



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA – EFAR
TCC007 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



Maria Sílvia Gurgel Assis

**FORMULAÇÕES PARA INCORPORAÇÃO DE ACICLOVIR
BASEADAS EM MESOFASES LÍQUIDO-CRISTALINAS CONTENDO
QUITOSANA COMO AGENTE GELIFICANTE**

OURO PRETO

2022

Maria Silvia Gurgel Assis

**FORMULAÇÕES PARA INCORPORAÇÃO DE ACICLOVIR BASEADAS EM
MESOFASES LÍQUIDO-CRISTALINAS CONTENDO QUITOSANA COMO
AGENTE GELIFICANTE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao curso de Farmácia, da Universidade
Federal de Ouro Preto, pela disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso (FAR007).

Orientador: Prof. Dr. André Luís Morais
Ruela

OURO PRETO

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

A848f Assis, Maria Silvia Gurgel.

Formulações para incorporação de aciclovir baseadas em mesofases líquido-cristalinas contendo quitosana como agente gelificante.

[manuscrito] / Maria Silvia Gurgel Assis. Maria Silvia Assis. - 2022.

39 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ruela.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Herpesvírus. 2. Herpesvírus - Medicamentos. 3. Aciclovir. 4. Cristais líquidos. 5. Emulsões. 6. Reologia. I. Assis, Maria Silvia. II. Ruela, André Luís. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.523

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Silvia Gurgel Assis

Formulações para incorporação de aciclovir baseadas em mesofases líquido-cristalinas contendo quitosana como agente gelificante

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Aprovada em 17 de junho de 2022

Membros da banca

Doutor - André Luís Morais Ruela - Orientador (UFOP)
Doutor - Jacqueline de Souza - (UFOP)
Doutor - Raquel Silva Araújo - (UFOP)

André Luís Morais Ruela, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 20/06/2022



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Morais Ruela, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/06/2022, às 17:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0346470** e o código CRC **E45BEABA**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora por me permitirem a conclusão de mais uma etapa, parte de um grande sonho.

À minha família e amigos, que sempre me apoiaram e acreditaram no meu esforço para chegar até aqui.

À República Atena, que me acolheu em Ouro Preto e à todas moradoras que se fizeram dispostas a qualquer ajuda e apoio.

Gratidão à Universidade Federal de Ouro Preto, em especial, à Escola de Farmácia e todos os seus professores, pela contribuição em um melhor aprendizado e pelos ensinamentos que me fizeram crescer. Ao Laboratório de Controle de Qualidade da Escola de Farmácia, à Fapemig, CNPq, CAPES e CiPharma/UFOP por permitirem a realização do trabalho.

Agradeço meu orientador, Prof. Dr. André Luís Morais Ruela, pelos trabalhos publicados, pela paciência durante esses anos e principalmente pelos conhecimentos adquiridos durante todo o processo, que foram essenciais para o meu crescimento e evolução no curso de farmácia.

RESUMO

A baixa biodisponibilidade oral do aciclovir (~30%) é considerada um dos maiores problemas das formulações contendo o fármaco. O desenvolvimento de sistemas de liberação que aumentem sua absorção é uma importante estratégia para contornar esta situação. Neste trabalho, um sistema formado por uma fase oleosa (miristato de isopropila), fase aquosa (contendo co-tensoativo glicerina ou polietilenoglicol 400, PEG400) e tensoativo (polissorbato 80) foi selecionado após a construção de um diagrama de fases pseudoternário que indicou pontos sugestivos na forma de microemulsão ou cristal líquido. A quitosana é um biomaterial com propriedades mucoadesivas, que foi incorporado nas formulações a fim de alterar seu comportamento reológico, aumentando a viscosidade aparente da preparação. Isto se associa com aumento no tempo de contato do sistema de liberação com mucosas. A incorporação do aciclovir nestas formulações resultou em suspensões farmacêuticas, tendo em vista que o fármaco não foi totalmente solubilizado no sistema. Esta estratégia trouxe maior estabilidade física ao sistema quando em contato com fluido gástrico simulado (FGSSE), e refletiu em maior valor de potencial zeta. Os resultados foram positivos e permitiram explorar novas formulações para incorporação do aciclovir, que ainda serão otimizadas em estudos futuros. Além disso, posteriormente, espera-se conduzir ensaios *in vitro* (para avaliar a liberação prolongada do fármaco a partir dos cristais líquidos) e ensaios *in vivo* em modelos animais, tendo como foco buscar um aumento da biodisponibilidade oral do aciclovir.

Palavras chave: Aciclovir. Mesofase. Cristal líquido. Microemulsão. Quitosana. Reologia.

ABSTRACT

The low oral bioavailability of acyclovir (~30%) is considered one of the biggest problems with formulations containing the drug. The development of delivery systems that increase its absorption is an important strategy to overcome this situation. In this work, a system formed by an oil phase (isopropyl myristate), aqueous phase (containing co-surfactant glycerin or polyethylene glycol 400, PEG400) and surfactant (polysorbate 80) was selected after the construction of a pseudoternary phase diagram that indicated points suggestive in the form of microemulsion or liquid crystal. Chitosan is a biomaterial with mucoadhesive properties, which was incorporated into formulations in order to change its rheological behavior, increasing the apparent viscosity of the preparation. This is associated with an increase in the contact time of the delivery system with the mucosa. The incorporation of acyclovir in these formulations resulted in pharmaceutical suspensions, since the drug was not fully solubilized in the system. This strategy brought greater physical stability to the system when in contact with simulated gastric fluid (FGSSE), and reflected in a higher zeta potential value. The results were positive and made it possible to explore new formulations for incorporating acyclovir, which will still be optimized in future studies. In addition, later, it is expected to conduct in vitro assays (to evaluate the prolonged release of the drug from liquid crystals) and in vivo assays in animal models, with a focus on seeking an increase in the oral bioavailability of acyclovir.

Keywords: Acyclovir. Mesophase. Liquid crystal. Microemulsion. Chitosan. Rheology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivos específicos:	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. MATERIAL	10
3.2. MÉTODOS	10
3.2.1. Preparo de soluções e dispersão de quitosana	10
3.2.2. Metodologia analítica para determinação de aciclovir	11
3.2.3. Solubilidade do aciclovir nos componentes da formulação	11
3.2.4. Construção do diagrama de fases pseudo-ternário	11
3.2.5. Incorporação da quitosana nas mesofases líquido-cristalinas	13
3.2.6. Incorporação do aciclovir nas formulações selecionadas.....	13
3.2.7. Estudo da transição de fase dos sistemas selecionados	14
3.2.8. Teste de centrifugação, determinação do pH e transparência das microemulsões.....	14
3.2.9. Análise do potencial zeta, tamanho da gotícula e índice de polidispersão	15
3.2.10. Caracterização reológica das formulações selecionadas	15
3.2.11. Análise estatística dos resultados	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Metodologia analítica para determinação de aciclovir	17
4.2. Diagramas de fases pseudoternários	19
4.3. Sistemas selecionados após transição de fases	21
4.4. Formulações após a incorporação da quitosana	23
4.5. Estabilidade das formulações em contato com FGSSE	25
4.6. Incorporação do aciclovir nas formulações	26
4.7. Análise do potencial zeta, distribuição de tamanho de gotículas e índice de polidispersão	27
4.8. Caracterização reológica	30
5. CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

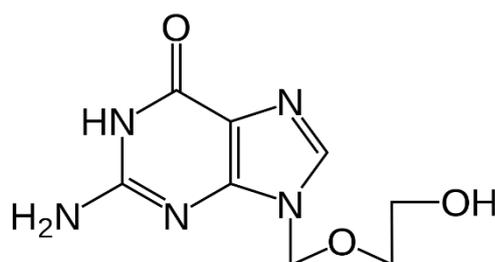
1. INTRODUÇÃO

Mesofases líquido-cristalinas são definidas como sistemas termodinamicamente estáveis formados a partir da dispersão de uma fase aquosa, fase oleosa e sistema tensoativo a temperatura ambiente. Diferentes tipos de sistemas podem resultar desta estratégia de desenvolvimento de formulações, como fases lamelares (baixa viscosidade), hexagonais e cúbicas (ambas de alta viscosidade) (FORMARIZ et al., 2005; MILAK; ZIMMER, 2015; MU; HOLM; MULLERTZ, 2013). Microemulsões são sistemas fluidos e termodinamicamente estáveis, e podem ser resultado da dispersão a baixo cisalhamento de óleo, água e tensoativo, assim como pode haver formação de emulsões grosseiras e sistemas instáveis com eventual separação de fases (CALLENDER et al., 2017; FORMARIZ et al., 2005; KARASULU, 2008; LAWRENCE; REES, 2000). Cristais líquidos e microemulsões são caracterizados quanto ao comportamento óptico perante a luz polarizada, sendo as microemulsões caracterizadas como sistemas isotrópicos (não desviam o plano da luz), enquanto os cristais líquidos são sistemas anisotrópicos (há desvio do plano da luz). Algumas vezes, microemulsões com alta fluidez podem sofrer transição de fase ao absorver água, formando cristais líquidos mais viscosos *in situ*, podendo conferir bioadesão às formulações (KARASULU, 2008; RUELA; CARVALHO; PEREIRA, 2016).

A quitina é um homopolímero linear constituído de unidades de N-acetilglicosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo -(1-4). É considerada o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo extraída do exoesqueleto de crustáceos como caranguejo e camarão. A desacetilação parcial da quitina produz a quitosana, quimicamente caracterizada como um copolímero de glicosamina e N-acetilglicosamina, em que as espécies monoméricas estão aleatoriamente distribuídas (ALSARRA et al., 2009; ALVAREZ-LORENZO et al., 2013; DUDHANI; KOSARAJU, 2010; PONGJANYAKUL et al., 2013; DANG et al., 2016). Entre as potenciais aplicações da quitosana, destacam-se os sistemas para liberação de fármacos (ALVAREZ-LORENZO et al., 2013; BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; CARAMELLA et al., 2015; DANG et al., 2016; HARTHI et al., 2019). A quitosana pode ser usada para preparar hidrogéis e sistemas particulados baseados em nanotecnologia, em que nanopartículas poliméricas são produzidas pela técnica de gelificação iônica. Outra característica notável deste biomaterial é a sua propriedade mucoadesiva, podendo aumentar o tempo de contato do sistema de liberação com mucosas (DUDHANI; KOSARAJU, 2010; SMART, 2005). Sendo assim, a associação da quitosana a mesofases líquido-cristalinas é uma estratégia interessante para obter formulações com potencial mucoadesivo.

O aciclovir ($C_8H_{11}N_5O_3$) (Figura 1) é um fármaco antiviral, análogo sintético do nucleotídeo guanosina, que se apresenta na forma de um pó branco ou quase branco. Apresenta uma potente atividade inibitória *in vitro* e *in vivo* contra os vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1), tipo 2 (HSV-2), e vírus varicela-zoster (VVZ). O aciclovir também é indicado para tratamento de meningite asséptica/ encefalite herpética causada por HSV-1 e HSV-2, sendo administrado por infusão endovenosa na dosagem de 10 mg/kg de 8/8 horas pelo período de 14 a 21 dias. Atua interrompendo a replicação do DNA viral, possuindo alta afinidade pela enzima timina quinase. Possui massa molecular 225,2 g/mol na forma de base livre e ponto de fusão com decomposição térmica em 255° C. É levemente solúvel em água, possui caráter alcalino, com pontos isoelétricos (pKa) de 2,27 e 9,25, referentes aos grupos amina terciária em sua estrutura química. A molécula do fármaco apresenta caráter hidrofílico, com coeficiente de partição octanol/ água (Log P) de -1.56 (BRIGDEN; SUMMARY, 1983; KENNEDY, 2005; KUBBINGA et al., 2015; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2009; PALLASCH; JOSEPH; GILL, 1984; RICHARDS et al., 1983). Está disponível comercialmente em formas farmacêuticas injetáveis (infusão endovenosa, 25 mg/mL), comprimidos para liberação imediata de uso oral (200 mg e 400 mg) e cremes de uso tópico 50 mg/g.

Figura 1. Estrutura química do aciclovir ($C_8H_{11}N_5O_3$; 225,21, 2-Amino-1,9-di-hidro-9-[(2-hidroxietoxi)metil]-6H-purin-6-ona [59277-89-3])



Fonte: Da autora.

Tendo em vista que, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, o aciclovir é classificado como um fármaco da classe III (altamente solúvel e pouco permeável), apresentando baixa biodisponibilidade após administração oral, em torno de 10% a 30%, se faz importante buscar estratégias que permitam o desenvolvimento de sistemas de liberação que aumentem sua absorção no trato gastrointestinal (KUBBINGA et al., 2015; MIRANDA; BLUM, 1983; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2009). Estes sistemas de liberação tornam-se ainda mais eficientes se contribuírem para aumentar a permeabilidade do fármaco,

modificarem sua cinética de liberação e apresentarem propriedades mucoadesivas, tendo em vista que os componentes das microemulsões, como óleos e tensoativos, podem aumentar a permeação do fármaco em determinada membrana (GHOSH et al., 2006; PATEL; SAWANT, 2007; BHALEKAR et al., 2014; DJEKIC et al., 2018; SAIFI et al., 2020). Desta forma, o desenvolvimento das formulações via oral com potencial mucoadesivo, dos tipos mesofases líquido-cristalinas e microemulsões é considerado promissor, tendo em vista que o comportamento de fase destes sistemas podem conferir bioadesão ao entrar em contato fluidos corporais, como o fluido gástrico, aumentando o tempo de resistência das formulações nas mucosas e melhorando, portanto, a absorção do fármaco (OLIVEIRA et al., 2021). Para isto, a construção de diagramas de fases pseudo-ternários, que indicam pontos sugestivos de microemulsões e cristais líquidos, são utilizados para a seleção e posterior incorporação de quitosana e de aciclovir, como formulações promissoras para aumentar biodisponibilidade do fármaco após a administração oral. Ademais, a construção destes diagramas se faz fundamental para a identificação do comportamento dos sistemas formados.

2. OBJETIVOS

Desenvolvimento e caracterização de mesofases líquido-cristalinas a partir da preparação de dispersões termodinamicamente estáveis e sua associação com quitosana como potenciais sistemas para administração oral de aciclovir.

2.1. Objetivos específicos:

- Desenvolver metodologia por espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-Vis) para determinação de aciclovir.;
- Avaliar a solubilidade do aciclovir em veículos oleosos, como potenciais fases oleosas para obtenção de mesofases líquido-cristalinas;
- Construir diagramas de fase pseudoternários e a partir deles selecionar potenciais formulações do tipo mesofases líquido-cristalinas;
- Avaliar a incorporação da quitosana de baixa massa molecular nos sistemas como um agente gelificante capaz de conferir propriedades mucoadesivas à formulação;
- Avaliar a incorporação de aciclovir nas formulações selecionadas;
- Caracterizar os sistemas quanto ao intumescimento, análise por microscopia de luz polarizada, perfil reológico e estabilidade física (pH e centrifugação).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Dentre os padrões, reagentes e solventes, foram utilizados: Acetonitrila grau cromatográfico; ácido metacrílico; ácido acético; ácido (orto) fosfórico; água ultrapura; fosfato de sódio dibásico P.A.; fosfato de sódio monobásico; hidróxido de sódio P.A.; metanol grau HPLC; quitosana de baixo peso molecular (Êxodo Científica); aciclovir padrão (Sigma-Aldrich. Envase/lote: P500254. Teor: 94,9% tal qual. Umidade: 4,7% determinada por Karl Fisher. Guanina: 0,3%. Impurezas: 0,4%); aciclovir matéria-prima (Fabricante: Zhejiang Zhe, Origem: China, Lote: 071103); veículos oleosos (miristato de isopropila e ácido oleico).

Os equipamentos e acessórios para a realização da pesquisa incluíam: Banho ultrassom; balança analítica; balança; espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis) (modelo AJX-6100PC Micronal, usando cubeta de quartzo 1 cm com caminho óptico 10 mm e volume 3,5 mL); estufa de secagem; medidor de pH; micropipetador automático 100-1000 μ L; microscópio de luz polarizada; reômetro DV-III do tipo cone e placa da marca Brookfield.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo de soluções e dispersão de quitosana

Para preparo da solução salina isotônica, dissolveu-se 0,85 g de cloreto de sódio em 100 mL de água ultrapura.

Para preparo do fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE), usou-se 7,0 mL de ácido clorídrico 37% P.A. e 2,0 g de cloreto de sódio diluídos em balão volumétrico de 1000 mL com água ultrapura. O pH determinado após homogeneização foi de aproximadamente 1,2.

Para preparo do tampão fosfato 0,025 mol.L⁻¹ pH 6,8 com salina 0,85%, dissolveu-se 3,53 g de fosfato de sódio dibásico, 2,99 g de fosfato de sódio monobásico, 0,85 g de cloreto de sódio em água ultrapura e completou-se o volume para 1000 mL com o mesmo solvente. O pH foi ajustado para 6,8, se necessário, usando ácido fosfórico ou solução de hidróxido de sódio.

A dispersão de quitosana a 5% foi preparada com base em estudo anterior, assim, usou-se 1,25 g de quitosana e adicionou 0,75 mL de ácido acético P.A. (3% de ácido acético),

completando o volume para 25 mL com água ultrapura. O pH determinado após homogeneização foi de aproximadamente 4,0 (OLIVEIRA et al., 2021).

3.2.2. Metodologia analítica para quantificação de aciclovir

A quantificação do aciclovir foi realizada por espectrofotometria na região do UV-Vis, selecionando o FGSSE como solvente, intervalo de concentrações de trabalho de 1 a 18 µg/mL e comprimento de onda de 256 nm. A validação do método foi avaliada quanto aos parâmetros linearidade e intervalo; exatidão; precisão intra e inter-dias; limite de detecção e quantificação; seletividade (interferências dos excipientes nos espectros de absorção, de 200 a 400 nm), conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 166/2017 da Anvisa. (OLIVEIRA et al., 2021).

3.2.3. Solubilidade do aciclovir nos componentes da formulação

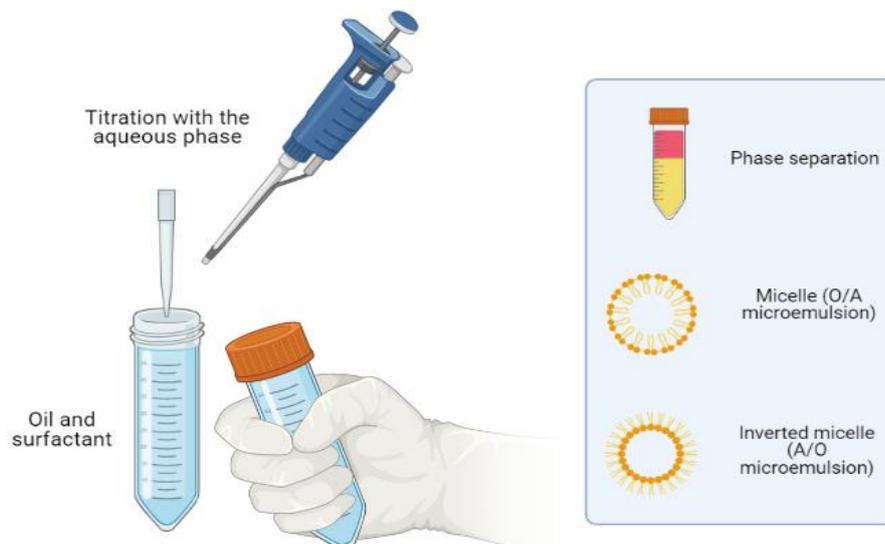
Após revisão bibliográfica em diferentes fontes científicas, a solubilidade do aciclovir nos componentes da formulação (óleo, fase aquosa, tensoativo e co-tensoativo) foi avaliada a partir da adição de quantidades conhecidas e variáveis do fármaco no veículo, que foi mantido em condição estática (tubo com tampa, contendo 2 mL do solvente e 200 mg do fármaco) a temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, o potencial de solubilização do aciclovir no veículo foi avaliado visualmente, ou quando possível, determinado usando o método espectrofotométrico no UV-Vis. Sendo assim, a seleção da fase oleosa a ser usada foi baseada na capacidade do veículo em solubilizar o fármaco.

3.2.4. Construção do diagrama de fases pseudo-ternário

O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para a incorporação do aciclovir foi realizado a partir da construção de diagramas de fases pseudo-ternários. Estes, foram obtidos por titulações com duas fases aquosas diferentes: Uma contendo o polietilenoglicol 400 (PEG 400) como co-solvente e outra que o co-solvente foi o glicerol (ou glicerina). Ambas fases aquosas continham 40% v/v do co-tensoativo e 60% v/v de ácido acético 0.5 mol/L. As fases

aquosas (titulante) foram tituladas em misturas previamente preparadas do tensoativo polissorbato 80 (Tween 80) misturado com a fase oleosa miristato de isopropila, em diferentes proporções, de 1:9 p/p a 9:1 p/p (analito), como exemplificado na Figura 2. Cada adição de fase aquosa foi realizada utilizando pipeta volumétrica em um intervalo de 5 minutos, com agitação suave, e posterior observação visual do sistema formado (OLIVEIRA et al., 2021).

Figura 2. Construção dos diagramas de fases por método titulométrico.



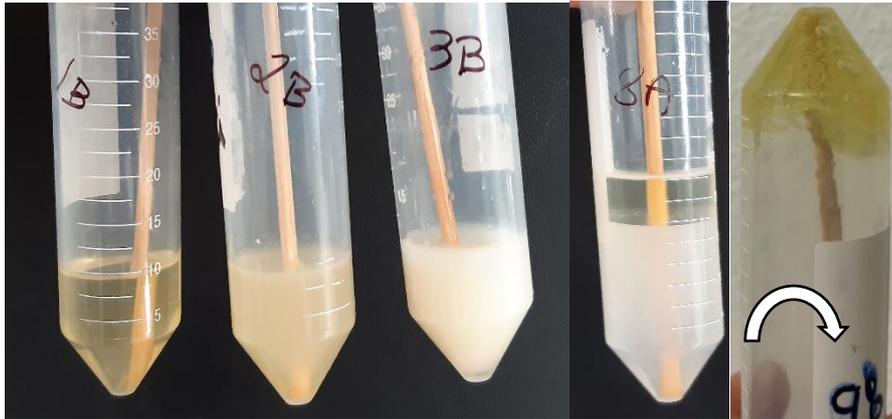
Fonte: Da autora.

Após a construção dos 2 diagramas de fases, foram selecionados e caracterizados alguns pontos/sistemas, potencialmente do tipo microemulsões e/ou cristais líquidos. Para a construção dos diagramas, os sistemas foram identificados visualmente e caracterizados por observação visual, conforme critérios mostrados na Tabela 1 e Figura 3.

Tabela 1. Característica dos diferentes tipos de sistemas formados no diagrama de fases pseudoternário.

Tipo de Sistema	Aspecto
Microemulsão	Transparente ou translúcido e apresentando fluidez
Cristal líquido	Transparente ou translúcido, podendo apresentar maior viscosidade
Emulsão	Leitoso, opaco ou turvo
Instável/Separação de fases	Presença de mais de uma fase, aparente instabilidade

Figura 3. Tubos após titulações realizadas na construção do diagrama de fases. Conforme a ordem das fotos: Sugestivo de microemulsão (estável e fluida), emulsão opaca (instável), emulsão leitosa (instável), separação de fases (instável), cristal líquido (estável e viscoso), respectivamente.



Fonte: Da autora.

3.2.5. Incorporação da quitosana nas mesofases líquido-cristalinas

Levou-se em conta que a administração da formulação com aciclovir por via oral, com a adição de quitosana de baixa massa molecular, na forma de uma composição fluida, visou conferir propriedades mucoadesivas à preparação, visto que esta é uma propriedade bem conhecida deste biopolímero. Nesta etapa considerou-se como um fator crítico, o potencial da quitosana alterar a organização (estabilidade física) da microemulsão ou da mesofase líquido-cristalina.

A adição de quitosana nas formulações foi feita substituindo uma parte da fase aquosa (ácido acético 0,5 mol/L) pela dispersão de quitosana, mantendo o co-tensoativo (glicerina ou PEG 400).

3.2.6. Incorporação do aciclovir nas formulações selecionadas

Para o desenvolvimento das formulações para liberação oral de aciclovir, o fármaco (200 mg) foi misturado nas preparações selecionadas (5 g). Levou-se em consideração o potencial desta incorporação do aciclovir alterar a organização da mesofase líquido-cristalina e avaliou-se se o fármaco permaneceria na forma solúvel ou suspensa nas formulações selecionadas (dose de 40 mg de aciclovir por grama de formulação, 40 mg/g).

3.2.7. Estudo da transição de fase dos sistemas selecionados

A mudança de viscosidade de formulações isotrópicas fluidas, que em contato com meio líquido são capazes de formar sistemas mais viscosos e com características anisotrópicas, foi estudada, avaliando a capacidade do sistema em intumescer na presença de líquido (fluido gástrico simulado). Para a seleção destes sistemas, capazes de sofrer transição de fase, os pontos no diagrama de fases pseudoternário foram identificados e a porcentagem de intumescimento da formulação na presença de FGSSE foi determinada, a temperatura ambiente, observando visualmente os sistemas que permaneciam com aspecto de gel viscoso após contato com FGSSE. A estabilidade do cristal líquido formado ao longo do tempo imerso no FGSSE também foi avaliada.

A porcentagem de intumescimento (ou *swelling*: absorção de FGSSE com transição de fase) foi determinada pela equação 1, usando um método gravimétrico:

Equação 1

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{\text{Peso da formulação após absorver líquido} - \text{Peso do béquer vazio}}{\text{Peso inicial da formulação} - \text{Peso do béquer vazio}} \times 100$$

3.2.8. Teste de centrifugação, determinação do pH e transparência das microemulsões

As formulações selecionadas contendo ou não aciclovir foram analisados quanto ao pH (após diluição apropriada da formulação em água ultrapura). As formulações selecionadas também foram centrifugadas imediatamente após o preparo a 3000 rpm (rotações por minuto) por 15 minutos, à temperatura ambiente, a fim de se determinar sua estabilidade física como

um sistema transparente de fase única. Após a incorporação da quitosana, os sistemas foram submetidos novamente à centrifugação (3000 rpm por 15 minutos) para avaliação da estabilidade física.

As formulações que apresentaram fluidez e transparência foram avaliadas em espectrofotômetro com absorvância em 570 nm. Foram consideradas translúcidas as formulações que apresentam absorvância menor que 0,046 (equivalente a uma transmitância igual ou menor a 90%).

3.2.9. Análise do potencial zeta, tamanho da gotícula e índice de polidispersão

O potencial zeta, tamanho e polidispersão dos sistemas foram analisados por espectroscopia de correlação de fótons usando dispersão dinâmica de luz em um equipamento Zetasizer, modelo NanoSurf. Formulações fluidas, sugestivas de microemulsões, e passíveis de diluições, ainda se apresentando como sistemas translúcidos, foram analisadas.

Para a realização destas medidas, as microemulsões foram diluídas sucessivamente em um béquer até a limpidez (diluições de 10 a 50 vezes). As diluições para análise foram realizadas em água ultrapura, fluido gástrico simulado (FGSSE) e salina, obtendo-se resultados nestas três condições.

3.2.10. Caracterização reológica das formulações selecionadas

O perfil reológico dos sistemas nanoestruturados e dispersões de quitosana foram avaliados usando um Reômetro Brookfield, modelo DV-III Ultra (Figura 4), acoplada a um computador com o *software* Rheocalc v.3.2 Brookfield Engineering Laboratories. As análises foram realizadas com *spindle* CPE-51 e CPE-52 a 25°C. Realizaram-se as medições em velocidades progressivamente maiores para obtenção das curvas ascendentes, nas rotações de 5 a 25 rpm (CPE-51) e de 5 a 15 rpm (CPE-52), seguidas de velocidades progressivamente menores para obtenção da curva descendente. O ensaio foi realizado em triplicata e os dados ajustados a Lei da Potência (Power Law ou Otswald), seguindo a equação:

$$\tau = K \dot{\gamma}^n,$$

Em que: τ = tensão de cisalhamento (Shear stress) (dina/cm²); K = índice de consistência (cP); $\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento (Shear rate) (1/seg); n = índice de fluxo.

A partir dos resultados, caracterizou-se o comportamento reológico das formulações analisadas, determinando a viscosidade aparente (em centipóise, cP).

Figura 4. Reômetro Brookfield, modelo DV-III Ultra.



Fonte: Da autora.

3.2.11. Análise estatística dos resultados

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para comparação de médias com nível de significância maior ou igual a 5% e valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Metodologia analítica por espectrofotometria para quantificação de aciclovir

Os resultados da validação analítica estão apresentados na Tabela 2. Os resultados estão conforme o preconizado na RDC 167/2017, indicando confiabilidade do método para determinação do aciclovir em FGSSE.

Tabela 2. Validação do método analítico para determinação de aciclovir diluído em FGSSE.

Parâmetro de validação	Resultado ($\lambda = 256 \text{ nm}$)
Linearidade (n=3)	$Y = 0.0591 (\pm 0.0001) X + 0.0119 (\pm 0.0015)$
Coefficiente de correlação de Pearson	$r > 0,990$, com valor de $r = 0.99898$
Coefficiente de determinação	$r^2 = 0,99796$
Intervalo (7 pontos)	1 a 18 $\mu\text{g/mL}$
Precisão-intra-dias (3 pontos) ¹	0.22% a 0.49%, ou seja, < 2.0%
Precisão inter-dias (3 pontos) ¹	0.46% a 0.85%, ou seja, < 2.0%
Exatidão (3 pontos) ²	100.23% a 100.89%, ou seja, variou entre 98.0% a 102.0%

Legenda: ¹, Determinado pelo desvio padrão relativo;

², determinado por porcentagem de recuperação (3 pontos, em triplicata, níveis baixo, médio e alto).

A seletividade do método foi alcançada somente quando a solução de excipientes foi muito diluída. Em maiores concentrações, excipientes como polissorbato 80, glicerina e óleos (miristato de isopropila) apresentaram absorvância significativa na região de comprimento de onda máxima onde há maior absorção do aciclovir (250 a 280 nm) (Figura 5). A interferência de excipientes como PEG400 foi menor, permitindo, por exemplo análise da solubilidade na fase aquosa (Tabela 3). Os resultados em propilenoglicol foram levemente superiores aos demais veículos testados. Por análise visual, a solubilidade do aciclovir no polissorbato 80, ácido oleico e miristato de isopropila foi muito baixa, sendo visível a presença de cristais e precipitação.

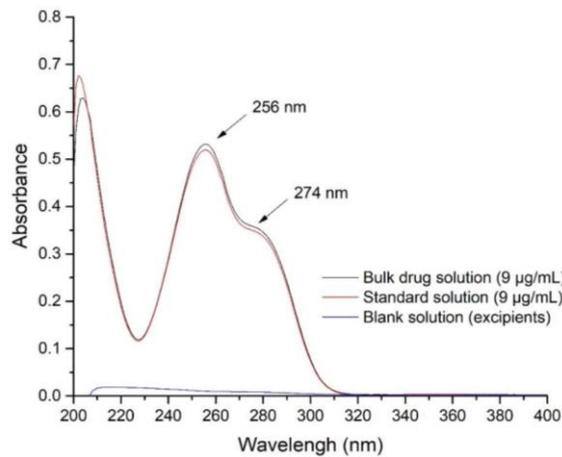
A solubilidade do aciclovir em água é dependente do pH (Figura 6), conforme ionizam-se os grupos funcionais da molécula (SHOJAEI; BERNER; LI, 1998). Ademais, a solubilidade em miristato de isopropila e polissorbato 80 tendem a ser menores que em água (< 0.2 mg/mL), conforme dados da literatura (AL-SUBAIE et al., 2015). Comparando os resultados da solubilidade na fase aquosa e na fase oleosa, pode-se avaliar em qual componente da

formulação o fármaco estará mais concentrado. Neste caso, pode-se presumir que o aciclovir na forma solúvel tende a ter uma maior partilha para a fase aquosa, porém, de toda forma, a quantidade de fármaco na formulação deve ser muito alta, resultando em um sistema na forma de suspensão.

Tabela 3. Solubilidade do aciclovir a temperatura ambiente nos veículos (n=3).

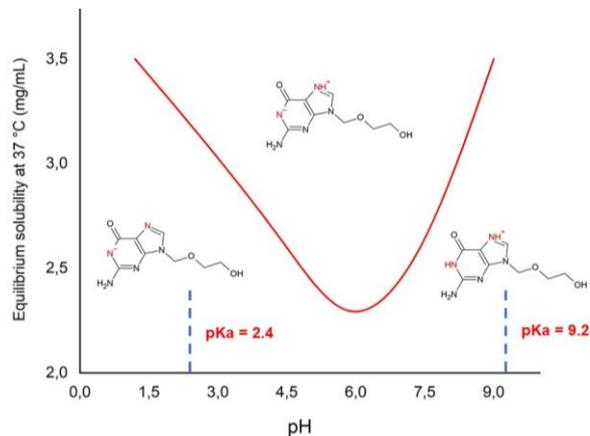
Meio	Resultado (mg/mL)
PEG400	2.2 (\pm 0.205)
Propilenoglicol	3.7 (\pm 0.101)
Ácido acético 0,5 mol/L	1.8 (\pm 0.127)
Ácido acético 0,5 mol/L: PEG400 (40:60)	1.9 (\pm 0.012)

Figura 5. Varreduras espectrais no UV-Vis



Fonte: Da autora.

Figura 6. Ionização e solubilidade do aciclovir em meios aquosos.



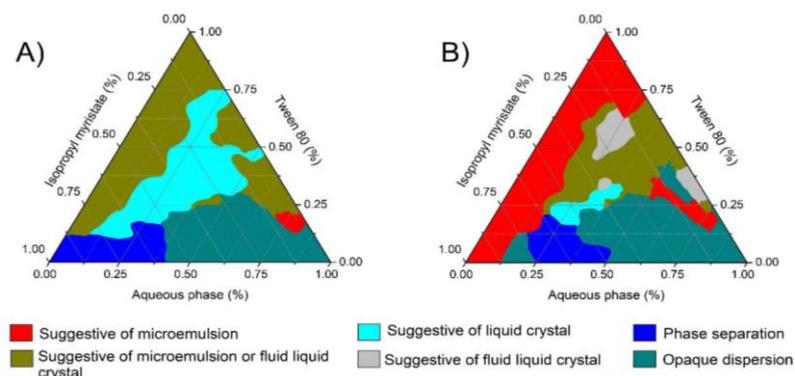
Fonte: Adaptado de dados de Shojaei, Berner e Li (1998).

4.2. Diagramas de fases pseudoternários

O diagrama construído usando a glicerina como co-solvente apresentou uma região extensa indicativa da formação de cristal líquido viscoso (do tipo gel semissólido, sugestivo de fases hexagonais ou cúbica). Para isso, as porcentagens de tensoativo variaram de 15% a 75%. O diagrama também apresentou uma área significativa indicativa de uma microemulsão viscosa ou de um cristal líquido mais fluido (do tipo fase lamelar). Tal fato pode estar associado a maior viscosidade da glicerina, incorporada na fase aquosa, resultando em sistemas dispersos também de maior viscosidade. A densidade da fase aquosa com PEG 400 foi de 1,09 g/mL, enquanto que a densidade da fase aquosa com glicerina foi de 1,12 g/mL. O diagrama preparado usando PEG400 como co-solvente apresentou uma maior região indicativa de formação de microemulsão (de alta fluidez), com regiões menores sendo sugestivas de cristal líquido (tanto mais fluido, quanto mais viscoso).

Em ambos os diagramas, regiões com maiores quantidades de água (> 50%) e menores concentrações de tensoativo (< 25%) indicaram instabilidade aparente, com formação de emulsões opacas ou separação de fases. A separação de fases tendeu a ser mais evidente em regiões usando menores concentrações de tensoativo (< 25%) e maiores concentrações de fase oleosa (> 65%). Com base na discussão, é possível afirmar que a seleção do co-solvente interfere criticamente nos tipos de mesofases formadas. Imagens de microscopia de luz polarizada serão analisadas posteriormente, para caracterizar o tipo da mesofase formada (cúbica, hexagonal ou lamelar). As análises não foram realizadas, pelo fato do microscópio com dispositivo de polarização estar em processo de aquisição.

Figura 7. Resultado dos diagramas de fases pseudoternários com os diferentes tipos de fase aquosa. Em (A) o diagrama usando fase aquosa com glicerina. Em (B) o diagrama usando fase aquosa com PEG 400.

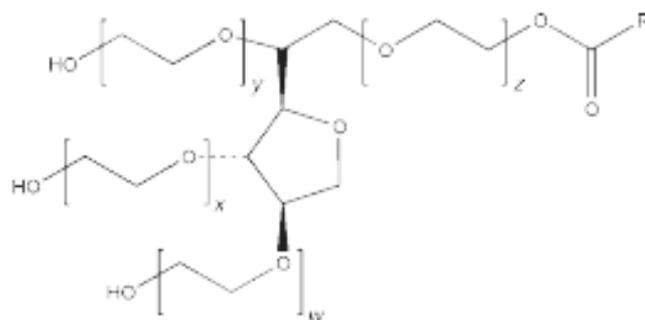


Fonte: Da autora.

A formação espontânea de sistemas do tipo microemulsão e cristal líquido depende da composição da fase aquosa, fase oleosa e tensoativo/co-tensoativo. A auto-organização do sistema liotrópico líquido cristalino depende da composição da dispersão, possuindo baixa energia livre. Por isso, o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) é importante, de modo que a fase oleosa e fase aquosa possam se dispersar, com o tensoativo promovendo sua estabilização e resultando em uma mistura termodinâmica estável. Considerando que o tensoativo polissorbato 80 (Figura 8) possui EHL de 15,8 e o miristato de isopropila (fase oleosa) possui um EHL requerido de 11,5, é possível deduzir que estes valores de EHL relativamente altos favorecem a formação de dispersões hidrofílicas. Estes valores também são relativamente próximos entre si, o que indica que a mistura com a fase aquosa contendo co-tensoativo (PEG 400 ou glicerina) possa favorecer a formação de mesofases líquido cristalinas, resultando em um valor muito próximo entre o EHL do óleo (miristato de isopropila) e do sistema tensoativo (co-tensoativo e polissorbato 80).

O polissorbato 80 (tensoativo não iônico utilizado na construção dos diagramas) é um surfactante, emulsificante e agente molhante que foi utilizado buscando uma homogeneização da formulação óleo/água, de forma com que durante as titulações realizadas na construção do diagrama de fases fossem obtidas formulações do tipo mesofase líquido-cristalina.

Figura 8. Estrutura química do Polissorbato 80 (Tween 80).



Fonte: Moffat, A. C., Osselton, M. D., & Widdop, B. (2009).

Desta maneira, o diagrama de fases preparado com glicerina apresentou significativo potencial para seleção de formulações com comportamento de transição de fase. Este comportamento foi caracterizado por um aumento da viscosidade do sistema a partir da absorção de água, havendo transição de uma microemulsão de alta fluidez para um cristal

líquido viscoso (tipo gel semissólido), geralmente do tipo fase hexagonal. O cristal líquido viscoso pode promover a difusão lenta do fármaco incorporado, resultando em um sistema do tipo matricial com potencial para liberação controlada do aciclovir por tempos prolongados. Entretanto, é importante avaliar se o sistema não se desorganiza após um tempo em contato com FGSSE, havendo formação de uma emulsão opaca.

O pH ácido da fase aquosa (ácido acético 0,5 mol/L) foi selecionado de modo a promover a solubilização do aciclovir, incorporando o fármaco preferencialmente em sua forma solúvel (ao menos uma parte), e facilitando também a incorporação da quitosana, visto que o biopolímero precipita em valores de pH neutros ou alcalinos. Por isso, o pH de estabilidade da dispersão de quitosana foi um fator limitante no desenvolvimento da formulação.

Estudos descritos na literatura, apontaram que a solubilidade do aciclovir em glicerol, usado como co-tensoativo em um diagrama (Figura 7A), é muito maior (~153 mg/mL) que em outros veículos, melhorando a capacidade de carregamento da formulação com fármaco solúvel (PATEL; SAWANT, 2007). Por conta disto, foi considerado como fase aquosa em um dos diagramas estudados no projeto. O glicerol, também conhecido como 1,2,3-propan-triol, é um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, sendo característico por apresentar solubilidade em solventes polares e densidade de 1,261 kg/L. Além disso, a molécula possui três hidroxilas que lhe conferem características hidrofílicas (FONSÊCA; SANTOS; LUCENA, 2017). Já o PEG 400 usado em outro diagrama (Figura 7B) é um líquido viscoso, límpido, incolor e com características também hidrofílicas, sendo definido como um co-tensoativo que possui ação como agente dispersante e emulsionante, auxiliando na estabilização física do sistema disperso e promovendo a formação de considerável região de mesofase líquido-cristalina.

A fase oleosa foi composta pelo miristato de isopropila ($C_{17}H_{34}O_2$), um óleo que possui características de um líquido incolor e inodoro, sendo constituído por ésteres alifáticos.

4.3. Sistemas selecionados após transição de fases

A partir do resultado dos diagramas de fases pseudoternários (Figura 7), algumas formulações sugestivas de cristais líquidos ou microemulsões estáveis foram selecionadas. Após seleção destas formulações, foram centrifugadas (centrifugação de 3500 rpm a 15 minutos) e mantiveram-se estáveis.

As formulações selecionadas com fase aquosa contendo co-solvente glicerina foram descritas na Tabela 4 e Figura 9.

Tabela 4. Formulações selecionadas com fase aquosa contendo glicerina.

Número/Tipo	Miristato de isopropila (%)	Polissorbato 80 (%)	Fase aquosa (%)
1/Microemulsão A/O	50	40	10
2/Cristal líquido	50	25	25
3/Microemulsão O/A	5	20	75

Legenda: A/O, água em óleo; O/A, óleo em água.

A formulação 1 (microemulsão A/O) sofreu transição de fase com FGSSE, com intumescimento de $19,8 \pm 2,1\%$, porém formou uma dispersão grosseira (aspecto opaco) rapidamente (~5 minutos). A formulação 3 (microemulsão O/A) diluiu infinitamente em FGSSE (se dispersou no FGSSE, sendo visualizada de forma límpida) e apresentou absorvância em 570 nm de ~0.018, indicando translucidez, característica de microemulsão.

Figura 9. Formulações contendo 25%, 75% e 10% de fase aquosa com glicerina, após centrifugação.



Fonte: Da autora.

As formulações selecionadas com fase aquosa contendo co-solvente PEG 400 foram descritas na Tabela 5 e Figura 10.

Tabela 5. Formulações selecionadas com fase aquosa contendo PEG400.

Número/Tipo	Miristato de isopropila (%)	Polissorbato 80 (%)	Fase aquosa (%)
1/Microemulsão A/O	60	30	10
2/Cristal líquido	25	55	20
3/Cristal líquido	20	55	25
4/Microemulsão O/A	5	20	75

Legenda: A/O, água em óleo; O/A, óleo em água.

A formulação 1 (microemulsão A/O) sofreu transição de fase com FGSSE, com intumescimento de $16,6 \pm 2,8\%$, porém formou uma dispersão grosseira (aspecto opaco) rapidamente (~5 minutos). A formulação 4 (microemulsão O/A) diluiu infinitamente em FGSSE (se dispersou no FGSSE, sendo visualizada de forma límpida) e apresentou absorvância em 570 nm de ~0.046, indicando translucidez, característica de microemulsão.

Figura 10. Formulações contendo 10%, 20%, 25% e 75% de fase aquosa com PEG400, após centrifugação.

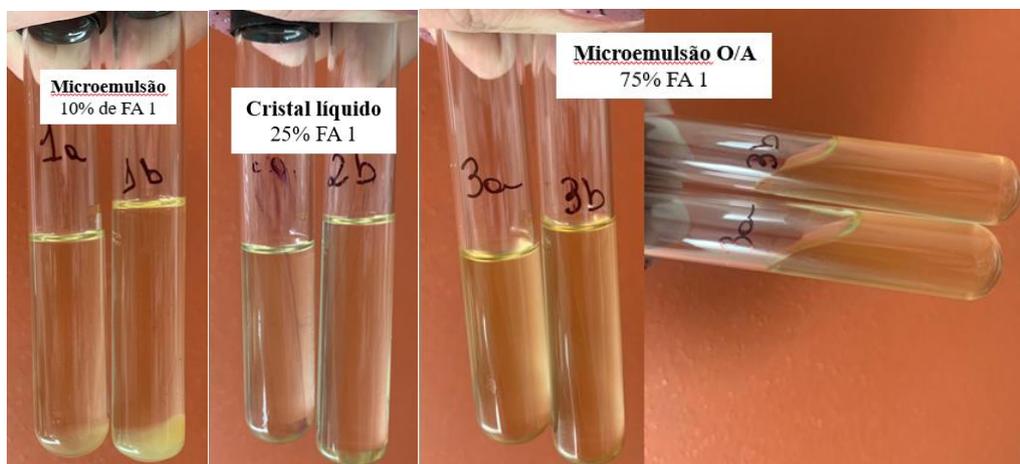
Fonte: Da autora.

4.4. Formulações após a incorporação da quitosana

Após a adição do gel de quitosana e o teste de estabilidade física (centrifugação de 3500 rpm a 15 minutos), as formulações indicaram resultados variáveis quanto à estabilidade física, apresentando precipitações do biopolímero em determinados sistemas. Quando o co-solvente foi a glicerina (Figura 11), a formulação com menor teor aquoso (10%) indicou precipitação da quitosana, observado um corpo de fundo, enquanto as formulações com 25% e 75% de fase aquosa mantiveram-se estáveis. A formulação com 75% de fase aquosa apresentou absorvância de 0.014 a 570 nm, indicando translucidez, podendo ser diluída indefinidamente em contato com FGSSE. O cristal líquido com 25% de fase aquosa apresentou swelling de 18,2%.

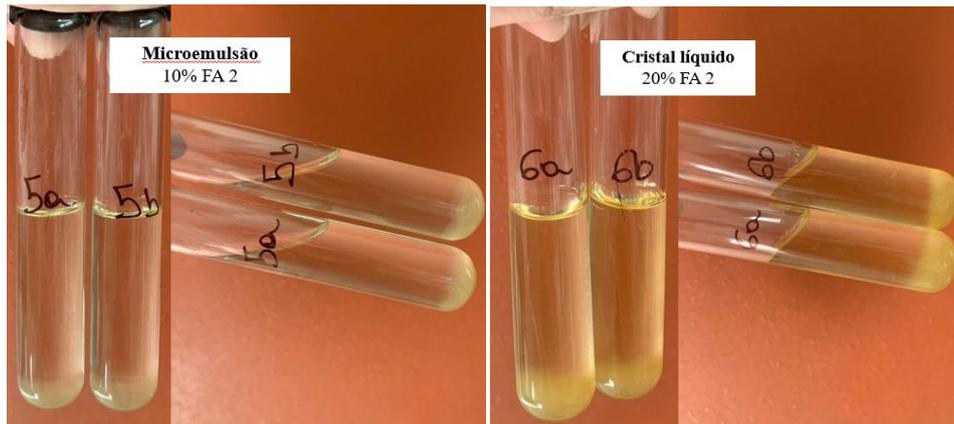
Quando o co-solvente foi PEG400 (Figuras 12 e 13), as formulações com menor teor aquoso (10%, 20% e 25%) indicaram precipitação da quitosana, observado um corpo de fundo. A formulação com 75% de fase aquosa manteve-se estável, além disso, passou a formar um cristal líquido em contato com FGSSE.

Figura 11. Formulações contendo 10%, 25% e 75% de fase aquosa com glicerina, após a incorporação de quitosana e centrifugação.



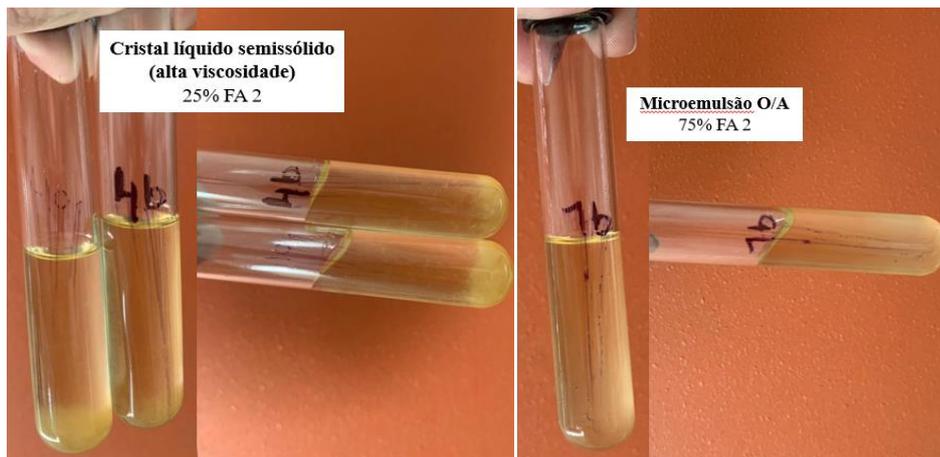
Fonte: Da autora.

Figura 12. Formulações contendo 10 e 20% de fase aquosa com PEG400, após a incorporação de quitosana e centrifugação.



Fonte: Da autora.

Figura 13. Formulações contendo 25 e 75% de fase aquosa com PEG400, após a incorporação de quitosana e centrifugação.



Fonte: Da autora.

4.5. Estabilidade das formulações em contato com FGSSE

Após a realização da centrifugação dos tubos, contendo os sistemas com a incorporação de quitosana ou não, as formulações foram imersas em FGSSE a temperatura ambiente. A formulação de microemulsão O/A contendo 75% de fase aquosa com PEG400, sem quitosana, em contato com FGSSE, apresentou uma diluição infinita. Entretanto, esta mesma formulação, após a incorporação da quitosana, quando em contato com FGSSE, formou uma mesofase estável em FGSSE, conforme figura 14.

As outras formulações de microemulsão sem quitosana, quando em contato com FGSSE, passaram por transição de fase, se desestabilizando e formando emulsões grosseiras. A figura 14 (canto direito) mostra uma formulação em que o sistema perdeu a estabilidade física, ficando com aspecto opaco/leitoso.

Figura 14. As imagens na figura representam, respectivamente: A) formulação de microemulsão O/A com 75% de fase aquosa com PEG400 sem quitosana, após contato com FGSSE. B) Formulação de microemulsão O/A com 75% de fase aquosa com PEG 400 com quitosana, após contato com FGSSE, formando um cristal líquido estável. C) Cristal líquido com fase aquosa com PEG400 sem quitosana, que se desestabiliza em contato com FGSSE.

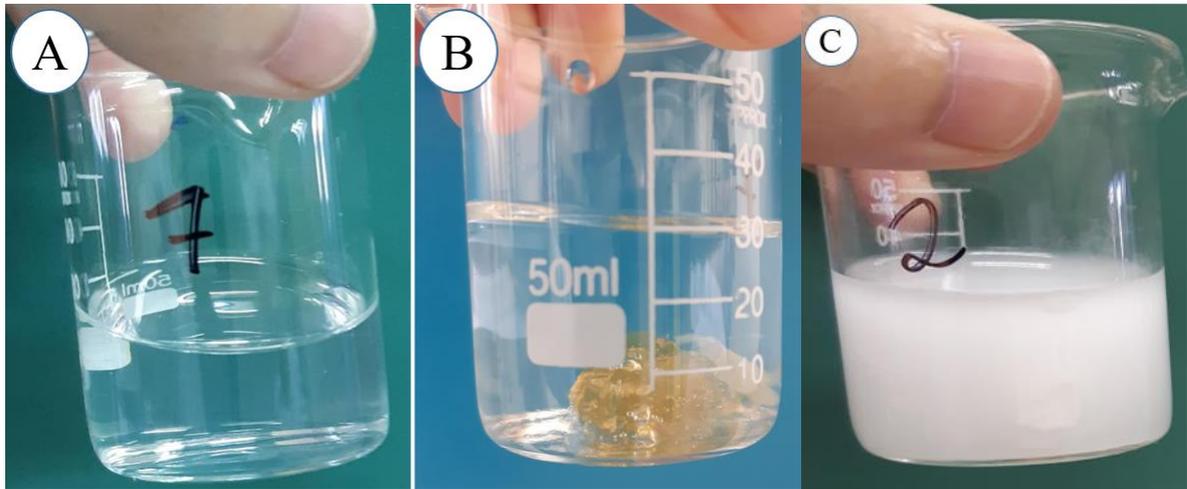


Figura: Da autora.

A partir destes resultados é possível identificar que a incorporação da quitosana nas formulações selecionadas permitiu maior viscosidade ao sistema. Estas características de transição de fase, com aumento da viscosidade aparente da formulação, são eficientes para demonstrar uma incrementação do potencial mucoadesivo destas preparações após a adição do biopolímero. Isto ocorrerá *in situ*, após a administração de uma formulação fluida que se tornará viscosa e mucoadesiva.

4.6. Incorporação do aciclovir nas formulações

O fármaco aciclovir (200 mg) na forma de um pó branco foi incorporado no sistema, que ficou com aspecto branco/opaco, característica do insumo farmacêutico ativo. Tal fato indicou uma supersaturação das formulações compostas por fase aquosa com glicerina e PEG 400. Sendo assim, o aciclovir se manteve de forma suspensa, como mostrado na figura 15, visto que o fármaco não se solubilizou totalmente nas formulações. Além disso, não foi possível concluir a análise espectrofotométrica no UV-Visível, pois os resultados após a incorporação do fármaco não foram confiáveis, visto haver interferência significativa dos excipientes no método analítico (Tween 80 e Glicerina absorvem em comprimento de onda similar ao Aciclovir).

Figura 15. Formulações com quitosana e incorporação de aciclovir (40 mg/g). Em A, formulação de microemulsão com 10% de fase aquosa com glicerina. Em B, formulação de cristal líquido com 25% de fase aquosa com glicerina. Em C, formulação de microemulsão com 10% de fase aquosa com PEG400. Em D, formulação de cristal líquido com 20% de fase aquosa com PEG400. Em E, formulação de cristal líquido com 25% de fase aquosa com PEG400.

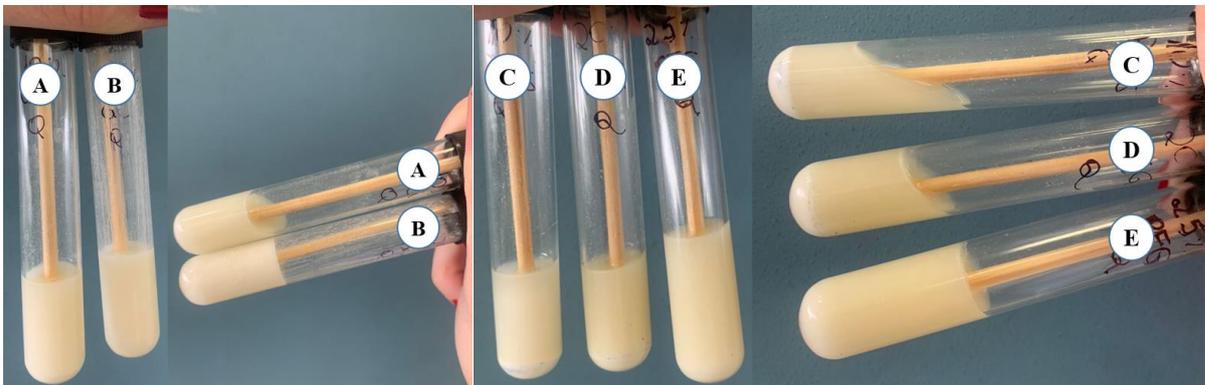


Figura: Da autora.

4.7. Análise do potencial zeta, distribuição de tamanho de gotículas e índice de polidispersão

A seguir, estão apresentados os resultados das análises das microemulsões por espectroscopia de correlação de fótons, na Tabela 6 e na Figura 16.

Tabela 6. Resultado da análise em Zetasizer das formulações de microemulsões (ME), com 75% de fase aquosa.

Formulação	Potencial zeta (mV)	Condutividade (mS/cm)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	PDI
ME com glicerina ¹ , em FGSSE	1.0 ± 0.3	38.1 ± 0.7	17.51 ± 0.15	0.180 ± 0.010
ME, com PEG400 ¹ em FGSSE	0.4 ± 3.0	34.1 ± 0.3	18.22 ± 1.52	0.199 ± 0.093
ME, com PEG400 ¹ em água	1.3 ± 0.8	0.236 ± 0.1	16.73 ± 0.44	0.103 ± 0.036
ME, com PEG400 ² em salina	1.6 ± 0.1	15.4 ± 1.2	18.5 ± 0.1	0.144 ± 0.010
ME, com PEG400 ² em água	7.3 ± 4.2	0.2 ± 0.1	20.4 ± 0.3	0.279 ± 0.008
ME, com PEG400 ³ em FGSSE	7.2 ± 1.6	27.1 ± 1.27	30.54 ± 0.83	0.472 ± 0.026
ME, com PEG400 ³ em salina	9.9 ± 1.9	14.2 ± 0.70	27.35 ± 0.61	0.423 ± 0.006
ME, com PEG400 ³ em água	10.0 ± 1.5	0.7 ± 0.1	Alto PDI	Alto PDI
ME, com PEG400 ⁴ em FGSSE	8.4 ± 1.4	30.7 ± 1.6	21.5 ± 1.1	0.271 ± 0.033
ME, com PEG400 ⁴ em salina	7.9 ± 0.4	14.1 ± 0.7	22.2 ± 0.5	0.310 ± 0.020
ME, com PEG400 ⁴ em água	6.3 ± 2.5	0.2 ± 0.1	25.4 ± 0.2	0.358 ± 0.013
ME, com PEG400 ⁵ em FGSSE	8.6 ± 0.6	21.5 ± 0.7	Alto PDI	Alto PDI
ME, com PEG400 ⁵ em salina	8.2 ± 1.0	14.1 ± 0.5	34.7 ± 4.9	0.456 ± 0.047
ME, com PEG400 ⁵ em água	17.4 ± 2.7	0.7 ± 0.1	42.3 ± 3.2	0.430 ± 0.017

Legenda:

¹ Fase aquosa: 30% Co-solvente + 45% ácido acético 0.5 mol/L;

² Fase aquosa: 30% Co-solvente + 35% ácido acético 0.5 mol/L + 10% de dispersão de quitosana a 5%;

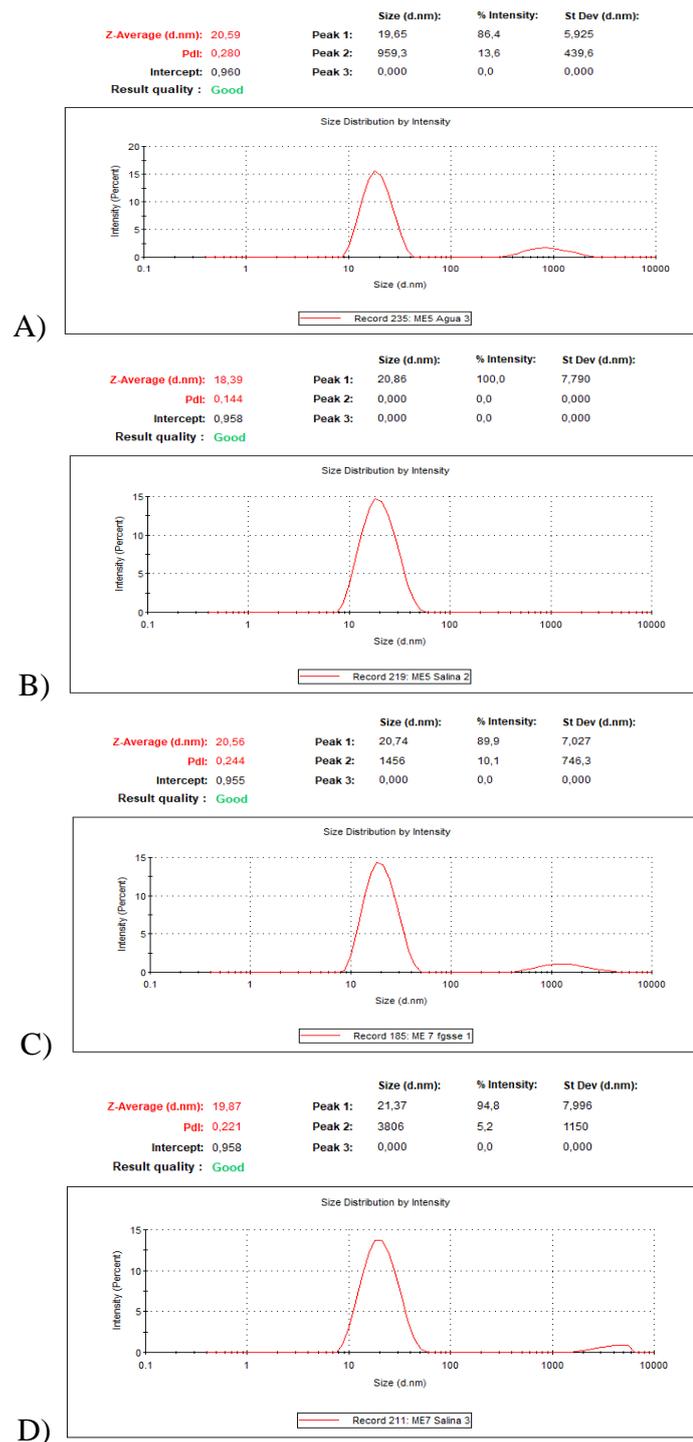
³ Fase aquosa: 30% Co-solvente + 25% ácido acético 0.5 mol/L + 20% de dispersão de quitosana a 5%;

⁴ Fase aquosa: 30% Co-solvente + 15% ácido acético 0.5 mol/L + 30% de dispersão de quitosana a 5%;

⁵ Fase aquosa: 30% Co-solvente + 45% de dispersão de quitosana a 5%;

PDI, índice de polidispersão.

Figura 16. Distribuição de tamanho (diâmetro hidrodinâmico) - Microemulsão com fase aquosa: 30% Co-solvente (PEG400) + 35% ácido acético 0.5 mol/L + 10% de dispersão de quitosana a 5% diluída em A) água; B) salina; Microemulsão com fase aquosa: 30% Co-solvente (PEG400) + 15% ácido acético 0.5 mol/L + 30% de dispersão de quitosana a 5% diluída em C) FGSSE; D) salina.



Fonte: Da autora.

Observa-se pelos resultados na Tabela 6, que as formulações sem quitosana tiveram potencial zeta próximo à neutralidade, em torno de zero, o que é esperado tendo em vista que o polissorbato 80 é um tensoativo não iônico. A incorporação de quitosana aumentou o potencial zeta, atribuindo carga positiva às gotículas, na maioria dos casos, variando de +7 a +10 mV. Visto que a quitosana apresenta carga positiva, sendo um polieletrólito, assume-se que a mesma pode se depositar na interface contendo tensoativo, modificando a superfície das gotículas. As medidas foram realizadas em meios com diferentes forças iônicas e pH, de modo a verificar o efeito no diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta. Entretanto, efeitos significativos não foram identificados. No geral, o tamanho variou entre 15 a 30 nm, após diluição das microemulsões, e o PDI variou de 0,1 a 0,45. O ideal são valores de PDI inferiores a 0,3, indicando distribuição mais homogênea de tamanho. A análise em FGSSE simula melhor a distribuição de tamanho da microemulsão após administração oral, entretanto, a caracterização físico-química também é importante, por isso, realizaram-se as medidas em água e salina. Em alguns casos, quando o potencial zeta é menor que 20 mV, em módulo, aglomerações podem ser identificadas, conforme visualizados na Figura 16 (A, C e D), com a presença de um pico de maior tamanho (~1000 nm), o que reflete aumentando o PDI.

4.8. Caracterização reológica

A análise em gel de quitosana foi realizada logo após a preparação (análise realizada em três dias diferentes), após 24 horas e após 1, 2, 3 e 4 semanas. O resultado da caracterização reológica foi realizado usando *spindle* CPE-51, com 5 a 25 rotações por minuto, sendo indicado conforme resultados na Tabela 7 e Figura 17. Observou-se que a dispersão apresentava-se com maior viscosidade aparente logo após o preparo, com perda significativa de consistência dentro do período de 1 mês. Conforme os valores de índice de fluxo, enquanto a preparação é mais viscosa, o valor situa-se em aproximadamente 0.77, indicando comportamento não-newtoniano, do tipo pseudoplástico. Até 24 h após o preparo, é possível observar tendência de comportamento dependente do tempo, tixotrópico, visto que a viscosidade aparente dada pelo índice de consistência é maior na curva ascendente do que na curva descendente. Após 1 semana, a tendência de comportamento tixotrópico já não é mais observada e o índice de fluxo

tende a se aproximar de 1, o que é característico de fluidos newtonianos. Pode-se presumir falta de estabilidade da quitosana, provavelmente com degradação das cadeias poliméricas, reduzindo o peso molecular e a viscosidade aparente.

Tabela 7. Reologia da dispersão de quitosana a 5% em ácido acético 0,5 mol/L a 3% (n=3). Na primeira linha, a curva ascendente (5 a 25 rpm), e na segunda linha, a curva descentente (25 a 5 rpm).

Dispersão de quitosana	Índice de consistência (cP)	Índice de fluxo	Confiança de ajuste (%)
Recém-preparada	6053.0 ± 397.4	0.76 ± 0.02	98.9 ± 0.1
	5361.7 ± 46.2	0.78 ± 0.01	99.1 ± 0.1
Recém-preparada	5745.3 ± 335.3	0.76 ± 0.02	99.1 ± 0.2
	5527.0 ± 26.2	0.77 ± 0.01	99.1 ± 0.1
Recém-preparada	5806.7 ± 336.8	0.76 ± 0.01	99.0 ± 0.1
	5525.7 ± 77.8	0.77 ± 0.01	99.2 ± 0.1
Após 24 h	4150.3 ± 556.8	0.80 ± 0.02	99.0 ± 0.2
	4034.7 ± 170.4	0.80 ± 0.01	99.1 ± 0.2
1 semana	1496.3 ± 29.8	0.89 ± 0.01	99.2 ± 0.1
	1485.7 ± 54.5	0.90 ± 0.01	99.3 ± 0.3
2 semanas	435.9 ± 19.5	0.98 ± 0.01	99.4 ± 0.1
	467.7 ± 43.7	0.96 ± 0.02	99.6 ± 0.3
3 semanas	341.6 ± 26.2	0.98 ± 0.02	99.5 ± 0.3
	320.5 ± 16.9	0.99 ± 0.02	99.5 ± 0.2
4 semanas	149.2 ± 0.2	1.02 ± 0.01	99.2 ± 0.2
	132.3 ± 13.3	1.04 ± 0.02	98.9 ± 0.2

Figura 17. Curvas indicativas da viscosidade aparente das formulações de dispersão de quitosana. A primeira curva em tempo zero e a segunda curva após duas semanas. Análises realizadas a temperatura ambiente.

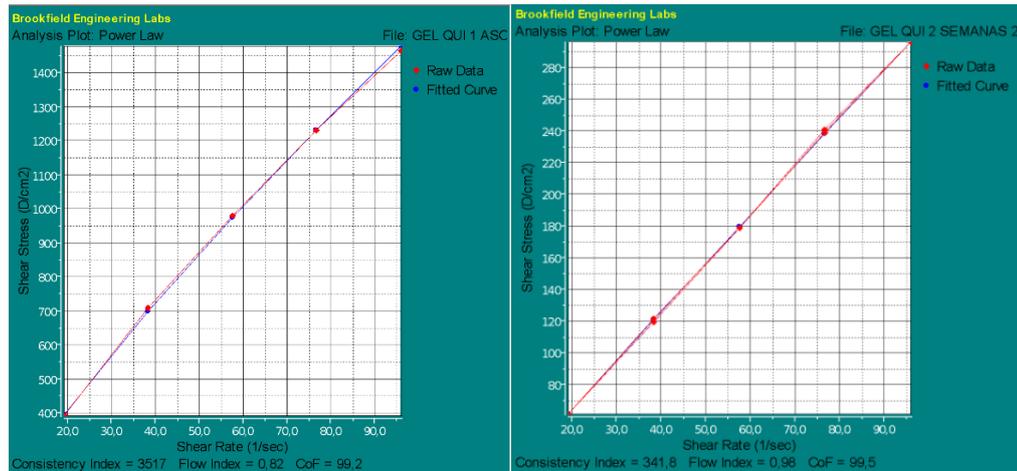


Figura: Da autora.

As formulações descritas na Tabela 8 foram analisadas usando *spindle* CP52 com 5 a 15 rotações por minuto. Porém, com a incorporação de quitosana no sistema contendo 75% de fase aquosa, a viscosidade aparente foi muito alta, apresentando resultado > 1 milhão cP, acima dos limites de detecção do equipamento. A microemulsão sem quitosana apresentou menor viscosidade aparente, e índice de fluxo próximo a 0.9, indicando leve tendência a pseudoplasticidade. Entretanto, microemulsões tendem a apresentar comportamento newtoniano. A associação de quitosana produziu aumento na viscosidade, nitidamente induzindo a transição de fase no sistema. Modificando levemente as porcentagens dos componentes, foi possível obter um sistema menos viscoso para caracterização do perfil reológico. Nestas preparações, o índice de fluxo diminuiu mais, aproximando-se de 0.6, caracterizando pseudoplasticidade. Estes resultados são de suma importância para o projeto e sua continuidade, no futuro, visto que transições de fase são possíveis com ligeiras variações na composição, sendo possível realizar a caracterização reológica dentro dos limites de detecção para formulações contendo quitosana. Os resultados estão também apresentados na Figura 18.

A variação da quantidade de quitosana na formulação, também foi avaliada, buscando modular a viscosidade do sistema. As análises foram efetuadas usando *spindle* CP52 com 5 a 15 rotações por minuto. A fase aquosa sem quitosana (75%) pode ser subdividida em 45% de ácido acético 0,5 mol/L e 35% de PEG400. Modificando a fração de ácido acético 0,5 mol/L por dispersão de quitosana, ou seja, acrescentando 10%, 20% e 30% de dispersão de quitosana, e completando o restante com ácido acético 0,5 mol/L até alcançar 45%, foi uma estratégia investigada para analisar os efeitos do polímero na consistência das preparações. O que se

observou na Tabela 8, é que a viscosidade do sistema foi menor, quando até 30% de quitosana foi associada às preparações. Não houve diferença significativa entre as preparações.

Tabela 8. Reologia das formulações (n=3). Na primeira, a curva ascendente (5 a 15 rpm), e na segunda linha, a curva descendente (15 a 5 rpm).

Formulação	Índice de consistência (cP)	Índice de fluxo	Confiança de ajuste (%)
ME PEG	196.2 ± 37.3	0.85 ± 0.05	95.3 ± 2.0
	145.3 ± 66.8	0.93 ± 0.10	96.2 ± 0.8
ME PEG DILUÍDA	79.7 ± 60.1	0.88 ± 0.15	93.5 ± 2.1
	103.4 ± 31.7	0.79 ± 0.06	92.7 ± 1.6
ME PEG QUI DILUÍDA	11039.0 ± 354.2	0.68 ± 0.01	99.2 ± 0.4
	11509.3 ± 1045.6	0.67 ± 0.02	99.6 ± 0.2
ME PEG QUI DILUÍDA (1 semana)	6460.0 ± 443.1	0.64 ± 0.02	98.7 ± 0.2
	6459.3 ± 116.6	0.64 ± 0.01	98.9 ± 0.7
ME PEG QUI DILUÍDA (2 semanas)	887.5 ± 21.7	0.98 ± 0.01	99.6 ± 0.3
	1051.0 ± 38.5	0.93 ± 0.01	99.5 ± 0.3

Legenda:

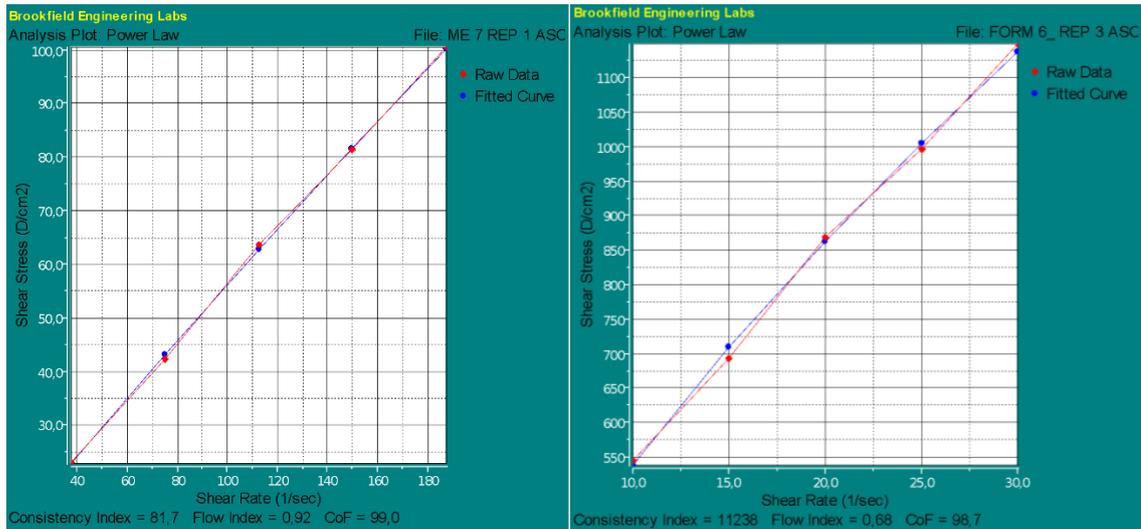
ME PEG: 5% Miristato de isopropila + 30% PEG400 + 45% Ácido acético 0,5 mol/L + 20% Polissorbato 80;

ME PEG QUI: 5% Miristato de isopropila + 30% PEG400 + 45% Dispersão de quitosana a 5% + 20% Polissorbato 80 – Não foi possível analisar, muito viscosa (> 1 milhão cP);

ME PEG DILUÍDA: 4.3% Miristato de isopropila + 26% PEG400 + 52.2% Ácido acético 0,5 mol/L + 17.4% Polissorbato 80;

ME PEG QUI DILUÍDA: 4.3% Miristato de isopropila + 26% PEG400 + 52.2% Dispersão de quitosana a 5% + 17.4% Polissorbato 80.

Figura 18. Curvas indicativas da viscosidade aparente das formulações de microemulsão com 4.3% de fase oleosa + 26% de PEG 400 + 52.2% ácido acético 0,5 mol/L + 17.4% polissorbato 80. A primeira curva sem quitosana e a segunda curva com a dispersão de quitosana incorporada, aumentando a viscosidade aparente.



Fonte: Da autora.

Tabela 9. Efeito da variação da quantidade de quitosana nos sistemas dispersos (n=3). Na primeira, a curva ascendente (5 a 15 rpm), e na segunda linha, a curva descendente (15 a 5 rpm).

Formulação	Índice de consistência (cP)	Índice de fluxo	Confiança de ajuste (%)
ME PEG QUI 2	104.9 ± 5.4	0.93 ± 0.01	99.3 ± 0.4
	114.8 ± 1.6	0.91 ± 0.01	99.3 ± 0.2
ME PEG QUI 3	118.3 ± 5.3	0.92 ± 0.01	99.4 ± 0.3
	115.0 ± 4.7	0.92 ± 0.01	99.5 ± 0.1
ME PEG QUI 4	83.5 ± 6.4	0.94 ± 0.01	98.8 ± 0.2
	94.5 ± 0.1	0.91 ± 0.01	99.2 ± 0.1

Legenda:

ME PEG QUI 2: 5% Miristato de isopropila + 30% PEG400 + 35% Ácido acético 0,5 mol/L + 10% Dispersão de quitosana a 5% + 20% Polissorbato 80;

ME PEG QUI 3: 5% Miristato de isopropila + 30% PEG400 + 25% Ácido acético 0,5 mol/L + 20% Dispersão de quitosana a 5% + 20% Polissorbato 80;

ME PEG QUI 4: 5% Miristato de isopropila + 30% PEG400 + 15% Ácido acético 0,5 mol/L + 30% Dispersão de quitosana a 5% + 20% Polissorbato 80.

As formulações preparadas com co-solvente glicerina também foram caracterizadas quanto ao perfil reológico, indicando características similares às aquelas com PEG400 (Tabela 10). Observou-se tendência a redução de viscosidade aparente do sistema com o tempo, assim como na dispersão de quitosana, com mudança do índice de fluxo, tendendo inicialmente à pseudoplasticidade e depois do armazenamento apresentando comportamento newtoniano. Esta perda de consistência também foi relacionada à degradação da quitosana em meio ácido.

Tabela 10. Sistemas dispersos preparados com glicerina como co-solvente na fase aquosa (n=3). Na primeira, a curva ascendente (5 a 15 rpm), e na segunda linha, a curva descendente (15 a 5 rpm).

Formulação	Índice de consistência (cP)	Índice de fluxo	Confiança de ajuste (%)
ME GLI	148.2 ± 94.9	0.83 ± 0.12	96.2 ± 2.5
	94.7 ± 26.0	0.91 ± 0.06	95.3 ± 1.9
ME GLI QUI	5440 ± 790.2	0.73 ± 0.05	98.3 ± 0.5
	4586 ± 369.6	0.73 ± 0.04	97.4 ± 1.0
ME GLI QUI DILUÍDA	10387.3 ± 588.3	0.69 ± 0.01	99.5 ± 0.3
	12095.0 ± 1905.3	0.65 ± 0.03	99.1 ± 0.7
ME GLI QUI DILUÍDA (1 semana)	5460.5 ± 1133.3	0.47 ± 0.07	96.4 ± 1.1
	4669.0 ± 843.6	0.52 ± 0.06	97.2 ± 1.5
ME GLI QUI DILUÍDA (2 semanas)	391.5 ± 67.5	0.96 ± 0.06	98.5 ± 1.4
	335.3 ± 36.8	1.00 ± 0.03	99.0 ± 0.4

Legenda:

ME GLI: 5% Miristato de isopropila + 30% Glicerina + 45% Ácido acético 0,5 mol/L + 20% Polissorbato 80;

ME GLI QUI: 5% Miristato de isopropila + 30% Glicerina + 45% Dispersão de quitosana a 5% + 20% Polissorbato 80;

ME GLI DILUÍDA: 4.3% Miristato de isopropila + 26% Glicerina + 52.2% Ácido acético 0,5 mol/L + 17.4% Polissorbato 80;

ME GLI QUI DILUÍDA: 4.3% Miristato de isopropila + 26% Glicerina + 52.2% Dispersão de quitosana a 5% + 17.4% Polissorbato 80.

5. CONCLUSÃO

As formulações foram desenvolvidas e selecionadas para a incorporação do aciclovir, demonstrando baixa capacidade de solubilização do fármaco no sistema. Assim, a estratégia é o delineamento de formulações de suspensão, em que o sistema estará saturado com aciclovir e ainda partículas insolúveis estarão homogeneamente dispersas na formulação. Estes resultados permitiram identificar e explorar possíveis formulações a serem otimizadas em estudos futuros para incorporação do aciclovir, e posteriormente conduzir ensaios *in vitro* (liberação) e ensaios *in vivo* em modelos animais (farmacocinética em ratos). A avaliação do carregamento do fármaco também se faz necessária, com padronização de método cromatográfico, devido às interferências demonstradas pela metodologia por espectrofotometria no UV-Vis. Para determinar a incorporação, tendo em vista que somente resultados preliminares foram obtidos, análises por cromatografia líquida de alta eficiência serão realizadas em uma proposta de continuidade. É importante destacar que atualmente o aciclovir pode ser encontrado na forma farmacêutica suspensão, entretanto, o uso do medicamento resulta uma baixa biodisponibilidade do fármaco por via oral (~30%).

Identificaram-se sistemas dispersos nanoestruturados de diferentes viscosidades e passíveis de sofrer alteração de fase em contato com FGSSE. Sendo assim, as formulações têm potencial mucoadesivos. A incorporação de quitosana é um fator adicional que pode contribuir para aumentar o tempo de permanência da formulação em contato com a mucosa, tornando maior a absorção oral do aciclovir e conseqüentemente sua biodisponibilidade. Além disso, a quitosana pode ser associada aos sistemas dispersos com maior teor aquoso, aumentando a estabilidade física do sistema em contato com FGSSE e o valor de potencial zeta. Estes resultados representam uma inovação incremental deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALMEHMADY A. M.; ALI S. A. Transdermal film loaded with garlic oil-acyclovir nanoemulsion to overcome barriers for its use in alleviating cold sore conditions. **Pharmaceutics**, 2021. 13, 669.
- ALSARRA, I. A. et al. Mucoadhesive polymeric hydrogels for nasal delivery of acyclovir. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2009. v. 35, n. 3, p. 352–362.
- AL-SUBAIE, M. M. et al. Utilization of nanotechnology to enhance percutaneous absorption of acyclovir in the treatment of herpes simplex viral infections. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3973–3985, 2015.
- ALVAREZ-LORENZO, C. et al. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2013. v. 65, n. 9, p. 1148–1171.
- BHALEKAR, M. R. et al. Formulation and evaluation of acyclovir nanosuspension for enhancement of oral bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 8, n. 2, p. 110–118, 2014.
- BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2010. v. 62, n. 1, p. 83–99.
- BRIGDEN, D.; SUMMARY, W. The mechanism of action, pharmacokinetics and toxicity of acyclovir - a review. **Journal of Infection**, 1983. v. 6, p. 3–9.
- CALLENDER, S. P. et al. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multidrug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 2017. v. 526, n. 1–2, p. 425–4
- CARAMELLA, C. M. et al. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2015. v. 92, p. 39–52
- DANG, Q. et al. Characterization and biocompatibility of injectable microspheres-loaded hydrogel for methotrexate delivery. **Carbohydrate Polymers**, 2016. v. 136, p. 516–526.
- DJEKIC, L. et al. Semisolid self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDSs): Effects on pharmacokinetics of acyclovir in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 121, p. 287–292, 2018.
- DUDHANI, A. R.; KOSARAJU, S. L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, 2010. v. 81, n. 2, p. 243–251.
- FONSÊCA, C. A. C.; SANTOS, Z. M.; LUCENA I. L. Estudo da cinética de liberação de Diclofenaco de Sódio a partir de membranas de quitosana com adição de glicerol. **Universidade Federal Rural do Semiárido**, 2017.
- FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2005. v. 41, n. 3, p. 301–313.

- GHOSH, P. K. et al. Design and development of microemulsion drug delivery system of acyclovir for improvement of oral bioavailability. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 3, 2006.
- HARTHI, S. AL et al. Nasal delivery of donepezil HCl-loaded hydrogels for the treatment of Alzheimer's disease. **Scientific reports**, 2019. v. 9, n. 1, p. 9563.
- KARASULU, H. Y. Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity. **Expert Opinion on Drug Delivery**, 2008. v. 5, n. 1, p. 119–136.
- KENNEDY, P. G. E. Viral encephalitis. **Journal of Neurology**, 2005. v. 252, p. 268–272.
- KUBBINGA, M. et al. The Influence of chitosan on the oral bioavailability of acyclovir - a comparative bioavailability study in humans. **Pharmaceutical Research**, 2015. v. 32, p. 2241–2249.
- LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2000. v. 45, n. 1, p. 89–121.
- MILAK, S.; ZIMMER, A. Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, 2015. v. 478, n. 2, p. 569–587.
- MIRANDA, P. De; BLUM, M. R. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 1983. v. 12, n. Suppl B, p. 29–37.
- MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. *Drugs and Poisons. Clarke's analysis of drug and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*, 2009. v. 4th ed., p. **London: Pharmaceutical Press**. 2609 p.
- MU, H.; HOLM, R.; MULLERTZ, A. Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, 2013. v. 453, n. 1, p. 215–224.
- OLIVEIRA, D. A. J. et al. Associating chitosan and microemulsion as a topical vehicle for the administration of herbal medicines. **Carbohydrate Polymers**, 2021. 255, 117482.
- PALLASCH, T. J.; JOSEPH, C. E.; GILL, C. J. Acyclovir and herpesvirus infections. A review of the literature. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, 1984. v. 57, n. 1, p. 41–44.
- PATEL, D.; SAWANT, K. K. Oral Bioavailability enhancement of acyclovir by self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS). **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2007. 33(12), 1318–1326.
- PONGJANYAKUL, T. et al. Characterization of chitosan-magnesium aluminum silicate nanocomposite films for buccal delivery of nicotine. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2013. v. 55, p. 24–31.
- RICHARDS, D. M. et al. **Acyclovir**. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy. 1983. v. 26, n. 5, p. 378–438.

RUELA, A. L. M.; CARVALHO, F. C.; PEREIRA, G. R. Exploring the phase behavior of monoolein/oleic acid/water systems for enhanced donezepil administration for Alzheimer disease treatment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2016. v. 105, n. 1, p. 71–77.

SAIFI, Z. et al. Bilosomes nanocarriers for improved oral bioavailability of acyclovir: A complete characterization through in vitro, ex-vivo and in vivo assessment. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 1–13, 2020.

SHOJAEI, A. H.; BERNER, B.; LI, X. Transbuccal delivery of acyclovir. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 8, p. 1182–1188, 1998.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005. v. 57, n. 11, p. 1556–1568.