela via transdérmica (ADLARITY®) aprovado nos Estados Unidos.¹¹ Além disso, existem pesquisas para outras vias de administração para a donepezila como a intranasal por exemplo.¹² Porém para a administração por via oral, geralmente a via mais comum, a DONE possui algumas desvantagens devido ao sabor amargo elevado e efeitos gastrointestinais indesejados, como náusea e vômito,^{13,14} o que torna interessante a busca por outras vias de administração para este fármaco com o objetivo de contornar estes problemas.

Uma via interessante é a via transdérmica de administração que tem como principal objetivo administrar moléculas de maneira sistêmica e não invasiva. Esta via de administração evita o metabolismo de primeira passagem das moléculas, aumenta a biodisponibilidade e torna o nível plasmático dos fármacos uniforme, além de reduzir a dosagem do medicamento.¹⁵ A via transdérmica evita o trato gastrointestinal, sendo assim uma alternativa interessante para a administração do DONE. A nanotecnologia é um ramo da ciência em que são estudadas e desenvolvidas diversas formas farmacêuticas em nanoescala como lipossomas,¹⁶ nanocápsulas,¹⁷ nanopartículas,^{18,19} nanoemulsões,²⁰ microemulsões²¹⁻²⁴ entre outras; com o objetivo de aprimorar a entrega de moléculas, aumentando sua biodisponibilidade, eficácia, e podendo proporcionar uma liberação controlada dos fármacos. Dentre as formulações citadas as microemulsões são extremamente interessantes. Estas são capazes de se organizar de diferentes formas,^{25,26} podendo encapsular tanto moléculas hidrofílicas, como lipofílicas. Esses nanossistemas tem a característica de poderem ser aplicados a uma grande variedade de vias de administração.²⁶⁻³⁰ Microemulsões são sistemas auto-organizáveis que necessitam de baixa energia externa para sua formação, sendo facilmente escalonáveis para produção em larga escala.³¹ Khunt e colaboradores incorporaram o fármaco DONE a microemulsões óleo em água (O/A) com o intuito de administrar o DONE pela via intranasal, analisando o efeito dos ácidos graxos ômega-3 e um óleo de manteiga de origem animal na permeação do fármaco.³² Os resultados mostraram um efeito positivo das microemulsões no aspecto de entrega do DONE em ensaios *in vivo*, em que a formulação desenvolvida aumenta significativamente a

biodisponibilidade do fármaco no cérebro, mostrando a capacidade deste sistema em entregar moléculas através da barreira hematoencefálica.³²

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar uma microemulsão capaz de incorporar o cloridrato de donepezila, promovendo uma liberação controlada para a via de administração transdérmica para possível tratamento da hipertensão arterial.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Os materiais utilizados para a formulação foram água ultrapura, óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*, Mundo dos Óleos, Brasil), triglicerídeos de cadeia média (TCM) (ácidos cáprico e caprílico, Delaware, Brasil), sesquioleato de sorbitano (Span[®] 83, Sigma-Aldrich, Brasil), polisorbato 80 (Tween[®] 80, Sigma-Aldrich, Brasil), 2-(2-etoxietoxi) etanol (Transcutol[®] HP, Gatefossé, França) e cloridrato de donepezila (*Donepezil Hydrochloride*, Ambeed, USA).

Preparo das microemulsões

Para o preparo das microemulsões foram inicialmente preparados um mix de tensoativo (Tween[®] 80 : Span[®] 83 : Transcutol - 1,5 : 6,5 : 2) e um mix de óleos (óleo de babaçu : TCM – 4 : 6), ambos possuindo um equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) próximo à 6. Foram preparados dois diagramas pseudoternários utilizando como vértices o tensoativo mix, o óleo mix e a água. Cada uma dessas amostras foi feita pela metodologia de combinação sistemática de reagentes para um total de 1 grama de formulação.

Uma formulação branca foi preparada em triplicata com a composição da microemulsão otimizada. A formulação contendo o fármaco cloridrato de donepezila foi preparada em triplicata utilizando uma solução de 5 mg mL⁻¹ do fármaco em água ultrapura como fase aquosa na mesma composição da microemulsão otimizada.

Caracterização físico-química das microemulsões

Condutividade e pH

O pH aparente de todas as formulações branca e com fármaco foi medido diretamente nas microemulsões (pHmetro modelo 86505, AZ Instrument Corp.). O instrumento foi calibrado usando soluções padrão de pH 4,0; 7,0 e 10,0.

A condutividade das formulações foi medida diretamente nas microemulsões utilizando o mesmo equipamento previamente calibrado para a medida. A faixa utilizada para a leitura foi de 0 a 199,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Tamanho de Gotícula e índice de polidispersão

O tamanho de gotícula e o índice de polidispersão foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As microemulsões brancas e com o fármaco foram adicionadas às cubetas específicas sem diluição e equilibradas no equipamento a 36°C por 120 min, as leituras foram realizadas a essa mesma temperatura.

Desenvolvimento do método analítico

O método analítico para a análise do cloridrato de donepezila foi desenvolvido em cromatografia líquida de alta eficiência por arranjos de diodos (HPLC-DAD). O método analítico de fase reversa (Tabela 3) é isocrático, utiliza uma coluna C-18 (150 x 4,6 x 5 μm) como fase estacionária e tampão fosfato pH 2 : acetonitrila (71:29) como fases móveis, o comprimento de onda para análise é 268 nm e o tempo de retenção do analito (DONE) é 4,57 min.

O método foi validado em termos de especificidade, linearidade, precisão e exatidão. Para a especificidade uma amostra de formulação branca foi preparada na mesma diluição do ponto médio da curva e analisada no método. Para a linearidade foi realizado uma curva de calibração com seis pontos: 0,1; 0,5; 1; 5; 7,5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fármaco em água ultrapura,

amostras da curva foram feitas com um $n=5$. Para a precisão foram feitas sete diluições do ponto médio ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), analisadas no dia e 24 h depois, a fim de avaliar a precisão inter-dia. Para a exatidão do método, foi realizado diluições, combinadas com microemulsão branca na mesma proporção da formulação otimizada, nos pontos 0,25; 0,5; 5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n=3$), avaliando a exatidão em pontos: muito baixo ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$), baixo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), médio ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alto ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). A extração utilizou uma solução metanol : água (50 : 50) como diluente sendo extraídas por dois minutos no vórtex.

Estudo da cinética de liberação do Cloridrato de Donepezila

Para elucidar a cinética de saída do DONE de dentro da microemulsão desenvolvida, foram realizados dois ensaios *in vitro*: permeação e liberação.

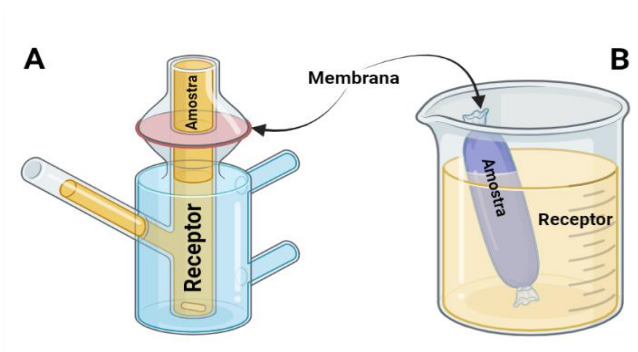


Figura 1. Esquema utilizados nos ensaios *in vitro*: A - Célula de Franz; B – Copo de Békier para diálise

Ensaio de Liberação

O ensaio de liberação proporciona uma difusão multidimensional das partículas. Estes ensaios foram realizados pelo método de diálise (Figura 1B) adicionando-se 1 mL de formulação ou grupo controle dentro da membrana de celulose modificada (*cut-off* 14 kDa, Sigma-Aldrich) e então o saco de diálise foi colocado em 55 mL de tampão pH 7,2. Os ensaios de foram realizados para cada formulação, realizando coletas periódicas de 0,5; 1; 2; 3; 4; 7; 24; 30; 48 e 72 h, para o ensaio com a formulação. Para o ensaio com grupo controle as coletas periódicas foram: 0,083; 0,167; 0,250; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 24; 30 e 48 h.

Ensaio de permeação

Diferentemente da liberação em saco de diálise, o ensaio de permeação proporciona uma difusão unidimensional das partículas. O ensaio de permeação foi realizado em células de Franz (figura 1A) a fim de simular a via transdérmica de administração. Primeiramente nestes ensaios de permeação foram testados 4 diferentes meios de liberação (n=1): tampão pH 6,8; tampão pH 7,2; solução aquosa 0,5% Tween[®] 80 e água ultrapura, realizando coletas periódicas até 19 h, utilizando uma solução controle de cloridrato de donepezila 0,5 mg/mL. Em seguida, uma alíquota de 0,2 mg (pesado por diferença) de microemulsão com cloridrato de donepezila foi adicionada na parte superior de cada célula que foi montada com membrana de celulose modificada (*cut-off* 14 kDa, Sigma-Aldrich). Esse ensaio foi realizado em quadruplicata (n=4) no meio de liberação tampão pH 7,2 e realizando coletas periódicas de 0,5; 1; 2; 3; 4; 7; 24; 30; 48 e 70 h de ensaio. O ensaio com o grupo controle (n=4) foi realizado utilizando o mesmo meio de liberação (tampão pH 7,2), fazendo coletas periódicas: 0,083; 0,167; 0,250; 0,5; 1; 2; 3 e 4 horas.

Análises estatísticas

Os resultados dos dados obtidos para a caracterização físico-química das microemulsões e também dos ensaios de diálise foram analisados no Microsoft Excel (2019). A comparação entre as médias dos grupos foi realizada pelo teste *t* student não pareado bicaudal. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Preparo das microemulsões

Mix de tensoativos e óleos

O equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) é uma propriedade das moléculas a qual mostra a afinidade que uma molécula anfifílica possui com as fases polar e apolar de um sistema.

Segundo a literatura, a formação de uma microemulsão água em óleo (A/O), é favorecida quando temos um valor de EHL baixo, próximo à 6.³³ Então para o obtermos a microemulsão A/O almejada, seguimos o valor de EHL indicado para preparar um mix de tensoativos e um mix de óleos, ambos como EHL próximo à 6. Para o mix de tensoativo usamos um tensoativo com o EHL mais alto e maior afinidade pela fase polar (Tween[®] 80), um com o EHL mais baixo e maior afinidade pela fase apolar (Span[®] 83) e um co-tensoativo (Transcutol[®] HP), obtendo a proporção 1,5 : 6,5 : 2 respectivamente. Já para o mix de óleos, foi combinado o óleo de babaçu com triglicerídeos de cadeia média (TCM) na proporção de 4 : 6 respectivamente. O equilíbrio hidrofílico-lipofílico não é o único parâmetro que vai influenciar na formação da microemulsão,²³ mas é um ótimo guia, obtendo bons resultados experimentais.

Diagramas pseudoternários

Foram construídos diagramas pseudoternários com o objetivo de investigar a melhor composição do sistema para a formação de uma microemulsão A/O. Os vértices destes diagramas são água, mix de óleos e mix de tensoativos. As microemulsões são sistemas que tem a característica de ser opticamente translúcidas, o que torna a investigação experimental de sua composição facilitada, pois é possível identificar visualmente a formação deste sistema.³³ No primeiro diagrama (Figura 2 - Diagrama A) 36 amostras foram preparadas, variando de 10 em 10 % a concentração dos componentes dos vértices, e classificando-as por sua aparência visual em diferentes sistemas emulsionados: suspensão, emulsão clara, emulsão líquida, emulsão sólida e microemulsão. Através destas amostras, observou-se indícios de uma região promissora a formar microemulsões, localizada próxima à amostra 5A (região demarcada no Diagrama A). Então um segundo diagrama (Figura 2 - Diagrama B) teve como objetivo investigar melhor essa região delimitada, em que mais 40 amostras foram preparadas dentro desta região: entre 8 a 14% de água, 30 a 50% de óleo mix e 40 a 60% de tensoativo mix. Dentre as amostras realizadas, duas delas se destacaram como boas microemulsões, a amostra 3B (8% água 46% de óleo mix e 46% de tensoativo mix) e 14B (10% água, 44%, de óleo mix e 46% de tensoativo mix). Essas foram submetidas a um teste de estabilidade visual durante 10 dias, aonde a amostra 14B se demonstrou mais estável e, portanto, foi selecionada para a continuação dos estudos. A composição da microemulsão 14B está na Tabela 1.

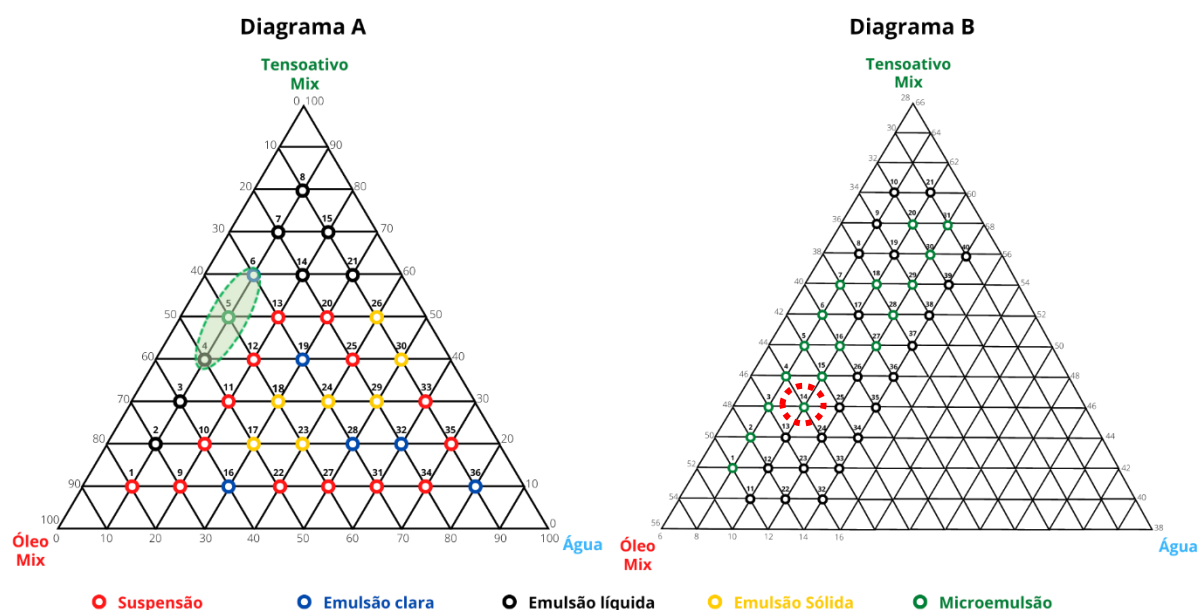


Figura 2. Diagramas pseudoternários

Incorporação do cloridrato de donepezila à microemulsão otimizada

Segundo a plataforma de predição SwissADME o DONE, é classificado de pouco a moderadamente solúvel em água. A solubilidade máxima que conseguimos obter foi de 6 mg mL⁻¹. Uma microemulsão A/O contendo óleo de babaçu foi otimizada conforme concentrações mostradas na Tabela 1. Uma solução de 5 mg mL⁻¹ de DONE preparada em água ultrapura foi utilizada como fase aquosa para a produção da formulação, obtendo com sucesso a microemulsão sem alterações significativas na estabilidade da formulação em termos visuais comparando-se com a branca (sem fármaco). A concentração teórica de fármaco na microemulsão é de 0,5 mg de fármaco por grama de formulação.



Figura 2. Microemulsões branca à esquerda (indicadas com B1, B2 e B3) e microemulsões-DONE à direita (indicadas com DONE 1, DONE 2 e DONE 3)

Tabela 1. Composição da microemulsão desenvolvida e otimizada

Composição da microemulsão	
Componentes	Percentual (m/m %)
Óleo de babaçu	17,8
TCM	26,2
Água/DONE	10
Span [®] 83	29,7
Tween [®] 80	7,1
Transcutol [®] HP	9,2

Caracterizações físico-químicas

As formulações, branca e com DONE, foram submetidas a uma série de caracterizações físico-químicas, com o objetivo de caracterizar o sistema e comprovar que é efetivamente uma microemulsão. Os resultados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterizações físico-químicas das microemulsões

Caracterizações							
	pH aparente*	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)***	Teor (mg mL^{-1})	Tamanho de gotícula (nm)***	Índice de polidispersão	Liberção em 24 horas (%)***	Permeação em 24 horas (%)
Microemulsão -Branca	7,49 $\pm$ 0,01	1,8 $\pm$ 0,1	-	27,91 $\pm$ 0,73	0,069 $\pm$ 0,041	-	-
Microemulsão -DONE	7,80 $\pm$ 0,19	1,0 $\pm$ 0,1	0,54 $\pm$ 0,05	22,64 $\pm$ 0,49	0,093 $\pm$ 0,045	13,5 $\pm$ 1,9	8,2 $\pm$ 1,6

Diferenças entre as médias foram analisadas por teste *t*-student e estão marcadas com * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

A microemulsão branca, assim como a microemulsão-DONE, apresentaram um valor de pH aparente neutro, próximo de 7, sendo que a microemulsão-DONE é ligeiramente mais básica ($p < 0,05$). A condutividade das formulações se apresentou com valores de $1,8 \pm 0,1$ e $1,0 \pm 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ para a microemulsão branca e com fármaco respectivamente ($p < 0,001$). Ambas estando dentro da faixa de condutividade esperada para microemulsões A/O, em que a fase externa é composta majoritariamente por óleos e tensoativos.³³

O tamanho de gotícula esperado para as microemulsões é geralmente entre 10 e 100 nm.³³ O tamanho de gotícula da microemulsão branca e da microemulsão-DONE é $27,91 \text{ nm} \pm$

0,73 e 22,64 nm $\pm$ 0,49 respectivamente ($p < 0,001$), o que corrobora que o sistema desenvolvido é uma microemulsão. O índice de polidispersão obtido nas análises indica que a distribuição das gotículas na formulação é homogênea e não apresentou diferença estatística das médias entre as amostras com e sem DONE.

Método analítico para quantificação do DONE

A Farmacopéia Brasileira não possui um método de análise descrito para a quantificação do DONE, então o método foi desenvolvido em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com base em alguns artigos científicos encontrados na literatura.³⁴⁻³⁶ Após alguns testes, foi possível otimizar e desenvolver um método analítico isocrático, simples e rápido (Tabela 3), além de sensível ao DONE encapsulado nas microemulsões. O método se demonstrou linear na faixa de 0,1 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com um coeficiente de correlação linear (r^2) de 0,9991. Este método de análise também mostrou uma excelente precisão, obtendo um coeficiente de variância de 4,1 % entre amostras e um coeficiente de variância de 1,2 % inter-dia. A especificidade deste método foi verificada com uma amostra de microemulsão branca, aonde nenhum componente da formulação absorveu no tempo de retenção do DONE (Figura 3), mostrando que o método é específico.

Tabela 3. Parâmetros do método de análise do DONE no CLAE desenvolvido e validado

Método analítico - cloridrato de donepezila	
Modo	Isocrático
Fase estacionária	150 x 4,6 x 5 μm (C-18)
Fases Móveis	Tampão Fosfato pH 2 – 71% Acetonitrila – 29%
Comprimento de onda	268 nm
Tempo de retenção	4,57 min
Tempo total	8 min
Temperatura Coluna	33°C
Volume de Injeção	25 μL
Fluxo	1 mL min ⁻¹

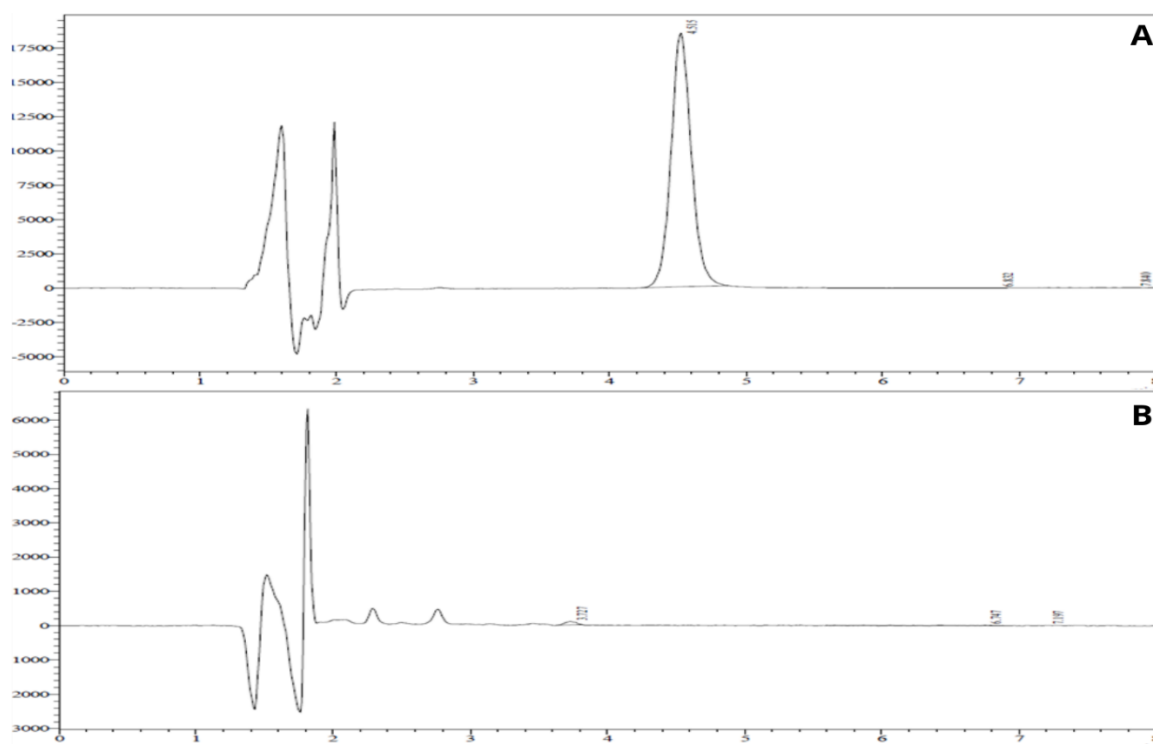


Figura 3. Cromatograma do método analítico desenvolvido. A- Cromatograma do DONE, B- Cromatograma da microemulsão otimizada branca

Quanto à exatidão do método, primeiramente foram realizadas 3 diluições, baixa ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), média ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alta ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Porém, após uma exaustiva extração, não foi possível chegar a um valor aceitável, então uma quarta diluição, denominada muito baixa ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi realizada, chegando então a um valor de $0,27 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 0,02$ de DONE recuperada da matriz de microemulsão apresentando um erro relativo igual a $8,69\% \pm 4,2$, sendo então um valor aceitável, o que torna o método analítico exato para concentrações muito baixas. Assim, as análises de teor das microemulsões foram realizadas nessa faixa de concentração denominada muito baixa.

Estudo da cinética de liberação e permeação do cloridrato de donepezila a partir das microemulsões

Um ensaio piloto para avaliar os diferentes meios de liberação foram realizados utilizando inicialmente água ultrapura, porém nas análises destas amostras, não foi possível

identificar nenhum pico no tempo de retenção do DONE. Isto pode ter acontecido pelo fato do DONE ter uma grande afinidade com a porção lipofílica ($\log P$ 3,56), ficando retido na parte oleosa da formulação, 44% em massa de sua composição. Então meios de liberação diferentes foram avaliados e o que apresentou um melhor resultado neste ensaio foi o tampão fosfato pH 7,2, em que se observou uma liberação maior de fármaco, sendo este escolhido como meio de liberação para os testes posteriores.

O perfil de liberação do DONE da formulação está mostrado na Figura 4. Através deste ensaio é possível verificar a liberação controlada do fármaco propiciada pela formulação diferentemente do controle ($p < 0,001$). Após 1 h de ensaio o grupo controle já alcança $92 \% \pm 15,49$ liberado, enquanto após 72 h de ensaio a microemulsão liberou $19,67 \% \pm 2,75$ do fármaco encapsulado. Ao decorrer do tempo, o percentual do fármaco é sempre crescente, ou seja, ele está sendo liberado da formulação, o que pode indicar uma liberação completa do DONE em um tempo maior, sendo uma característica interessante para a administração transdérmica, que influenciaria no número de aplicações ampliando o intervalo entre as dosagens.

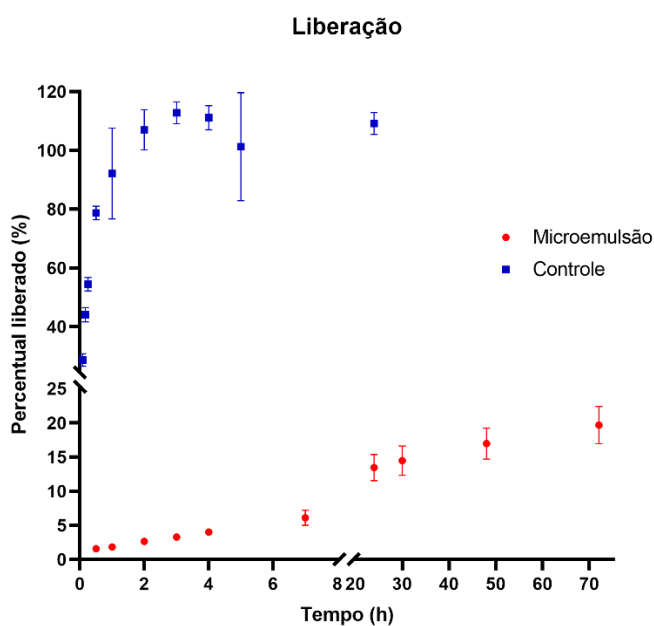


Figura 4. Ensaio de liberação realizado em saco de diálise com tampão pH 7,2 no meio receptor de uma solução aquosa de DONE (controle) e da microemulsão contendo DONE. Dados representam média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$)

O perfil de permeação do DONE da formulação está mostrado na Figura 5. É evidente o controle que a formulação desenvolvida exerce sobre a passagem do DONE a partir da matriz de microemulsão para o meio receptor atravessando a membrana de celulose que simula a pele. Quando comparamos os resultados do grupo controle à microemulsão observamos dois perfis totalmente distintos. No grupo controle, todo o fármaco é liberado em poucas horas de ensaio e, quando este está encapsulado pela microemulsão, a permeação é extremamente mais lenta, sendo que após 30 h de ensaio alcança $10,57 \% \pm 1,98$ do fármaco liberado. Além disso, podemos observar que a formulação provoca uma redução da variação na quantidade de fármaco permeado (reduzido desvio padrão), isso pode sugerir que a administração transdérmica do DONE encapsulado na microemulsão estudada, poderia apresentar baixa variação inter-paciente. Esta propriedade também foi observada em uma microemulsão comercial, o Neoral[®], através de um *clinical trial*, em que se obteve uma grande melhora na linearidade da dosagem e no perfil farmacocinético, entre pacientes, de ciclosporina A quando encapsulada na microemulsão (Neoral[®]), comparada à formulação original Sandimmune[®].³⁷

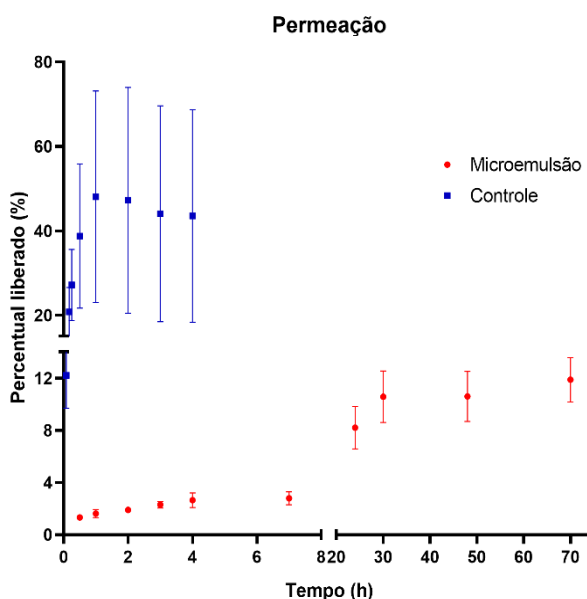


Figura 5. Ensaio de permeação realizado em célula de difusão de Franz com tampão pH 7,2 no meio receptor de uma solução aquosa de DONE (controle) e da microemulsão contendo DONE. Dados representam média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$)

Ambos os ensaios, permeação e liberação, não resultaram em uma liberação completa do fármaco no meio. Isto pode ter ocorrido devido ao fato de a formulação desenvolvida ser fisicamente bastante viscosa, não apresentando um transporte de massa facilitado. Então a

difusão do fármaco presente na parte da amostra que não está diretamente em contato com a membrana acaba sendo dificultada, pois não entra em contato com o meio receptor, prejudicando a saída do fármaco. Outro fator que pode estar dificultando a liberação do fármaco encapsulado é a afinidade lipofílica ($\log P$ 3,56) do DONE e uma solubilidade em água reduzida, tornando não muito favorável a migração do fármaco para o meio de liberação.

Diversos estudos mostram que as microemulsões têm a capacidade de aumentar a permeação/liberação de um fármaco, porém isso depende de diversos fatores como a composição, organização e propriedades físico-químicas do sistema. Microemulsões do tipo O/A, mostram que a quantidade de fase aquosa presente no sistema tem a capacidade de influenciar sobre a liberação do fármaco da formulação,³⁸ onde observa-se uma maior liberação de fármaco em menos tempo.^{32,39} A permeação do fármaco encapsulado também está relacionada à viscosidade da formulação, em que de uma maneira geral, quando as formulações possuem elevada viscosidade a permeação do fármaco diminui, porém isto acaba variando muito de formulação para formulação.³⁸ Outro fator com grande influência na permeação do fármaco da formulação é a composição do sistema, dependendo do componente pode-se obter uma aprimoração ou um decréscimo na permeação do fármaco,³⁸ estando relacionado com a capacidade desses sistemas em incorporar promotores de absorção em sua composição.⁴⁰⁻⁴²

O ADLARITY® é um novo medicamento aprovado recentemente em 2022 nos EUA, que administra o DONE pela via transdérmica, para o tratamento da doença de Alzheimer.¹¹ Este medicamento é composto pelo DONE disperso em uma matriz em uma nova tecnologia chamada Corplex™, desenvolvido pela empresa Corium, Inc, que é um adesivo de matriz polimérica inovador, de ação rápida e com perfil de longa duração. A existência de um medicamento aprovado pelo FDA, como o ADLARITY®, é de extrema importância pois mostra a viabilidade de administração transdérmica do cloridrato de donepezila.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento de uma microemulsão A/O foi otimizada com sucesso sendo possível a incorporação do fármaco cloridrato de donepezila, sem alterar significativamente a estabilidade e as propriedades físico-químicas quando comparada à formulação branca. A formulação desenvolvida obteve uma baixa condutividade o que corrobora que a organização

do sistema é do tipo água em óleo. O tamanho de gotícula está dentro da faixa característica de microemulsão, comprovando a formação deste sistema. Um método de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado em termos de especificidade, linearidade, precisão e exatidão, esse último para uma faixa específica de concentração de DONE. Os ensaios *in vitro* da cinética de liberação/permeação do fármaco, mostraram que a formulação desenvolvida controla a saída do DONE para o meio receptor, sendo possível uma liberação gradual e contínua do fármaco necessária para a via transdérmica de administração pretendida nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Silverthorn, D. U.; *Fisiologia Humana*; Techbooks, Ed.; 7th ed.; 2016.
2. Forouzanfar, M. H.; Afshin, A.; Alexander, L. T.; *The Lancet* **2016**, 388, 1659.
3. Noncommunicable diseases <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (accessed Dec 16, 2021).
4. Grassi, G.; Mancia, G.; *Hyperadrenergic and Labile Hypertension*; First Edit.; Elsevier Inc., 2007.
5. Mohsin, N. U. A.; Ahmad, M.; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2020**, 56, 1.
6. Lataro, R. M.; Silva, C. A. A.; Tefé-Silva, C.; Prado, C. M.; Salgado, H. C.; *American Journal of Hypertension* **2015**, 28, 1201.
7. SANTANA, J. B.; INFLUÊNCIA DA NEUROMODULAÇÃO PARASSIMPÁTICA DURANTE A INDUÇÃO DA PERIODONTITE EM CAMUNDONGOS. Dissertação, UNESP: São José dos Campos, 2016.
8. Okazaki, Y.; Zheng, C.; Li, M.; Sugimachi, M.; *Journal of Physiological Sciences* **2010**, 60, 67.
9. Handa, T.; Katare, R. G.; Kakinuma, Y.; Arikawa, M.; Ando, M.; Sasaguri, S.; Yamasaki, F.; Sato, T.; *Journal of Cardiac Failure* **2009**, 15, 805.
10. CMED; *CÂMARA DE REGULAÇÃO DO MERCADO DE MEDICAMENTOS SECRETARIA-EXECUTIVA *VERSÃO CONSOLIDADA**; 2017.
11. FDA; *JUNE 2022-APPROVED DRUG PRODUCT LIST APPENDIX A-PRODUCT NAME INDEX*; 2022.
12. Espinoza, L. C.; Silva-Abreu, M.; Clares, B.; Rodríguez-Lagunas, M. J.; Halbaut, L.; Cañas, M. A.; Calpena, A. C.; *Pharmaceutics* **2019**, 11.
13. Zhao, Z. Q.; Chen, B. Z.; Zhang, X. P.; Zheng, H.; Guo, X. D.; *Molecular Pharmaceutics* **2021**, 18, 2482.

14. Sutthapitaksakul, L.; Dass, C. R.; Sriamornsak, P.; *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2021**, 63, 102549.
15. Yang, R.; Wei, T.; Goldberg, H.; Wang, W.; Cullion, K.; Kohane, D. S.; *Advanced Materials* **2017**, 29, 1.
16. Zhang, Y.; Huang, L.; In *Nanoparticles for Biomedical Applications*; Elsevier, 2020; pp. 145–152.
17. Yingngam, B.; Chiangsom, A.; Pharikarn, P.; Vonganakasame, K.; Kanoknitthiran, V.; Rungseewijitprapa, W.; Prasitpuriprecha, C.; *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2019**, 53, 101138.
18. Carvalho, P. M.; Felício, M. R.; Santos, N. C.; Gonçalves, S.; Domingues, M. M.; *Frontiers in Chemistry* **2018**, 6, 1.
19. Sedyakina, N. E.; Feldman, N. B.; Gudkova, O. I.; Rozofarov, A. L.; Kuryakov, V. N.; Lutsenko, S. v.; *Mendeleev Communications* **2021**, 31, 312.
20. Rodrigues, E. da C. R.; Ferreira, A. M.; Vilhena, J. C. E.; de Almeida, F. B.; Cruz, R. A. S.; Rodríguez Amado, J. R.; Florentino, A. C.; Carvalho, J. C. T.; Fernandes, C. P.; *Latin American Journal of Pharmacy* **2015**, 34, 338.
21. Pavoni, L.; Perinelli, D. R.; Bonacucina, G.; Cespi, M.; Palmieri, G. F.; *Nanomaterials* **2020**, 10.
22. Ohadi, M.; Shahravan, A.; Dehghannoudeh, N.; Eslaminejad, T.; Banat, I. M.; Dehghannoudeh, G.; *Drug Design, Development and Therapy* **2020**, 14, 541.
23. Damasceno, B. P. G. L.; Silva, J. A.; Oliveira, E. E.; Silveira, W. L. L.; Araújo, I. B.; Oliveira, A. G.; Egito, E. S. T.; *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada* **2011**, 32, 9.
24. Lawrence, M. J.; Rees, G. D.; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 175.
25. Zhang, J.; Liu, P. D.; Yan, L. L.; Chen, Z. J.; Huan, H. F.; Li, X. Y.; Dong, R. S.; Chen, J.; *International Journal of Food Properties* **2021**, 24, 764.
26. Bachhav, Y. G.; Patravale, V. B.; *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, 365, 175.
27. Mishra, R.; Prabhavalkar, K. S.; Bhatt, L. K.; *Journal of Liposome Research* **2016**, 26, 297.
28. Scamoroscenco, C.; Teodorescu, M.; Raducan, A.; Stan, M.; Voicu, S. N.; Trica, B.; Ninciuleanu, C. M.; Nistor, C. L.; Mihaescu, C. I.; Petcu, C.; Cinteza, L. O.; *Pharmaceutics* **2021**, 13.
29. Shen, J.; Zhu, Y.; Zhou, B.; Kong, L.; Jin, Y.; Zhang, D.; Cao, Z.; Ji, J.; Li, J.; *Arch Pharm (Weinheim)* **2021**, 354, 1.
30. Hegde, R. R.; Verma, A.; Ghosh, A.; *ISRN Pharmaceutics* **2013**, 2013, 1.
31. da Silva, J. D. F.; da Silva, Y. P.; Piatnicki, C. M. S.; Böckel, W. J.; Mendonça, C. R. B.; *Quimica Nova* **2015**, 38, 1196.
32. Khunt, D.; Shrivasa, M.; Polaka, S.; Gondaliya, P.; Misra, M.; *AAPS PharmSciTech* **2020**, 21.

33. Tartaro, G.; Mateos, H.; Schirone, D.; Angelico, R.; Palazzo, G.; Microemulsion microstructure(s): A tutorial review. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1–40.
34. Bulduk, İ.; Aydın, B. S.; *Journal of Chemical Metrology* **2020**, *14*, 69.
35. Ragab, G. H.; Bahgat, E. A.; *Annales Pharmaceutiques Francaises* **2019**, *77*, 112.
36. Ruela, A. L. M.; Santos, M. G.; Figueiredo, E. C.; Pereira, G. R.; *J Braz Chem Soc* **2014**, *25*, 2094.
37. Ritschel WA; *Clinical Transplantation* **1996**, *10*, 364.
38. Lopes, L. B.; Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics* **2014**, *6*, 52–77.
39. Erdal, M. S.; Gürbüz, A.; Birteksöz Tan, S.; Güngör, S.; Özsoy, Y.; *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* **2020**, *17*, 43.
40. Hu, X.; Cheng, N.; Zhao, J.; Piao, X.; Yan, Y.; Zhang, Q.; Zhou, K.; Zhang, Y.; Feng, N.; *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2019**, *14*, 305.
41. Liu, X.; Xu, L.; Liu, X.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Kang, Q.; Liu, J.; Lan, H.; Yu, L.; Wu, Q.; *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2020**, *55*, 101309.
42. Katdare, A.; Khunt, D.; Thakkar, S.; Polaka, S. N.; Misra, M.; *Drug Delivery and Translational Research* **2020**.