

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

FERNANDO AUGUSTO PIRES DE SÁ

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE PAROMOMICINA
VISANDO O TRATAMENTO TÓPICO PASSIVO E IONTOFORÉTICO DE LESÕES
DECORRENTES DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

BRASÍLIA

2020

FERNANDO AUGUSTO PIRES DE SÁ

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE PAROMOMICINA
VISANDO O TRATAMENTO TÓPICO PASSIVO E IONTOFORÉTICO DE LESÕES
DECORRENTES DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Taís Gratieri

BRASÍLIA

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PP667d Pires de Sá, Fernando Augusto
Desenvolvimento de sistemas de liberação de paromomicina visando o tratamento tópico passivo e iontoforético de lesões decorrentes da leishmaniose tegumentar / Fernando Augusto Pires de Sá; orientador Taís Gratieri. -- Brasília, 2020.
91 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade de Brasília, 2020.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Paromomicina. 3. Poloxamer 407. 4. Penetração cutânea. 5. Iontoforese. I. Gratieri, Taís, orient. II. Título.

FERNANDO AUGUSTO PIRES DE SÁ

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE PAROMOMICINA
VISANDO O TRATAMENTO TÓPICO PASSIVO E IONTOFORÉTICO DE LESÕES
DECORRENTES DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da
Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título
de Doutor em Ciências Médicas.

Tese defendida e aprovada em 27 de Abril de 2020.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Taís Gratieri

Universidade de Brasília – UnB

Prof.^a Dr.^a Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Universidade de Brasília – UnB

Prof.^a Dr.^a Gislaine Ribeiro Pereira

Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

Dr.^a Lígia Marquez Almeida

Universidade Federal de Goiás – UFG

Prof.^a Dr.^a Lorena Carneiro Albernaz

Universidade de Brasília – UnB

Brasília, 2020

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, **Professora Dr^a Taís Gratieri**, por ter topado, mais uma vez, trabalhar comigo. Lá se vão sete anos desde o dia que nos conhecemos numa banca de professor e conversamos sobre um projeto de mestrado. De lá pra cá, foram muitos ensinamentos, conversas, conselhos, alguns puxões de orelha e um empurrão enorme para a realização de um dos meus maiores sonhos: estudar fora do país.

Agradeço à **Universidade de Brasília**, por ter sido o palco para meu desenvolvimento e por ainda resistir e mostrar que a ciência e a educação são importantes; ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**, seus funcionários e docentes que colaboraram com o bom andamento de meu trabalho; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro sob forma da bolsa de doutorado e da bolsa de doutorado sanduíche com a qual pude passar um ano trabalhando com um dos grupos mais importantes da minha área, na Suíça; e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (**FAP-DF**), também pelo apoio financeiro para a participação de congressos científicos.

Aos professores do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (LTMAC), em especial o **Dr Guilherme Martins Gelfuso**, por seus conselhos e por confiar a mim grandes responsabilidades dentro do grupo. Aproveito para agradecer a todos os colegas e técnicos de laboratório do LTMAC que me acompanharam ao longo destes anos e aos grandes amigos que o grupo me trouxe: **Breno Noronha, Lorena Malaquias, Maíra Teixeira, Paula Martins, Tamara Damasceno e Thaiene Ávila**. Nossas resenhas e o suporte que demos um para o outro, com certeza, foram essenciais e sou eternamente grato por ter vocês em minha vida fora do laboratório, também.

Agradeço aos **alunos, professores responsáveis** e aos **técnicos dos laboratórios de Ensino, Controle de Qualidade e Farmacognosia**, por cederem seus espaços, material, experiência e pessoal para que eu pudesse desenvolver meus experimentos. Um agradecimento em especial à aluna **Laís da Silva Moraes**, do Laboratório de Farmacognosia que me auxiliou (e ainda auxilia) nos ensaios microbiológicos. Estendo, também, os agradecimentos ao **Professor Dr Fernando Fabríz Sodré**, do laboratório AQQUA, da UnB, por ter disponibilizado o espaço e

seu então aluno, agora **Doutor, Thiago Rosa Sampaio**, a quem devo muito do que aprendi sobre espectrometria de massa.

Ao Professor **Yogeshvar N. Kalia**, da Université de Genève, que me recebeu em seu grupo e contribuiu de maneira incrível para meu crescimento acadêmico e pessoal. Estendo o agradecimento aos amigos de vários cantos do mundo que Genebra me deu: **Aditya Darade, Gisela Gonzalez, Jonathan Faro, Julie Quartier, Si Gao, Somnath Kandekar, Vasundhara Tyagi** e, especialmente, à **Maria Lapteva**, que me acompanhou de perto e a quem devo muito do que aprendi em meu período lá.

À minha **família**, em especial à minha mãe **DeJota** (Júnia Belém) e minha **Tia Dedé** (Maria José). Agradeço também a meu pai **Leonardo de Sá**. O apoio incondicional de vocês e o suporte às minhas buscas nunca será suficientemente retribuído.

Ao meu **irmão, Júlio Augusto**, pela parceria e suporte em todos os momentos e por ter me apresentado a sua turma, pessoas que há muito tenho como irmãs e irmãos mais velhos: **Álvaro “Batata” Álvares, Daniel “Florinda” Toledo, Esdras Daniel, Raphaell “Chapolin” Resende, Reinaldo “Caneca” da Costa, Rodrigo “Baita” Botero, Talita e Tatiana Yokoy**. Amigas e amigos que dão broncas, me divertem, me respeitam e me incentivam a perseguir meus sonhos, festejam minhas conquistas e me ajudam a ser uma pessoa melhor, como bons irmãos que são.

Aos meus também irmãos de coração **Pedro Bürgel** e **Raffael Araújo**, que a vida acadêmica felizmente me agraciou. Nossa amizade já demonstrou não ter fronteiras geográficas e tenho um orgulho enorme de ter vocês como amigos, parceiros na ciência, nas risadas, nos anseios da vida de pós-graduandos e nas experiências gastronômicas de cunho duvidoso e pouco saudável.

Guardo o último e mais caloroso obrigado à minha esposa, **Marieli Andréia Wisnieski**. Seu amor, companheirismo e dedicação são sem igual. Você me mostrou o que é ser feliz e que não é preciso muito, basta estar com quem amamos. No passado, não imaginava ser capaz de ter alguém ao meu lado neste ponto da vida, quanto mais uma companheira de aventuras tão incrível, capaz de ver o melhor em mim, mesmo quando eu não enxergo. Obrigado, amor. O futuro é nosso!

“The important thing is not to stop questioning.

Curiosity has its own reason for existence.

*One cannot help but be in awe when he
contemplates the mysteries of eternity,
of life, of the marvellous structure of reality.
It is enough if one tries merely to comprehend
a little of this mystery each day.*

Never lose a holy curiosity.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A leishmaniose cutânea (LC) é uma doença infecciosa de alta prevalência no Brasil, cujos tratamentos convencionais agregam fortes reações adversas em função da alta toxicidade dos compostos utilizados e vias de administração preconizadas. Estudos vêm testando a utilização da paromomicina (PAR), um antibiótico aminoglicosídeo, para o tratamento tópico das lesões, principalmente, sob forma de cremes, pomadas, géis, em concentrações que variam de 10 a 20%. Devido às suas características físico-químicas, a PAR possui limitada penetração cutânea. Portanto, sua eficiência (bem como o custo do tratamento – fator extremamente relevante considerando o perfil socioeconômico da população mais afetada) poderia ser melhorada otimizando-se o sistema de liberação, de maneira a aumentar a penetração do fármaco na lesão, mesmo com uma menor dosagem incorporada na formulação. Deste modo, foi proposto o desenvolvimento de um sistema de liberação de PAR baseado em um gel termorreversível de poloxamer 407 contendo o fármaco. Foram obtidos géis fluidos em temperatura ambiente, mas que gelificam em temperaturas próximas às da pele. Isso permitiu a deposição de maiores quantidades de fármaco nas camadas cutâneas, em experimentos *in vitro* de permeação em pele de orelha porcina, tendo uma pomada de PAR 15% como controle. A deposição por estes géis chegou a aumentar mais de 100x quando testados em modelos de pele porcina lesionada (sem o estrato córneo), depositando quantidades superiores a 1 mg em uma área de apenas 2 cm². A utilização da técnica de iontoforese para potencializar a liberação do fármaco também foi avaliada, demonstrando ser uma interessante opção a ser utilizada, por exemplo, ao início da farmacoterapia, para a liberação de uma dose de ataque. Acredita-se, assim, que o uso concomitante desta técnica e a aplicação tópica do gel de paromomicina para a estabilizar as doses de manutenção, poderia agregar uma significativa melhora no desempenho do fármaco, melhorando a aceitabilidade ao tratamento e a recuperação da qualidade de vida do paciente.

Palavras-Chave: Leishmaniose cutânea; Paromomicina; Poloxamer 407; Penetração cutânea; Iontoforese.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a highly prevalent infectious disease in Brazil, in which conventional treatments add strong adverse reactions due to the high toxicity of the compounds used and the recommended administration routes (usually invasive). Studies have been testing the use of paromomycin (PAR), an aminoglycoside antibiotic, for the topical treatment of these types of lesions, mainly in the form of creams, ointments, and gels, in concentrations ranging from 10 to 20%. Due to its physicochemical characteristics, PAR has limited skin penetration. Therefore, its efficiency (as well as the treatment costs - an extremely relevant factor when considering the socioeconomic profile of the population primarily affected) could be improved by optimizing the delivery system, in order to increase the penetration of the drug into the lesion, even in less concentrated formulations. Thus, the development of a PAR release system based on a poloxamer 407 thermoreversible gel containing the drug was proposed. The gels obtained were fluid at room temperature, but gel-like at temperatures close to those of the skin. This allowed higher concentrations of drug to be deposited the skin layers, when compared to a PAR 15% ointment, used as a control in *in vitro* porcine skin permeation experiments. The drug deposition by these gels was increased by more than 100x when tested on models of injured porcine skin (without the stratum corneum), depositing amounts greater than 1 mg in an area of only 2 cm². The use of the iontophoresis technique to enhance drug release was also evaluated, proving to be an interesting tool to be used, for example, at the beginning of the pharmacotherapy, for the release of a loading dose. It is believed, therefore, that the concomitant use of this technique with the topical application of paromomycin gel to stabilize maintenance doses, could add a significant improvement to the performance of the drug, improving the acceptability of the treatment and the recovery of the patient's quality of life.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; Paromomycin; Poloxamer 407; Cutaneous penetration; Iontophoresis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ciclo de vida da *Leishmania sp.* em humanos. Fonte: adaptado de CDC <<http://goo.gl/h5Apj1>>. 4
- Figura 2:** Mapa demonstrativo do Índice Composto de Leishmaniose Triênio 2016-2018. O mapa apresenta os casos das formas cutânea e mucocutânea, porém, 4,9% do total de casos correspondeu a esta segunda forma. Fonte: Informe Epidemiológico das Américas, OPAS⁶. 6
- Figura 3:** Estrutura molecular da paromomicina. Peso molecular 615,6 Da. Fonte: autoria própria. 9
- Figura 4:** Diferentes técnicas para o preparo dos géis contendo a formulação e seus respectivos placebos. (A): processo de dispersão passiva, com o polímero sendo disposto sobre a solução e levado à refrigeração quando, por meio da gravidade e interações físico-químicas será solubilizado e (B): processo com dispersão ativa, por meio de agitação magnética e posterior solubilização sob refrigeração, overnight. Autoria própria.23
- Figura 5:** Processo de excisão da pele em orelha porcina para ensaios de permeação cutânea *in vitro*. Fonte: DAMASCENO, 2018⁹².26
- Figura 6:** Discos de pele de orelha porcina recordados para ensaios de permeação cutânea *in vitro*. (A) Disco recortado logo após limpeza/preparo da pele; (B) Discos recém retirados do congelamento, ainda embalados. Fonte: registros do autor.26
- Figura 7:** Recorte da área difusional após os experimentos de permeação. Após seu recorte, os discos internos são picotados para facilitar a extração do fármaco retido. Fonte: registros do autor.27
- Figura 8:** Esquema de preparo do eletrodo negativo (cátodo) de cloreto de prata (AgCl). 1: fio de prata com alça moldada na ponta; 2: imersão da alça em AgCl fundido; 3: alguns segundos após a retirada da alça de prata do AgCl, o sal resfria e se solidifica, formando o eletrodo de AgCl. Fonte: ilustração adaptada de SÁ⁹⁴.29
- Figura 9:** Processo de redução do eletrodo de cloreto de prata (AgCl, negativo) para a obtenção do eletrodo de prata (Ag, positivo). Fonte: ilustração adaptada de SÁ⁹⁴.30
- Figura 10:** Esquema ilustrativo da aplicação de iontoforese em experimentos com células de difusão. As células são conectadas em série – com ânodos em vermelho e cátodos em preto – formando um circuito, em que os ânodos são alocados no compartimento doador e os cátodos, no receptor. Suportes são utilizados para que os eletrodos fiquem suspensos nas soluções, sem qualquer contato direto com peles ou membranas. Fonte: registros do autor.30
- Figura 11:** Ponte salina, composta por agarose 3% em solução salina 0,9%. Fonte: registro do autor.32
- Figura 12:** Esquema ilustrativo da iontoforese aplicada em placa de cultura, utilizando pontes salinas feitas de gel de agarose 3% em solução salina para carrear a corrente. Diferentes disposições das pontes podem ser utilizadas para a realização do experimento. Fontes: registros do autor.32
- Figura 13:** Esquema para teste de resistência à corrente por solução de paromomicina 1% a 1,0 mA por 6 horas. Ensaio realizado no laboratório de Genebra. Fonte: Registros do autor.33
- Figura 14:** Combinações entre fase móvel testadas no desenvolvimento do método de quantificação da paromomicina por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa para análises feitas no laboratório suíço. A combinação destacada foi a única que apresentou boas condições de reprodutibilidade e seguiu para as demais etapas de validação. Fonte: autoria própria.37

- Figura 15:** Cromatogramas ilustrativos de um pico de paromomicina no equipamento suíço (acima) e brasileiro (abaixo), com suas respectivas especificações para o método de análise quantitativa por espectrometria de massa. Fonte: autoria própria.38
- Figura 16:** Triplicatas das curvas analíticas da paromomicina em solução diluente, tampão e extrato de pele diluídos nas concentrações de 0,25 a 4 µg/mL de fármaco. À esquerda, resultados das curvas no laboratório brasileiro e à direita, as do suíço.....40
- Figura 17:** Formulação com separação de fases - evento de desestabilização mais comum entre as formulações preparadas. Fonte: Registros do autor.....46
- Figura 18:** Gráfico representativo da região viscoelástica linear da formulação FC-09.49
- Figura 19:** Gráfico representativo do perfil reológico da formulação FC-04. O destaque em vermelho indica a intersecção dos módulos elástico (G') e viscoso (G''), que caracteriza o início do estágio de transição sol-gel. ...49
- Figura 20:** Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos dois principais constituintes dos géis, a paromomicina (PAR) e o poloxamer 407 (P 407), bem como da mistura física (1:1, p/p) de ambos. As faixas em cinza destacam as regiões onde ocorrem os principais eventos térmicos da PAR, que se mantiveram quando em mistura.53
- Figura 21:** Primeira derivada das curvas de perda de massa das análises termogravimétricas (TGA) dos dois principais constituintes dos géis, a paromomicina (PAR) e o poloxamer 407 (P 407), bem como da mistura física (1:1, p/p) de ambos. As porcentagens exibidas indicam as perdas de massa da amostra no intervalo dos principais eventos térmicos originadores de perda de massa de cada composto (destacados em cinza).53
- Figura 22:** Gráfico representativo do perfil de liberação da paromomicina pelos géis desenvolvidos e por uma solução-controle de paromomicina 5% em água.53
- Figura 23:** Quantidade total paromomicina recuperada das peles após 6 horas de experimento de permeação cutânea passiva com diferentes formulações. *ns: p > 0,05; * = 0,01 < p < 0,05*.....56
- Figura 24:** Comparativo entre as quantidades de paromomicina recuperadas após ensaio de permeação passiva em pele íntegra e lesionada ao longo de 6 horas, com exceção, apenas, da solução de paromomicina 1% no ensaio em pele lesionada, foi analisada após 30 minutos. *ns: p > 0,05; * = 0,01 < p < 0,05*.58
- Figura 25:** Iontoforese em soluções de paromomicina. Diferentes concentrações de fármaco, intensidades de corrente e tempos de aplicação. Amostras analisadas com aplicação de iontoforese em pele íntegra, a não ser quando indicado o oposto. (*P*): ensaio passivo; (*L*): pele lesionada; *ns: p > 0,05; * = 0,01 < p < 0,05*.60
- Figura 26:** Estudo de biodistribuição apresentando a quantidade de fármaco que foi recuperada nas diferentes profundidades da pele em função da área de aplicação. A figura à direita ilustra de forma aproximada a profundidade em que o fármaco foi recuperado. Fonte: Dados do autor, figura retirada de <<https://bit.ly/2LulkwY>>, com adaptações.61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Demonstrativo parâmetros e especificações utilizados no desenvolvimento da metodologia de identificação e quantificação da paromomicina por LC-MS nos equipamentos suíço (LC-MZ-SZ) e brasileiro (LC-MS-BR).	16
Tabela 2: Modelo de delineamento das formulações com concentrações fixas do fármaco e variações crescentes do polímero até a razão de 1:1 (polímero:água, p/p).	22
Tabela 3: Modelo de delineamento das formulações com concentrações fixas do polímero (P407) e concentrações crescentes do fármaco (paromomicina), variando de 0,0% a 2,0%.	22
Tabela 4: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) da paromomicina dos três diferentes solventes utilizados nas análises: solução diluente de H ₂ O:Acetonitrila (70:30 + 0,1% AF), tampão HEPES e extrato de pele diluído. Limites apresentados para os dois equipamentos utilizados.....	41
Tabela 5: Dados de precisão e exatidão intracorrida e intercorrida no LC-MS-BR. DP: desvio padrão (5 replicatas), CV: coeficiente de variação.	42
Tabela 6: Dados de precisão e exatidão intracorrida e intercorrida no LC-MS-SZ. DP: desvio padrão (5 replicatas), CV: coeficiente de variação.	42
Tabela 7: Avaliação inicial das formulações preparadas com base na segunda abordagem de delineamento. As formulações ressaltadas apresentaram-se estáveis em período superior a 24 horas do término de seu preparo. As duas formulações com destacadas com preenchimento em verde foram selecionadas para prosseguir com os demais estudos do trabalho.	47
Tabela 8: Resultado das análises de reologia dos géis com e sem fármaco. A temperatura de transição T _{sol-gel} foi interpretada como sendo a temperatura referente ao ponto no gráfico onde os módulos elástico (G') e visco (G'') se cruzam. Os dados de viscosidade aparente apresentados foram escolhidos para representar três diferentes condições de temperatura: uma abaixo da temperatura de transição (20 °C); a temperatura média da superfície da pele e o primeiro ponto de temperatura aferido logo após a fase de transição.	50
Tabela 9: Avaliação inicial do pH e condutividade das formulações. Ensaio em triplicata.	51
Tabela 10: Resumo dos resultados de estabilidade das formulações de paromomicina em gel de poloxamer 407. Análises feitas ao longo de 6 meses com amostras mantidas em geladeira. T: tempo em dias.	53
Tabela 11: Compilado das permeações de paromomicina em pele de orelha porcina lesionada ou não e de modo passivo, ou iontoforético.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido fórmico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Ácido trifluoroacético
CV	Coefficiente de variação
DMEM	do inglês, Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria diferencial de varredura (do inglês, <i>differential scanning calorimetry</i>)
E%	Exatidão
EPR	Erro padrão relativo
ESI	Ionização por electrospray (do inglês, <i>electrospray ionization</i>)
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high pressure liquid chromatography</i>)
ICH	Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (do inglês, <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
LC	Leishmaniose cutânea
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês, <i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>)
LC-MS-BR	Equipamento de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas utilizado para os ensaios no laboratório brasileiro
LC-MS-SZ	Equipamento de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas utilizado para os ensaios no laboratório suíço
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação

LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MEM	Meio essencial mínimo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAR	Paromomicina
R%	Recuperação
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês, <i>thermogravimetric analysis</i>)

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1. LEISHMANIOSE: ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA.....	4
3.2. LEISHMANIOSE CUTÂNEA	5
3.2.1. Epidemiologia	5
3.2.2. Fisiopatologia e Características das Lesões.....	6
3.2.3. Tratamento	8
3.3. PAROMOMICINA	9
3.3.1. Atividade da PAR.....	10
3.3.2. Metodologias de Quantificação da PAR.....	10
3.4. INCORPORAÇÃO DE PAR EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO.....	11
3.5. GÉIS TERMORREVERSÍVEIS	12
3.5.1. Géis de Poloxamer	12
3.6. IONTOFORESE	12
4. MATERIAIS & MÉTODOS	14
4.1. MATERIAIS.....	14
4.1.1. Fármaco e Reagentes	14
4.1.2. Peles	14
4.2. METODOLOGIA	14
4.2.1. Método Analítico	14
4.2.2. Validação do Método Analítico	16
4.2.3. Estudos de Pré-Formulação.....	21
4.2.4. Delineamento e Preparo das Formulações	21
4.2.5. Caracterização da Formulação	23
4.2.6. Estabilidade dos Géis.....	24
4.2.7. Perfil de Liberação <i>in vitro</i> da Paromomicina.....	24

4.2.8. Ensaio <i>in vitro</i> de Permeação Cutânea em Pele Íntegra	25
4.2.9. Ensaio <i>in vitro</i> de Permeação Cutânea em Modelo de Pele Lesionada.....	28
4.2.10. Ensaio de Iontoforese	29
4.2.11. Ensaio Microbiológicos	34
4.3. ANÁLISE DOS DADOS.....	34
5. RESULTADOS & DISCUSSÃO	36
5.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	36
5.1.1. Seletividade.....	38
5.1.2. Linearidade e Curva Analítica	39
5.1.3. Limites de Detecção e Quantificação.....	40
5.1.4. Precisão e Exatidão.....	41
5.1.5. Recuperação do Fármaco	43
5.2. ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	43
5.2.1. Análises Térmicas.....	43
5.3. DELINEAMENTO DAS FORMULAÇÕES.....	45
5.4. CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS DE PAROMOMICINA	47
5.4.1. Aspectos Gerais das Formulações	47
5.4.2. Verificação Comportamento Reológico.....	48
5.4.3. Avaliação do pH e Condutividade	51
5.5. ESTABILIDADE DOS GÉIS	51
5.6. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	52
5.7. PERFIL DE LIBERAÇÃO	53
5.8. ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE PERMEAÇÃO DE PAROMOMICINA.....	54
5.8.1. Permeação Passiva em Pele Íntegra	55
5.8.2. Permeação Passiva em Pele Lesionada.....	58
5.8.3. Ensaio de Permeação Passiva e Iontoforética em Pele Lesionada	59
5.8.4. Ensaio de Biodistribuição.....	60
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose cutânea (LC) é a mais comum das formas de leishmaniose, chegando a mais de 240 mil novos casos reportados no mundo somente em 2018, mas com uma estimativa de um número real de novos casos entre 3 e 5 vezes maior^{1,2}. Apesar de não apresentar risco direto de morte, a doença gera lesões cutâneas, costumeiramente em áreas mais expostas do corpo como rosto, braços e pernas que, além de servirem como “porta de entrada” para outras infecções, podem gerar deformidades, aumentando a estigmatização e agregando enorme prejuízo do ponto de vista psicológico e social para o paciente^{3,4}.

De acordo com os dados compilados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil teve mais de 15 mil novos casos no ano de 2018, figurando entre os dez países que responderam por aproximadamente 90% dos casos de LC neste dito ano^{5,6}. Estes dados reforçam a necessidade de se lançarem olhares para esta doença que é uma das mais importantes dentre as doenças negligenciadas e que ainda possui um tratamento muito aquém do esperado.

O tratamento das lesões cutâneas da LC costuma ser baseado em função do risco-benefício apresentado ao paciente, uma vez que as lesões tendem a ser autolimitadas e de baixa letalidade e a maioria das opções de tratamento agrega fortes reações adversas em função de sua alta toxicidade e posologia pouco confortável ao paciente. As opções atuais possuem administração, em geral, oral, intramuscular, intravenosa, ou intralesional, com ciclos que podem durar de alguns dias até quatro meses em casos mais extensos ou de recidivas, não havendo alternativas de tratamento tópico atualmente disponíveis no mercado global⁷⁻¹⁵.

A escassez de novos fármacos capazes de tratar a leishmaniose com maior eficiência e menores efeitos adversos pode, porém, ser contraposta com o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos mais adequados, como micro e nanopartículas poliméricas, encapsulamento em polímeros ou lipossomas, dentre outras estratégias. Essas alternativas permitem a utilização de fármacos sabidamente eficazes (e já utilizados em outros protocolos de tratamento) de forma mais eficiente, bem como possibilitam agregar características úteis à uma formulação para uso tópico, como maior adesividade à pele e mucosas, liberação controlada ou sustentada do fármaco e mesmo incorporar ativos cicatrizantes, por exemplo.

A utilização destas linhas de desenvolvimento de novos medicamentos tendem a resultar em um aumento da eficiência do tratamento, possibilitando esquemas posológicos mais adequados e precisos, influenciando diretamente na adesão, resposta ao tratamento e na qualidade de vida do paciente. Isso porque, em alguns casos, alternativas de tratamento tópico das lesões cutâneas poderiam se tornar tão eficientes (se não mais) quanto as alternativas atuais

(em sua maior parte invasivas), e com a vantagem de oferecerem pouca ou nenhuma reação sistêmica – além da facilidade de administração^{10,13,16-19}.

A paromomicina (PAR) é uma molécula já utilizada de forma oral no tratamento da leishmaniose e que, inclusive, vem sendo estudada para o tratamento tópico das lesões decorrentes da leishmaniose cutânea. A questão, porém, está no fato de que grande parte dos estudos feitos para se verificar o potencial da PAR por via tópica utilizam concentrações altas do fármaco (entorno de 15%), o que acarreta em custos mais elevados e um risco mais alto de reações adversas, além de não apresentarem um olhar mais técnico acerca do veículo utilizado^{7-12,15}. Por ser um fármaco altamente hidrofílico, a escolha de um veículo adequado para sua liberação faz-se necessária para que sua eficiência seja aumentada e este campo, até o momento, aparentemente foi pouco explorado.

A incorporação da paromomicina em um sistema de liberação mais adequado poderia facilitar sua liberação no local de ação, melhorar sua absorção e possibilitar a redução da quantidade de fármaco na formulação reduzindo, conseqüentemente, a possibilidade de reações adversas e até, possivelmente, o custo do tratamento – a depender dos componentes e processo de fabricação envolvidos.

Além do desenvolvimento de formulações mais adequadas, outra alternativa que pode contribuir para um aumento da eficiência da terapia farmacológica é a utilização de técnicas adjuvantes de promoção da penetração cutânea de fármacos. Um bom exemplo é a iontoforese. Esta é uma técnica de fácil execução, baseada na aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade sobre o local a ser tratado, visando aumentar a penetração e/ou permeação de moléculas carregadas através da pele. Esta técnica, não-invasiva, é indolor e já é utilizada há décadas em diversos tratamentos, inclusive na aplicação de anestésicos em crianças, com bastante sucesso²⁰⁻²⁴. Sua aplicabilidade neste caso em específico está no fato de poder promover uma melhora ainda mais significativa no tratamento tópico das lesões cutâneas, possibilitando o acesso de um tratamento mais eficiente, inclusive em regiões de difícil acesso a instalações de saúde mais bem estruturadas, uma vez que não necessita de grande treinamento ou equipamentos sofisticados. Além disso, devido às suas características físico-químicas, a paromomicina, que possui cinco grupamentos polares, seria uma candidata bastante adequada à aplicação da iontoforese.

Assim, é possível perceber que, apesar da escassez de novos fármacos, ainda há campo para serem pesquisadas alternativas de tratamento mais viáveis, utilizando os compostos já existentes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Este projeto tem por objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar um gel termorreversível contendo paromomicina, visando sua aplicação tópica para o tratamento de afecções decorrentes da leishmaniose cutânea. Pretende-se, também, avaliar a influência da aplicação da iontoforese na melhora da capacidade de penetração e/ou permeação cutânea da paromomicina quando veiculada sob forma de uma solução tópica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento de sistemas de liberação contendo paromomicina em solução e em géis de poloxamer;
- Caracterização dos géis obtidos quanto a características morfológicas e físico-químicas e estabilidade;
- Avaliação *in vitro* da cinética de liberação da paromomicina a partir das formulações desenvolvidas;
- Avaliação *in vitro* da capacidade de penetração do fármaco em pele porcina através das formulações desenvolvidas;
- Avaliação *in vitro* da capacidade de penetração do fármaco em modelos de pele íntegra e lesionada através das formulações desenvolvidas;
- Avaliação *in vitro* da viabilidade da aplicação da técnica de iontoforese em ensaios microbiológicos;
- Avaliação do impacto da aplicação da iontoforese na capacidade de liberação e aumento da penetração da paromomicina em pele porcina, a partir de uma solução do fármaco;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. LEISHMANIOSE: ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA

A leishmaniose é uma doença infecciosa e de caráter não-contagioso, tendo sua transmissão para o ser humano feita de forma vetorial e estando presente em dezenas de países ao redor do globo, com maior incidência entre os das zonas tropicais e subtropicais. É causada por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que atingem o sistema fagocítico mononuclear (afetando macrófagos, células dendríticas e outras), onde se reproduzem e disseminam pelo organismo.

Os protozoários são transmitidos para o ser humano através da picada da fêmea de flebotomíneos, principalmente espécies dos gêneros *Phlebotomus* (África, Ásia e Europa) e *Lutzomyia* (Américas), vulgarmente conhecidos por “mosquitos-palha”, previamente infectadas ao picar e sugar o sangue de um outro humano ou animal reservatório já infectado – sendo os canídeos, felinos, algumas espécies de marsupiais (como gambás), roedores (como ratos e camundongos), cavalos e edentados (como tatus e tamanduás), os reservatórios mais comumente encontrados, seja em ambiente selvagem ou doméstico^{7,14,15,25}. O ciclo geral do protozoário pode ser conferido na Figura 1, a seguir.

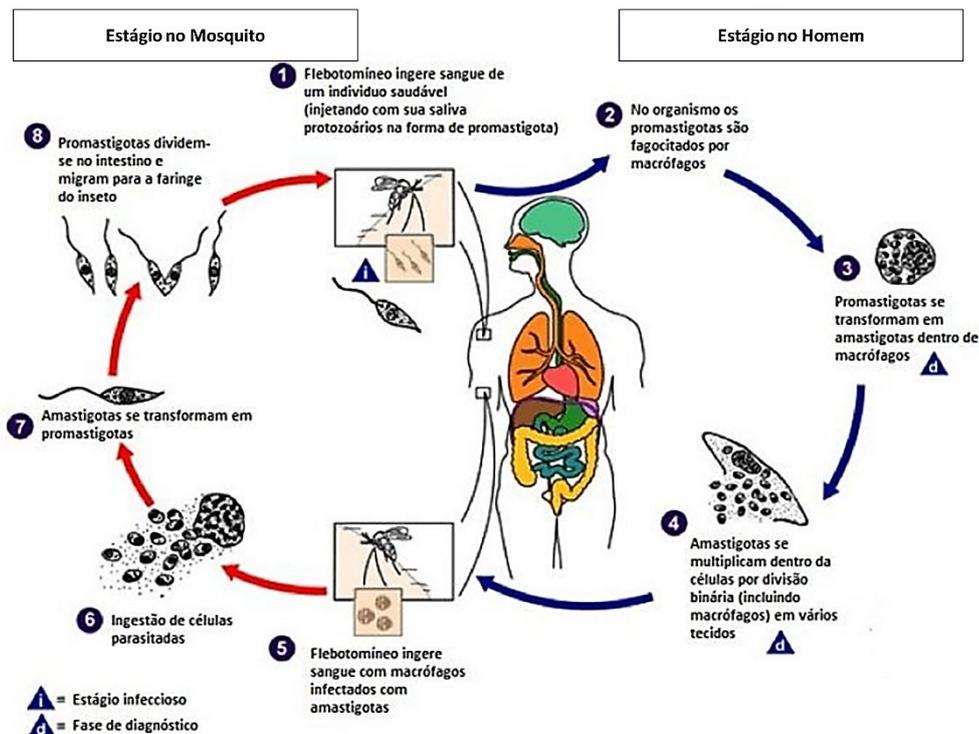


Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania sp.* em humanos. Fonte: adaptado de CDC <<http://goo.gl/h5Apj1>>.

De um modo geral, do ponto de vista clínico, apesar de diferenças terminológicas e conceituais apresentadas em diferentes trabalhos e publicações oficiais a nível global^{7,15,25}, a infecção em humanos pode ser dividida em três formas clínicas principais: a visceral, forma mais grave, podendo levar a óbito quando não tratada em tempo e adequadamente; a cutânea, forma mais prevalente dentre os tipos de leishmaniose (podendo ser localizada ou difusa) e a mucocutânea, forma que afeta principalmente a mucosa oral e do trato respiratório superior. A forma clínica com a qual a infecção se apresentará está relacionada com fatores como a espécie de *Leishmania* que originou a infecção, a existência de coinfeções e outros possíveis fatores, como fatores ambientais, características genéticas e condições imunológicas e fisiológicas do indivíduo infectado.

3.2. LEISHMANIOSE CUTÂNEA

3.2.1. Epidemiologia

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma clínica mais prevalente da doença em termos globais, respondendo por aproximadamente três quartos do total de casos de leishmanioses. Estima-se que entre 600 mil e 1 milhão de novos casos surjam todos os anos^{5,26,27}. Cerca de 75% dos casos novos registrados no mundo ocorrem em apenas 5 países: Afeganistão, **Brasil**, Irã, Iraque e Síria. Há, atualmente, entorno de 100 país endêmicos para a LC, colocando mais de 430 milhões de pessoas em situação de risco^{6,28}. Nas Américas, a LC é o principal acometimento da chamada Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

A expansão de áreas urbanas e periurbanas para zonas rurais e florestais, além da elevada domesticação de animais, faz com que o parasito, seus vetores e reservatórios, sejam expostos cada vez mais ao contato com população geral^{26,29-31}. Na América do Sul, há uma média anual de 54.950 casos reportados para LC. No ano de 2018 houve uma redução no número para 46.041, sendo que o Brasil respondeu por 34% destes, com 15.632 casos. Aqui no país, a LC é uma das apresentações ocorre por todo território, mas com maior intensidade na região Norte e em parte das regiões Centro Oeste (em especial, o estado de Mato Grosso) e Nordeste^{5,6}.

Dados mostram que entre 2003 e 2018 foram registrados mais de 300 mil casos no país, com média de 21.158 casos por ano³².

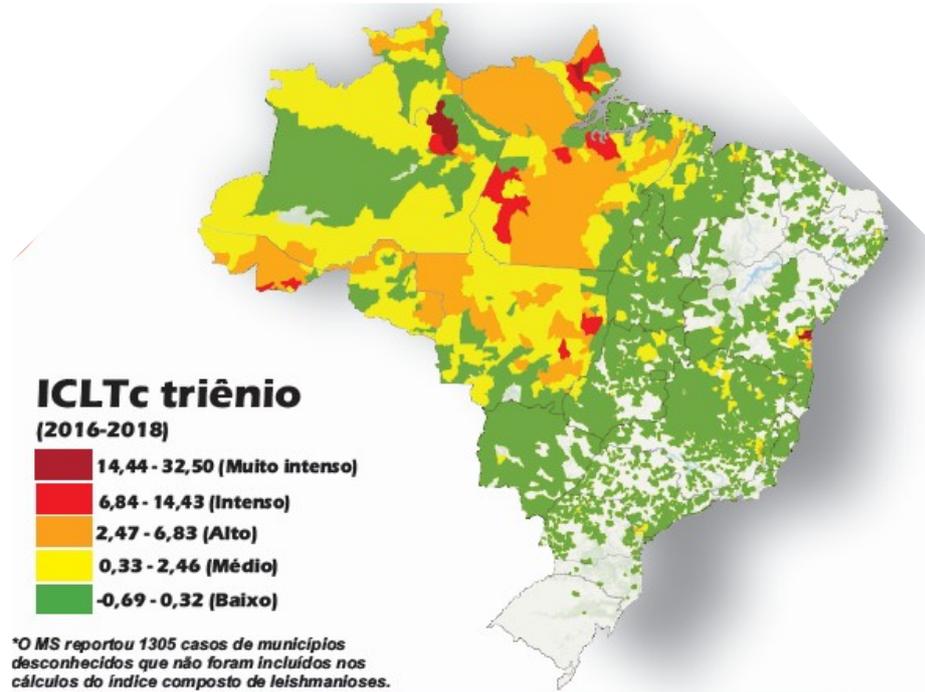


Figura 2: Mapa demonstrativo do Índice Composto de Leishmaniose Triênio 2016-2018. O mapa apresenta os casos das formas cutânea e mucocutânea, porém, 4,9% do total de casos correspondeu à esta segunda forma. Fonte: Informe Epidemiológico das Américas, OPAS⁶.

Há entorno de 20 espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomia* reconhecidas como vetores da LC no Brasil. Os registros mais recentes de infecção listam as espécies *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, como os principais agentes etiológicos da LC aqui no país^{1,6}.

3.2.2. Fisiopatologia e Características das Lesões

Na forma cutânea, os primeiros sinais costumam surgir após um período de incubação que pode durar de duas a oito semanas aproximadamente (para algumas espécies de parasito e a depender do estado de imunocompetência do paciente, este período pode se prolongar por meses a anos). Em geral, são lesões bem demarcadas, no local da picada do inseto que se parecem, num primeiro momento, como máculas que evoluem para pápulas ou nódulos pruriginosos no local da inoculação (com a possibilidade de lesões satélites), que podem, por sua vez, evoluir para úlceras rasas e pouco dolorosas, com formato ligeiramente ovalado ou arredondado, bordas firmes e elevadas, interior geralmente eritematoso, com diâmetro variando de poucos milímetros até alguns centímetros^{33,34}. As úlceras costumam apresentar infiltração parasitária em suas bordas, sendo mais pronunciadas em lesões causadas pela infecção por *L.*

(*L.*) *amazonensis*. As bordas Estas lesões podem regredir e curar-se espontaneamente após meses ou anos, mas costumam deixar marcas e cicatrizes ^{7,11,12,14,15,25}.

A forma cutânea difusa, por sua vez, pode apresentar, após seu período de incubação, máculas, pápulas, nódulos e mesmo placas que podem se estender pelo corpo, principalmente nos membros e face, semelhantemente às lesões causadas pela hanseníase. As manifestações cutâneas desta forma não se curam espontaneamente e, apesar de responderem bem ao tratamento padrão no início, recidivas pouco responsivas ao tratamento são comuns ^{7,11-15}.

3.2.2.1. Interação Parasito-Hospedeiro

O protozoário causador da leishmaniose, *Leishmania spp.* é um parasito intracelular, o que significa que ele necessita estar dentro de células do hospedeiro para dar continuidade a seu ciclo de vida. O mecanismo pelo qual esses protozoários infectam as células e qual o papel dos tecidos adjacentes à infecção, porém, apenas há pouco começaram a ser melhor elucidados ³⁵.

O sucesso infecção por *Leishmania* está intimamente relacionado à capacidade de resposta imunocompetente do indivíduo e depende de uma série de eventos pré e pós sua instalação nas células do sistema imune (em especial, os macrófagos). Ao menos três destes eventos considerados determinantes já foram identificados: ação do sistema complemento, a adesão do parasito à membrana dos macrófagos e o processo de fagocitose pelos macrófagos^{14,29,30,36}.

Foi demonstrado que a existe uma grande interação entre o parasito e a matriz extracelular (MEC) no local da picada por onde os protozoários foram inoculados. Logo após a inoculação do parasito, há a ativação do sistema complemento – um dos principais agentes líticos e limitadores da instalação da infecção. Ele, porém, não é totalmente eficiente em função da presença de promastigotas metacíclicas, que são formas resistentes do parasito e que possuem mecanismos de defesa e fixação de componentes do complemento, além de interagir com diversos componentes da matriz extracelular, ainda no local da infecção. Nestes momentos seguintes à introdução do parasito no organismo, há uma alteração no arranjo da malha de fibras de colágeno tipo I (tipo mais presente na MEC) facilitando a movimentação e criação de bolsões de protozoários, que seriam uma etapa facilitadora para uma cadeia de reações que culminarão na internalização dos promastigotas pelas células do hospedeiro ^{35,37,38}.

Os promastigotas, nesse primeiro momento, ainda não estão prontos para serem fagocitados, pois necessitam de estímulos que só são obtidos com a presença dos macrófagos na região – ocorre uma relação quase paradoxal, uma vez que a mesma célula responsável por

conter a infecção é, também, responsável por possibilitar o amadurecimento do parasito até a fase em que este se torna resistente o suficiente para se deixar ser capturado pelo macrófago, mas não para sua destruição e, sim, para sua reprodução e perpetuação da infecção.

Uma vez prontas para serem fagocitadas, as promastigotas metacíclicas, munidas de ligantes presentes na membrana do parasito, ativam moléculas do sistema complemento para facilitar a adesão e posterior fagocitose pelos macrófagos. No processo de fagocitose, o ambiente interno tóxico criado pelo macrófago para a destruição do parasito, com a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico força sua transformação, dentro do vacúolo parasitóforo, para a forma amastigota. Com a formação do fagolisossomo, uma série de outros mediadores químicos aumentam a toxicidade para o parasito que lança mão de diversos mecanismos de modo a viabilizar sua sobrevivência e reprodução dentro da célula hospedeira^{29,30,39}. Dentro do fagolisossomo, os parasitos estão protegidos e livres para se reproduzir até que, em função do volume de organismos, rompe as membranas dos macrófagos e são liberados, gerando novas sinalizações inflamatórias, recrutamento de macrófagos e perpetuação da infecção⁴⁰.

3.2.3. Tratamento

As lesões cutâneas causadas pela LC tendem a se curar espontaneamente, sem ajuda de qualquer tipo de tratamento em boa parte dos casos. Porém, o processo de cura tende a ser bastante lento, podendo levar décadas e, usualmente, resultando na formação de grandes cicatrizes e queloides na região lesionada comprometendo, por vezes, a autoestima do paciente e sua aceitação social^{4,29,33}.

A maioria das opções de tratamento da leishmaniose cutânea agrega fortes reações adversas em função de sua alta toxicidade e posologia pouco confortável ao paciente. Dentre as opções de tratamento disponíveis estão a administração intravenosa, intramuscular ou intralesional de antimoniais pentavalentes (como o antimoniato de meglumina), a infusão intravenosa de anfotericina B, pentamidina (intramuscular ou intravenosa) e administração intramuscular e/ou tópica (em pomadas e cremes) de paromomicina (PAR)^{13,41,42}. A duração dos tratamentos apresentados varia, com ciclos que podem durar de alguns dias até quatro meses em casos mais extensos ou de recidivas⁸⁻¹⁰.

Nas últimas duas décadas, estudos têm demonstrado que a administração de formulações tópicas de PAR pode surtir efeito bastante positivo na regressão e cura destas lesões^{9,11,43-47}, mas nenhuma formulação foi devidamente incorporada nos protocolos de

tratamento oficiais atuais ^{9,10,13}. Muitos destes estudos, inclusive, utilizam formulações farmacêuticas que talvez não seriam as mais adequadas para otimização da liberação do fármaco, utilizando bases pré-formuladas, sem um estudo mais aprofundado que demonstrasse sua adequabilidade.

A utilização de formas farmacêuticas adequadas para a o tratamento e que respeitem as características intrínsecas do fármaco e da doença deve ser a base para a formulação de novas terapias e podem ser o diferencial entre o sucesso e o fracasso da terapêutica. Assim, acredita-se que o desenvolvimento de novas propostas e sistemas de liberação tópica de fármacos, como a PAR, têm a real capacidade de melhorar o tratamento e, portanto, são uma interessante alternativa a ser trabalhada.

3.3. PAROMOMICINA

A paromomicina (PAR) (também chamada de aminosidina) é um antibiótico aminoglicosídeo (como a gentamicina e a amicacina). É derivada da bactéria *Streptomyces rimosus paromomycinus* e considerada como de amplo espectro de ação contra diferentes classes de protozoários e bactérias. Sua molécula (Figura 3) é bastante hidrossolúvel, possui cinco grupamentos amino e peso molecular de 615,5 Da. Estas características acabam limitando sua penetração na pele através do estrato córneo em função das características intrínsecas deste meio⁴⁸⁻⁵⁰ o que, por sua vez, acaba se tornando um fator limitante para o tratamento, exigindo que concentrações mais altas de fármaco sejam utilizadas na formulação de modo compensatório, para viabilizar a penetração de quantidades suficientes do composto para a manutenção de sua ação farmacológica⁵¹.

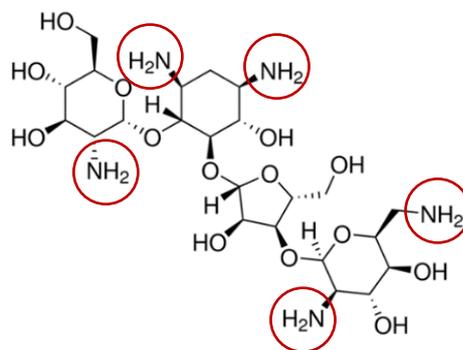


Figura 3: Estrutura molecular da paromomicina. Peso molecular 615,6 Da. Fonte: autoria própria.

3.3.1. Atividade da PAR

A atividade da PAR varia na avaliação para diferentes espécies do gênero *Leishmania* e, inclusive, há discordâncias entre estudos ao longo das últimas décadas^{46,52-56}. Por vezes, a discordância e variabilidade nos resultados pode ser atribuída ao protocolo de teste utilizado (seja para *in vitro* quanto para *in vivo*) e não somente à espécie estudada. O estágio do protozoário também possui influência na sensibilidade ao fármaco, sendo que boa parte dos estudos indicam uma menor sensibilidade pelos protozoários em estágio intracelular (amastigotas)^{53,54,56}.

Informações sobre a atividade *in vitro* (testada em culturas celulares) da PAR estão cada vez mais presentes na literatura, mas, como comentado acima, não há um consenso firmado. A atividade *in vivo* com modelos murinos também tem sido avaliada^{10,56}, porém, pouco se sabe até o momento sobre a correlação entre as características e alterações estruturais da pele quando infectada^{35,37}, e a interação com o fármaco, o que pode ser um ponto chave para se compreender como o fármaco poderia ser mais eficiente para o tratamento.

3.3.2. Metodologias de Quantificação da PAR

A PAR, assim como outros antibióticos de sua família, não possui grupamentos cromóforos, o que inviabiliza sua correta análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *high pressure liquid chromatography*), técnica de quantificação por separação, usualmente acoplada a um sistema de detecção é por ultravioleta ou fluorescência convencional. Nestes casos, um processo anterior, ou posterior à passagem do fármaco pela coluna de cromatografia deve ser feito. Este processo, chamado derivatização, consiste em lançar mão de uma ou mais reações químicas, para transformar um composto em outro (um derivado), melhor detectável, ao alterar grupamentos funcionais específicos da molécula inicial.

Outras técnicas também podem ser acopladas ao sistema de HPLC e também são passíveis de utilização na detecção e quantificação da PAR, como a utilização de colunas de troca iônica, por exemplo^{57,58}. Atualmente, porém, a opção mais interessante é a utilização da detecção por espectrometria de massas⁵⁹⁻⁶². Esta técnica, quando acoplada ao HPLC, possibilita a identificação e quantificação do composto desejado com alta sensibilidade e especificidade, podendo chegar na ordem de partes por bilhão (ppb), o que possibilita a possibilidade de identificação e quantificação a nível traço.

A capacidade desta técnica se mostra bastante interessante à medida que poderá fornecer dados precisos sobre a quantidade de fármaco detectada em cada camada da pele após os ensaios

in vitro de permeação cutânea. Estes dados, juntamente dados microbiológicos da atividade leishmanicida, poderão indicar se as concentrações de fármaco nas diferentes camadas da pele seriam suficientes para eliminar os micro-organismos ali presentes.

3.4. INCORPORAÇÃO DE PAR EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

Estudos indicam que, em casos de lesões não ulcerativas, ou seja, quando a pele permanece intacta, o uso de cremes contendo 15% de PAR e 10% de ureia, não foram efetivos⁶³, enquanto outros apresentaram resultados positivos para formulações com algumas variações em sua composição e forma farmacêutica^{8,41,64}. Dados conflitantes como estes corroboram com a hipótese de que a o veículo utilizado pode estar interferindo na correta liberação do fármaco e, assim, impactando em sua atividade terapêutica. Desde modo, a incorporação da PAR em um sistema de liberação mais adequado poderia, inclusive, reduzir a quantidade de fármaco na formulação reduzindo, conseqüentemente, a possibilidade de reações adversas.

Encontram-se descritos na literatura também formulações lipossomais de PAR^{10,65,66} e em todos esses estudos foi verificado que a formulação lipossomal foi capaz de aumentar a penetração cutânea do antibiótico em pele de camundongos ou em pele de porco, estando a pele intacta ou não. No entanto, nota-se em todos eles que a eficiência de encapsulação do fármaco foi baixa. Ferreira *et al.*⁶⁵ obtiveram no máximo 41,9% de encapsulação enquanto Carneiro *et al.*¹⁰ obtiveram no máximo 13,9% de encapsulação em lipossomas de fosfatidilcolina de soja. Jaafari e colaboradores⁶⁶ obtiveram a maior eficiência de encapsulação (aproximadamente 60%). Apesar da paromomicina ser o fármaco mais barato dentre os compostos utilizados para o tratamento da leishmaniose, ele não é um fármaco barato⁴³. Formulações lipossomais como as desenvolvidas costumam envolver também alto custo de produção, uma vez que os lipídeos utilizados tendem a possuir alto valor agregado. Além disso nenhum destes estudos chegou a avaliar a estabilidade dessas formulações. Muitas vezes condições especiais de armazenamento são necessárias. Por se tratar de uma doença negligenciada, que afeta muitas vezes uma população com baixo desenvolvimento socioeconômico, o custo do tratamento torna-se um fator relevante e que deve ser levado em consideração.

Em função dos motivos citados acima, uma formulação simples, do ponto de vista de sua produção e aplicação, mas capaz de aumentar a penetração do fármaco seria ideal e a chave para se obter este tipo de formulação pode estar na utilização de biopolímeros para a produção de um gel aquoso, cujas características de gelificação podem ser moduladas de acordo com a necessidade de sua aplicação.

3.5. GÉIS TERMORREVERSÍVEIS

Alguns polímeros possuem propriedades intrínsecas de modular suas cadeias em função da energia térmica acumulada no sistema. Como consequência, são capazes de alterar seu estado físico apresentando-se mais fluidos (sol), ou mais viscosos (gel) a depender da temperatura ou pH ao qual estão expostos, por exemplos. Os poloxamers são uma classe de polímeros que apresenta como característica a transição do estado sol-gel em função do aumento de temperatura e, por esta razão, são interessantes candidatos para formulações para gelificação *in situ*.

3.5.1. Géis de Poloxamer

Os poloxamers são copolímeros não-iônicos cujas propriedades (em especial as do chamado poloxamer 407) vem sendo bastante exploradas nas últimas duas décadas⁶⁷⁻⁷¹. Este polímero, biocompatível, é capaz de formar hidrogéis termosensíveis que se apresentam liquefeitos em temperaturas ambiente, porém, gelificam-se na temperatura corporal. A alteração de seu estado sol-gel também pode ser induzida por alterações no pH do meio em que se encontra. Essa propriedade peculiar de transição tem garantido seu emprego como estrutura base para estudos de sistemas de liberação de fármaco em diversas interfaces, como pele e mucosas nasal, oral, anal e ocular, associado a outros biopolímeros para conferir características como mucoadesão, estimulação da cicatrização e outros^{17,67,70-76}.

Essa particularidade dos poloxamers permite que sejam exploradas aplicações com as de formulações inicialmente líquidas, que gelificam no local de sua aplicação, em função da temperatura da pele, os chamados géis *in situ*^{69,70,72,74,77}. Tal característica poderia ser de grande valia no desenvolvimento de um sistema para liberação baseado em dispersão, como um spray que, após a aplicação, gelificaria formando um filme, o que possibilitaria um maior controle da dosagem aplicada, quando comparado a posologias de outros semissólidos, como pomadas e cremes.

3.6. IONTOFORESE

A utilização de técnicas adjuvantes, paralelamente ao tratamento tópico que pretende-se desenvolver, pode ajudar a potencializar o efeito terapêutico da formulação, permitindo ajustes posológicos mais confortáveis e, inclusive, a possibilidade de se conseguir uma melhor relação de custo-efetividade para o tratamento como um todo. Dentre as possibilidades a

iontoforese destaca-se com uma potencial ferramenta, auxiliando na promoção de uma melhora ainda mais significativa no tratamento tópico destas lesões, com baixo custo e fácil aplicação, permitindo o acesso a um tratamento ainda mais eficiente, inclusive em regiões de difícil acesso^{20,51}.

A iontoforese é uma técnica já bastante fundamentada e descrita na literatura, cujos princípios datam do século XVIII e que, nas últimas décadas, vem sendo bastante descrita como mecanismo de auxílio para a liberação e permeação ativa de fármacos topicamente, inclusive em mucosas^{23,78-82}. Ela consiste da aplicação de uma corrente elétrica constante, contínua e de baixa intensidade (usualmente até 0,5 mA/cm²) para estimular a liberação cutânea de moléculas polares e carregadas que, de outra maneira, seriam incapazes de penetrar a pele⁸³. Para a aplicação da iontoforese num tecido, é necessário que haja um compartimento onde o fármaco será aplicado – em que será colocado um eletrodo de mesma polaridade – e um compartimento de retorno da carga, acoplado a um eletrodo de polaridade oposta – e que pode ser alocado em qualquer local do corpo. Assim, a carga do fármaco servirá como um condutor de corrente através da pele^{79,80,84}.

A iontoforese é uma técnica muito utilizada em diversos hospitais do mundo para a aplicação de anestésicos locais pediátricos, justamente por ser uma técnica segura e indolor⁸⁵. Para isso foram desenvolvidos dispositivos miniaturizados e portáteis de aplicação da corrente, alguns possuindo até mesmo desenhos e formatos de motivos infantis para evitar o estranhamento das crianças⁸⁵. Tais dispositivos poderiam, portanto, ser adquiridos pelo SUS por um custo relativamente baixo, trazendo benefício inquestionável para a saúde e bem-estar dos pacientes adultos, pediátricos e idosos. Ainda, o fármaco PAR é um ótimo candidato a ser transportado para a pele por meio iontoforese, uma vez que sua molécula é bastante hidrofílica, polar e cujos grupamentos amino tendem estar ionizados quando em soluções com pH fisiológico.

4. MATERIAIS & MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Fármaco e Reagentes

Para o preparo das formulações (bem como para as todas as análises), foi utilizada a paromomicina (PAR), em forma de sulfato, da Apollo Scientific (Bredbury, Reino Unido). O poloxamer Kolliphor[®] P407, um copolímero não-iônico foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Para as análises de quantificação do fármaco, foi utilizado ácido fórmico $\geq 99\%$ para LC-MS da J.T. Baker[®] (Deventer, Holanda) e acetonitrila LiChrosolv[®] $\geq 99,9\%$ da Merck (Darmstadt, Alemanha). Toda água utilizada neste trabalho foi ultrapurificada em sistema de filtração Milli-Q[®] Direct 8, da Millipore (Illkirch Graffenstaden, França).

Como meio receptor para os ensaios de permeação e liberação, foi preparado um tampão HEPES 25 mM isotonicado em pH 7,4 (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico, sal sódico), adquirido da J.T. Baker (Pensilvânia, EUA).

Demais reagentes e materiais serão descritos em momento oportuno, ao longo da metodologia.

4.1.2. Peles

As peles utilizadas foram obtidas de orelhas retiradas de porcos logo após seu abate comercial (Frigorífico Sabugy, Planaltina, Brasil ou cooperativa de abatedouros CARRE, Rolle, Suíça).

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Método Analítico

A paromomicina não é detectável quando observada por detectores baseados em análise de espectros de emissão/absorção na região de comprimento do UV-visível, ou fluorescência⁸⁶ – metodologias tidas como de primeira escolha em boa parte dos laboratórios. Neste caso, com base em alguns achados na literatura, a espectrometria de massas foi selecionada como método de detecção para o fármaco em questão. As análises do fármaco foram feitas utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS, do inglês *liquid*

chromatography tandem mass spectrometry), que é capaz de detectar compostos com base em seus pesos moleculares, via processos de ionização do(s) analito(s).

4.2.1.1. Equipamentos e Parâmetros

Para as análises, foram utilizados dois equipamentos diferentes, que operam de formas distintas, sendo um na Suíça, outro no Brasil.

O equipamento utilizado no laboratório suíço (LC-MS-SZ, para referências futuras) consistia em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a um detector do tipo massa-massa (UHPLC-MS/MS) composto por um cromatógrafo Waters Acquity UPLC[®] (Baden-Dättwil, Suíça) dotado de bomba binária e amostrador automático, acoplado a um detector Waters XEVO[®] TQ-MS (Baden-Dättwil, Suíça) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *electrospray ionization*). Os dados foram integrados e analisados utilizando o *software* Waters MassLynx[®].

O equipamento utilizado no laboratório brasileiro (LC-MS-BR, para referências futuras) consistia em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a um detector de massas (UHPLC-MS), composto por um cromatógrafo Shimadzu Nexera XR (Quioto, Japão), dotado de duas bombas LC-20AD XR, amostrador automático SIL-20AC XR, forno para colunas CTO-20AC, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e espectrômetro de massas LCMS-2020, com fonte de ionização tipo ESI. Os dados foram integrados e analisados utilizando o *software* Shimadzu LCMS Solution Ver.5.60.

Inicialmente, os parâmetros utilizados nos testes de desenvolvimento do método analítico foram inspirados nos trabalhos de Mokh e colaboradores^{87,88}, testando diferentes variações entre as concentrações de água e acetonitrila, com ou sem acidificação por ácido fórmico (AF), ou ácido trifluoroacético (ATF). As concentrações de água na fase móvel variaram de 50 a 95% (v/v).

Parâmetros como volume de injeção, fluxo da fase móvel, temperatura da fonte de ionização, voltagem de cone e demais critérios referentes à espectrometria de massas também foram testados em diferentes arranjos. As faixas avaliadas estão apresentadas na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1: Demonstrativo parâmetros e especificações utilizados no desenvolvimento da metodologia de identificação e quantificação da paromomicina por LC-MS nos equipamentos suíço (LC-MZ-SZ) e brasileiro (LC-MS-BR).

Parâmetro	LC-MS-SZ	LC-MS-BR
Íon precursor (<i>m/z</i>)	616,3	616,3
Modo de ionização	ESI +	ESI +
Voltagem do cone (V)	2 - 100	2 - 100
Energia de colisão (eV)	2 - 80	-
Íon(s) fragmento (<i>m/z</i>)	324 e 163	455
Temperatura da fonte (°C)	200 - 500	200 - 500
Gás de Colisão	N ₂	N ₂
Fluxo da fase móvel (mL/min)	0,2 - 0,6	0,2 - 0,6
Tempo de corrida (min)	5 - 10	5 - 10
Volume de injeção (µL)	2, 4 e 8	2, 4 e 8
Fase estacionária (coluna)	LiChrospher® 100 C 18 - 5 µm, 4,0 x 125 mm	Discovery® C18 - 5 µm, 4,6 x 150 mm

4.2.1.2. Preparo das Soluções Estoque

O preparo das soluções de PAR também foi feito com base nos trabalhos de Mokh e colaboradores^{87,88}. Inicialmente, foram preparadas soluções-estoque de 100 ppm de fármaco em cada um dos seguintes diluentes: H₂O acidificada com 0,1% AF; H₂O acidificada com 0,1% ATF; solução de H₂O:ACN (70:30) acidificada com 0,1% AF; e solução de H₂O:ACN (70:30) acidificada com 0,1% ATF. As soluções-estoque foram posteriormente diluídas em seus respectivos diluentes até as concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/mL para viabilizar a curva-padrão. Há relatos de que aminoglicosídeos podem interagir com vidro quando expostas por longos períodos, portanto e como medida e precaução, logo após preparo, todas as soluções foram armazenadas em tubos plásticos (*eppendorfs* ou tubos *falcon*) e só entravam em contato com vidro no momento de suas análises, quando eram vertidas em frascos de vidro, próprios para utilização em cromatógrafos (*vials*).

4.2.2. Validação do Método Analítico

Em função de parte projeto ter sido realizada durante o período de “doutorado sanduíche” do aluno em Genebra e do equipamento utilizado operar de forma diferente da do disponível no Brasil – apesar de também ser um sistema de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas –, foram necessários dois métodos de análise distintos para a análise

da PAR e, portanto, foram feitas duas validações: uma no laboratório de suíço e outra no brasileiro.

A metodologia de validação, porém, foi a mesma para os dois equipamentos, seguindo os parâmetros determinados pela ANVISA em sua RDC nº 27/2012⁸⁹, que determina os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos. Complementarmente, foram consultadas a RDC nº 166/2017⁹⁰ (que dispõe sobre a validação de métodos analíticos) e o guia de procedimentos para validação analítica Q2(R1)⁹¹ do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH, do inglês, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*).

As validações foram feitas considerando-se os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão e quanto à capacidade de recuperação do fármaco a partir de amostras de matriz (frações de pele).

4.2.2.1. Seletividade

A seletividade de métodos de detecção baseados em espectrometria de massas se dá pelo próprio caráter seletivo intrínseco da técnica. Ao ser calibrado massas para o analito desejado, o espectrômetro de massas faz a varredura apenas de seu íon precursor e íons produto selecionados. Apesar da possibilidade de algumas moléculas possuírem uma m/z semelhante, seus padrões de fragmentação nunca serão iguais e, portanto, não aparecerão nas análises. Ao analisar os picos do espectro gerado, é possível conferir esses padrões únicos e isolar o analito dos possíveis interferentes para, então, quantificá-lo. A verificação da seletividade do método para a quantificação da paromomicina foi verificada a partir da análise e verificação da presença tanto do íon precursor 615,3, quanto dos íons fragmento 163, 324 e 455. A presença de todos estes íons nas amostras contendo paromomicina e a variação da intensidade de seus picos em função de variações nas concentrações de fármaco da amostra de modo linear permite inferir, com um bom grau de segurança, a seletividade do método.

4.2.2.2. Linearidade e Curva Analítica

A linearidade é o parâmetro responsável por indicar o grau de correlação entre os resultados das análises e a concentração do analito nas amostras, no caso, a concentração de paromomicina.

Para tal, foram montadas três curvas analíticas, que contemplavam as três soluções em que a paromomicina seria analisada: solução diluente, composta por água:acetonitrila (70:30, v/v + 0,1% AF), tampão HEPES 25 mM isotonicado (pH 7,4) e solução diluente contaminada com pele de orelha porcina (de modo a simular o meio extrator dos experimentos *in vitro* de permeação cutânea). As curvas analíticas foram preparadas seguindo do mesmo modo apresentado no item 3.2.1.2, bem como nas concentrações descritas: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/mL.

Todas as curvas foram feitas em triplicata. As áreas dos picos de cada amostra dentro das curvas foram correlacionadas às concentrações utilizando regressão linear, que se vale da equação:

$$y = ax + b$$

Equação I

Onde, para os ensaios realizados, x (concentração do fármaco – variável dependente) é determinado em função do coeficiente linear (a), do coeficiente angular da reta (b) e da área do pico (y), a variável independente da equação.

4.2.2.3. Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) corresponde à menor concentração do analito que seja detectável, porém, não necessariamente quantificável pela metodologia analítica empregada.

Este valor pode ser determinado através da fórmula a seguir:

$$LD = 3,3 \times \frac{\sigma}{IC}$$

Equação II

Em que σ corresponde ao desvio padrão do intercepto com o eixo y a partir de três curvas de calibração contendo concentrações de PAR próximas ao suposto limite de detecção e IC representa a inclinação da curva de calibração (coeficiente angular).

4.2.2.4. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração de analito detectável e quantificável de forma confiável por meio da metodologia analítica empregada. De modo similar ao LD, o LQ pode ser determinado em função de uma equação, que se segue:

$$LQ = 10 \times \frac{\sigma}{IC}$$

Equação III

Em que, do mesmo modo que o LD, σ corresponde ao desvio padrão do intercepto com o eixo y a partir de três curvas de calibração contendo concentrações de PAR próximas ao suposto limite de detecção e IC representa a inclinação da curva de calibração (coeficiente angular).

4.2.2.5. Precisão

As análises de precisão do método analítico contemplaram as avaliações da precisão intracorrída e precisão intercorrída. A precisão intracorrída, também interpretada como análise de repetibilidade, designa a avaliação feita entre amostras avaliadas em sequência, em um mesmo dia. As análises de precisão intercorrída contemplaram corridas realizadas em três dias distintos. Para cada análise foram feitas determinações dos seis pontos delimitados na curva analítica. Todos os pontos foram preparados em quintuplicata.

A precisão foi verificada analisando-se o grau de concordância entre as amostras de cada ponto, expresso pelo coeficiente de variação, determinado pela equação:

$$CV = \left(\frac{\sigma}{m} \right) \times 100$$

Equação IV

Onde σ representa o desvio padrão entre os resultados de um dado ponto e m é a média dos valores obtidos em tais replicatas. Para ser considerado preciso, o método não pode apresentar valores de CV superiores a 15%, com exceção do limite inferior da curva, cuja desvio aceitável era de até 20%.

4.2.2.6. Exatidão

A exatidão denota a capacidade do método analítico apresentar resultados que condizem com os valores teóricos (concentração nominal). As determinações foram feitas concomitantemente aos ensaios de precisão, valendo-se dos dados destas análises para sua verificação. Para a exatidão (E%), expressa em função do erro padrão relativo (EPR), os valores não poderiam ultrapassar os 15% de variação, excetuando-se o limite inferior da curva, cuja desvio aceitável era de até 20%, de acordo com a equação a seguir:

$$E\% = \frac{(cme - cn)}{cn} \times 100$$

Equação V

Sendo *cme* o valor da concentração média encontrada determinada pelo método analítico e *cn* a concentração nominal, referente à concentração teórica do ponto.

4.2.2.7. Ensaios de Recuperação

Os ensaios de recuperação visam assegurar o isolamento da PAR nos ensaios em que as amostras a serem analisadas estejam em matriz biológica. No âmbito deste trabalho, essas amostras serão encontradas quando da realização dos ensaios de permeação. Para isso, foram adicionadas concentrações conhecidas de fármaco a amostras da matriz biológica trabalhada (pele de orelha porcina) em três concentrações distintas (0,25, 1,0 e 4,0 µg/mL). Em seguida, foram realizados os procedimentos de extração e quantificação do fármaco nestas dadas amostras. O resultado (R%) é expresso em função da diferença, em porcentagem, entre a quantidade de fármaco acrescentada e a quantidade recuperada após a extração, de acordo com a seguinte fórmula:

$$R\% = \frac{\text{Concentração mensurada}}{\text{Concentração nominal}}$$

Equação VI

4.2.3. Estudos de Pré-Formulação

4.2.3.1. Análises Térmicas

De modo a caracterizar os padrões de degradação térmica, que podem ser utilizados para avaliar a estabilização do fármaco na formulação, foram realizados estudos de análise termogravimétrica (TGA, do inglês, *thermogravimetric analysis*), em um Shimadzu DTG-60 (Quioto, Japão). A calorimetria diferencial de varredura (DSC, do inglês, *differential scanning calorimetry*) também foi empregada, utilizando um calorímetro Shimadzu DSC-60 Plus (Quioto, Japão). As análises foram realizadas com a paromomicina, o poloxamer 407 e com uma mistura física dos dois (1:1, p/p).

Para os ensaios de TGA, aproximadamente 3 mg de cada amostra foram pesados em uma cápsula de platina e analisados sob atmosfera de nitrogênio (com fluxo de 50 mL/min) a uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min, no intervalo de 20 a 500 °C. Os ensaios de DSC preparados de forma similar, com aproximadamente 3 mg de cada amostra pesados em cápsulas de alumínio e analisadas em rampa aquecimento de 10 °C/min, no intervalo de 20 a 500 °C, sob atmosfera de nitrogênio (com fluxo de 50 mL/min).

Os dados de ambos equipamentos foram obtidos e analisados pelo *software* TA-60, versão 2.21 (Shimadzu, Japão) sendo que, para as imagens da TGA, foram utilizados os dados de sua primeira derivada.

4.2.4. Delineamento e Preparo das Formulações

As formulações preparadas apenas com três componentes: o fármaco (sulfato de paromomicina), o polímero (Poloxamer P407) e água.

Ao longo do processo de delineamento, diferentes arranjos entre os componentes da formulação foram testados, visando a obtenção de uma preparação estável e que se apresentasse fluida quando sob refrigeração e gelificada quando em temperaturas acima da temperatura ambiente (preferencialmente, próximas às da superfície da pele – cerca de 32 °C). As duas principais abordagens utilizadas para a determinação da concentração de cada componente da formulação, foram a fixação de teores específicos de fármaco, com variações nas concentrações de polímero e a fixação de concentrações de polímero, com variações nas concentrações de fármaco. A água tinha a função de diluente nas formulações, portanto, sua concentração variou em função das concentrações de fármaco + polímero, para completar os 100% de peso final do

preparo. As Tabelas 2 e 3 apresentam as duas abordagens de delineamento das formulações, bem como os códigos designadores de cada piloto.

Tabela 2: Modelo de delineamento das formulações com concentrações fixas do fármaco e variações crescentes do polímero até a razão de 1:1 (polímero:água, p/p).

Código	PAR (%)	P407 (%)	Água (%)	Código	PAR (%)	P407 (%)	Água (%)
<i>FA-01</i>		0,0	97,5	<i>FB-01</i>		0,0	95,0
<i>FA-02</i>		5,0	92,5	<i>FB-02</i>		5,0	90,0
<i>FA-03</i>		10,0	87,5	<i>FB-03</i>		10,0	85,0
<i>FA-04</i>		15,0	82,5	<i>FB-04</i>		15,0	80,0
<i>FA-05</i>		20,0	77,5	<i>FB-05</i>		20,0	75,0
<i>FA-06</i>	2,5	25,0	72,5	<i>FB-06</i>	5,0	25,0	70,0
<i>FA-07</i>		30,0	67,5	<i>FB-07</i>		30,0	65,0
<i>FA-08</i>		35,0	62,5	<i>FB-08</i>		35,0	60,0
<i>FA-09</i>		40,0	57,5	<i>FB-09</i>		40,0	55,0
<i>FA-10</i>		45,0	52,5	<i>FB-10</i>		45,0	50,0
<i>FA-11</i>		48,75	48,75	<i>FB-11</i>		47,5	47,5

P407: Poloxamer 407
PAR: Paromomicina

Tabela 3: Modelo de delineamento das formulações com concentrações fixas do polímero (P407) e concentrações crescentes do fármaco (paromomicina), variando de 0,0% a 2,0%.

Código	PAR	P407 (%)	Água (%)
<i>FC-01</i>	0,0		82,0
<i>FC-02</i>	0,1		81,9
<i>FC-03</i>	0,5		81,5
<i>FC-04</i>	1,0	18,0	81,0
<i>FC-05</i>	1,5		80,5
<i>FC-06</i>	2,0		80,0
<i>FC-07</i>	0,0		85,0
<i>FC-08</i>	0,1		84,9
<i>FC-09</i>	0,5		84,5
<i>FC-10</i>	1,0	15,0	84,0
<i>FC-11</i>	1,5		83,5
<i>FC-12</i>	2,0		83,0

P407: Poloxamer 407
PAR: Paromomicina

4.2.4.1. Preparo dos Géis

A dispersão do polímero para a formação dos géis foi testada de duas formas: dispersão passiva e ativa, conforme pode ser verificado na ilustração da Figura 4, a seguir.

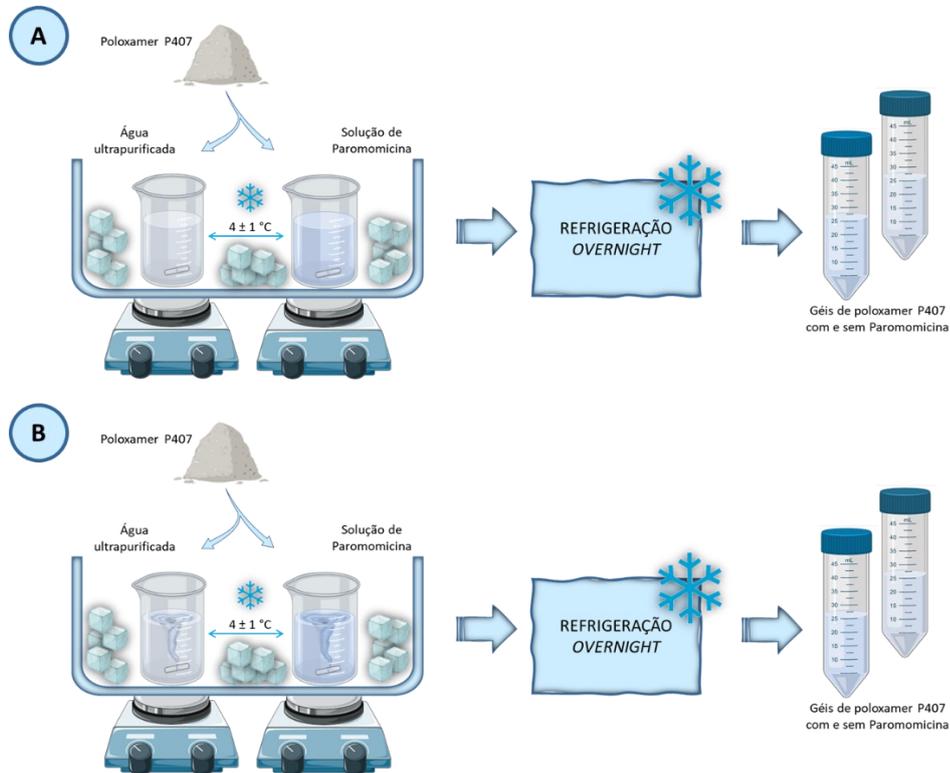


Figura 4: Diferentes técnicas para o preparo dos géis contendo a formulação e seus respectivos placebos. (A): processo de dispersão passiva, com o polímero sendo disposto sobre a solução e levado à refrigeração quando, por meio da gravidade e interações físico-químicas será solubilizado e (B): processo com dispersão ativa, por meio de agitação magnética e posterior solubilização sob refrigeração, overnight. Autoria própria.

Não foi verificada influência entre o modo de preparo e o resultado do gel, portanto, padronizou-se utilizar a dispersão passiva, por envolver menos etapas e ser mais simples.

4.2.5. Caracterização da Formulação

4.2.5.1. Verificação do Comportamento Reológico

Por se tratar de formulações semissólidas, mais especificamente géis, com capacidade de transição sol-gel em função da temperatura, a verificação do comportamento do comportamento das formulações fez-se necessária.

Para tal, foi utilizado um reômetro do tipo cone e placa, Discovery HR-2 (TA Instruments, Delaware, EUA), acoplado a um cone de 50 mm de diâmetro e ângulo de 1 grau.

Quantidade suficiente de amostra foi colocada sobre a placa de Peltier do equipamento, de modo a cobrir toda superfície da placa. A altura do cone foi ajustada e o excesso de formulação, cuidadosamente removido. As análises foram feitas com o auxílio do *software* TA TRIOS. Foram avaliados três parâmetros principais: a região viscoelástica linear, a viscosidade aparente, e a temperatura de transição sol-gel (ponto de gelificação).

4.2.5.2. Avaliação do pH e Condutividade

O pH das preparações foi verificado utilizando um pHmetro Digimed DM-22 (São Paulo, Brasil). As aferições foram feitas em triplicata logo após o término do preparo das formulações.

A condutividade das formulações foi aferida utilizando um condutímetro GEHAKA, GC 1800 (São Paulo, Brasil). Assim como para o pH, a condutividade foi aferida em triplicata após a finalização do preparo dos géis.

4.2.6. Estabilidade dos Géis

Após a obtenção dos géis, estes foram avaliados quanto às suas características físico-químicas (pH, condutividade), aspecto visual geral (cor, transparência e homogeneidade) e concentração do fármaco na formulação: diluição do gel em solução diluente das curvas de calibração e análise por LC-MS, comparando a concentração nominal (teórica) e a experimental (resposta em % da concentração nominal). Além disso, também foi realizado teste de separação de fases por centrifugação a 4000 rpm/10 min (KASVI K14-4000; Paraná, Brasil).

A estabilidade das formulações foi avaliada ao longo de seis meses, de modo a traçar um perfil inicial destes géis, quando armazenados sob refrigeração.

4.2.7. Perfil de Liberação *in vitro* da Paromomicina

Os ensaios de liberação têm como premissa a avaliação da capacidade da formulação de liberar o fármaco contido em si, para o meio. Para que isso ocorra, o fármaco deve ser capaz de difundir-se através de uma membrana de diálise Fisherbrand® Regenerated Cellulose Dialysis Tubing (Fisher Scientific, Pensilvânia, EUA), que faz a interface entre os compartimentos doador e receptor da célula de difusão.

Para estes ensaios, foram testadas as formulações que demonstraram estabilidade após preparo, bem como o fármaco em solução. Os testes foram realizados em uma célula de difusão do tipo Franz, modificada. Em seu compartimento doador, foram adicionados 500 µL da

formulação a ser testada. No compartimento receptor, foram adicionados 15 mL de tampão HEPES 25 mM isotônico (pH $7,4 \pm 0,1$).

Como citado anteriormente, a interface entre os dois compartimentos da célula foi feita por meio de uma membrana de acetato de celulose. Esta foi previamente fervida e lavada em água ultrapura em três ciclos consecutivos, para sua hidratação e remoção de possíveis impurezas do processo de fabricação.

Após montagem da célula e adição das soluções doadora e receptora, as células foram dispostas em uma placa de agitação magnética com banho termostático a $32 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e, com o auxílio de barras magnéticas no interior dos compartimentos inferiores das células, as soluções receptoras ficaram sob agitação constante de aproximadamente 700 rpm, durante o período dos experimentos.

O ensaio de perfil de liberação foi realizado ao longo de seis horas, com coletas nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos. Imediatamente após cada coleta, volume equivalente ao das alíquotas coletadas era repostado com tampão HEPES fresco, de modo a manterem-se os gradientes de concentração e fluxo ao longo do tempo. As amostras aliqüotadas foram filtradas, diluídas em solução diluente ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, 70:30 + AF 0,1%) e, posteriormente, analisadas por LC-MS. Todos os ensaios foram realizados em sextuplicata.

4.2.8. Ensaios *in vitro* de Permeação Cutânea em Pele Íntegra

Assim como nos ensaios de perfil de liberação, para os ensaios de permeação cutânea da PAR foram utilizadas as formulações que se mostraram estáveis e dentro dos parâmetros de seleção delimitados, bem como soluções de paromomicina em diferentes concentrações. A montagem das células de difusão para os ensaios de permeação se deu da mesma forma que para os ensaios de liberação (item 4.2.6.), diferindo-se quanto à interface doador/receptor que, nos testes de permeação, envolveram o uso de pele extraída de orelha porcina, ao invés de uma membrana celulósica. Todos os ensaios foram realizados em sextuplicata (seis replicatas para cada formulação).

4.2.8.1. Preparo das Peles de Orelha Porcina

Inicialmente, as orelhas foram lavadas com água corrente em abundância, para remover sujidades. Em seguida, foram delicadamente enxutas e fixadas em um suporte para facilitar seu manuseio (Figura 5).



Figura 5: Processo de excisão da pele em orelha porcina para ensaios de permeação cutânea *in vitro*. Fonte: DAMASCENO, 2018⁹²

A pele da face externa da orelha foi, então, cuidadosamente excisada do restante da orelha, com o auxílio de bisturi. A hipoderme e resquícios de tecido adiposo foram removidos com o auxílio de tesoura cirúrgica e discos de pele de 32 mm de diâmetro foram recortados com o auxílio de uma lâmina circular e prensa hidráulica (Figura 6). Os discos foram envoltos individualmente em Parafilm[®], ou filme plástico e armazenados em congelador (< -4 °C), podendo ser utilizados em até três meses. Previamente seu uso, os discos eram dispostos sobre papel absorvente embebido em solução salina 0,9% por 15 minutos para ambientação e reidratação.

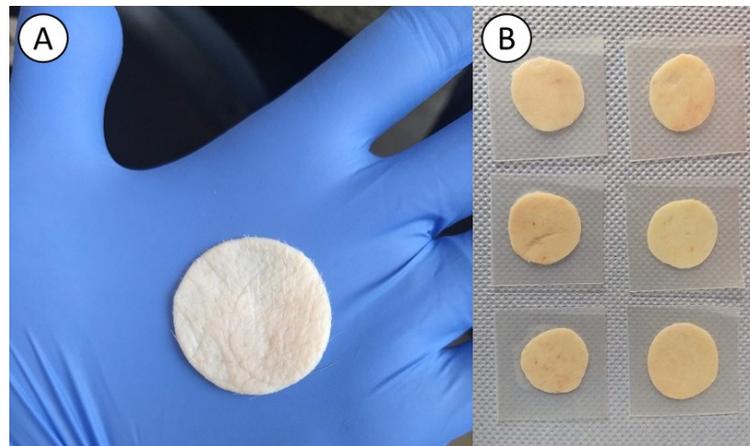


Figura 6: Discos de pele de orelha porcina recordados para ensaios de permeação cutânea *in vitro*. (A) Disco recortado logo após limpeza/preparo da pele; (B) Discos recém retirados do congelamento, ainda embalados. Fonte: registros do autor.

4.2.8.2. Ensaios de Permeação Passiva

Para os ensaios *in vitro* de permeação passiva de PAR, 15 mL de 500 µL da formulação (ou solução) a ser avaliada foram acrescentados em cada compartimento doador da célula de difusão, sobre a face de pele exposta à área difusional, tomando cuidado para recobrir toda a

pele exposta da forma mais homogênea possível. Os ensaios foram conduzidos em placa de agitação (a 700 rpm) magnética com banho termostático a $32 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Os experimentos foram conduzidos por 6 horas sendo que, do compartimento receptor, foi retirada apenas uma amostra, após 360 min. Ao final do experimento, as células foram desmontadas, os discos de pele foram limpos com água ultrapura e delicada remoção dos resíduos com algodão embebido em água ultrapura. Após este procedimento, com o auxílio de uma faca circular de 16 mm de diâmetro e prensa hidráulica, a área difusional da pele (região exposta ao compartimento doador durante o experimento) foi recortada. Os novos discos (Figura 7), foram, então, individualmente picotados e colocados em um frasco contendo solução extratora ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, 70:30 + AF 0,1%), para a extração do fármaco retido na pele.



Figura 7: Recorte da área difusional após os experimentos de permeação. Após seu recorte, os discos internos são picotados para facilitar a extração do fármaco retido. Fonte: registros do autor.

A extração foi feita sob agitação magnética (300 rpm) por um período de 12 horas. Em seguida, as amostras foram filtradas e analisadas por LC-MS.

4.2.8.2.1. Estudo de Biodistribuição da PAR pele

Ao término do experimento de permeação, um segundo protocolo de preparo e extração da pele foi utilizado. Este protocolo permitiu a quantificação do fármaco em diferentes profundidades da pele possibilitando avaliar a capacidade de penetração do fármaco ao longo dos estratos cutâneos.

Ao final da permeação, limpeza e recorte da área difusional das peles, um novo disco concêntrico, com diâmetro de 8 mm foi recortado, dentro da área difusional, utilizando o mesmo aparato de lâmina circular e prensa. Este disco menor foi, então, congelado em isopentano resfriado ao ponto de congelamento ($-160 \text{ }^\circ\text{C}$) por nitrogênio líquido. Para isso, o disco de pele foi fixado a um disco de cortiça com Tissue-Tek[®] O.C.T.[®] (composto que permite a fixação de amostras para crio-seccionamento). Um anel de plástico foi colocado ao redor do disco de pele

para evitar a compressão do tecido e permitir uma superfície plana. Essa técnica permite que toda a estrutura da pele permaneça íntegra⁹³. Os discos foram, então, cortados em um criostato CryoStar[®] NX70 (Thermo Scientific, Reinach, Suíça), em 10 lâminas de pele de 40 µm cada. Cada lâmina foi acondicionada em seu respectivo *ependorf* para posterior extração do fármaco conforme método de extração descrito no item anterior.

4.2.9. Ensaios *in vitro* de Permeação Cutânea em Modelo de Pele Lesionada

Uma vez que numa situação real de tratamento, as formulações serão aplicadas sobre peles lesionadas, sem o estrato córneo presente, avaliar as possíveis alterações nos padrões de penetração/permeação pode ser interessante para auxiliar na suposição do possível comportamento das formulações *in vivo*.

Assim, um modelo simples de pele lesionada, utilizando a técnica de *tape stripping*, foi utilizado. Esta técnica é bastante difundida como forma de remoção das camadas de estrato córneo, para posterior quantificação de um fármaco, ou outras análises. Porém, neste caso, o procedimento foi feito antes do ensaio de permeação, de modo a remover o estrato córneo – camada usualmente ausente em lesões cutâneas oriundas da leishmaniose, como as lesões ulceradas, por exemplo.

Após o preparo inicial da pele conforme o item 4.2.7.1, os discos de pele foram colocados sobre uma placa acrílica, entremeados por um papel de filtro embebido com tampão HEPES pH 7,4, de modo a evitar o ressecamento cutâneo precoce ao longo do processamento. Fixando os discos à placa, foi colocado um molde de fita adesiva, previamente recortada com um círculo de 24 mm de diâmetro, delimitando a área do disco a ter o estrato córneo removido.

Posteriormente à fixação dos discos e delimitação de suas áreas a serem lesionadas, dez pedaços de fita Scotch n° 845 Book Tape (3M, EUA) aderidos e retirados com movimentos únicos e alternância de direção, um após o outro. Em sequência, uma gota de cianoacrilato da marca Super Bonder (Loctite, São Paulo, Brasil) foi aplicada sobre a pele. Sobre a gota, um novo pedaço de fita adesiva foi colocado, levemente pressionado e removido em um movimento único e rápido (após a total polimerização do cianoacrilato). Este último procedimento foi realizado com duas fitas.

Após o procedimento de remoção do estrato córneo, os discos de pele foram gentilmente limpos com água ultrapurificada e algodão, para a remoção de quaisquer vestígios de cola e, então, desafixados e colocados nas células de difusão para a realização dos ensaios de

permeação, conforme protocolo apresentado no item 4.2.7.2. Para cada formulação testada, foram avaliadas seis replicatas.

4.2.10. Ensaios de Iontoforese

4.2.10.1. Preparo dos Eletrodos

Para os ensaios de iontoforese foi utilizado um sistema de eletrodos prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), preparado no próprio laboratório.

Os cátodos – eletrodos negativos – são preparados a partir do depósito de AgCl em um fio de prata. Para isso, AgCl é fundido em cadinho de porcelana, com auxílio de um bico de Bunsen. Após a fusão, alças moldadas no fio de prata são mergulhadas no sal fundido (de duas a três vezes) até serem completamente recobertas por AgCl, conforme ilustração da Figura 8.

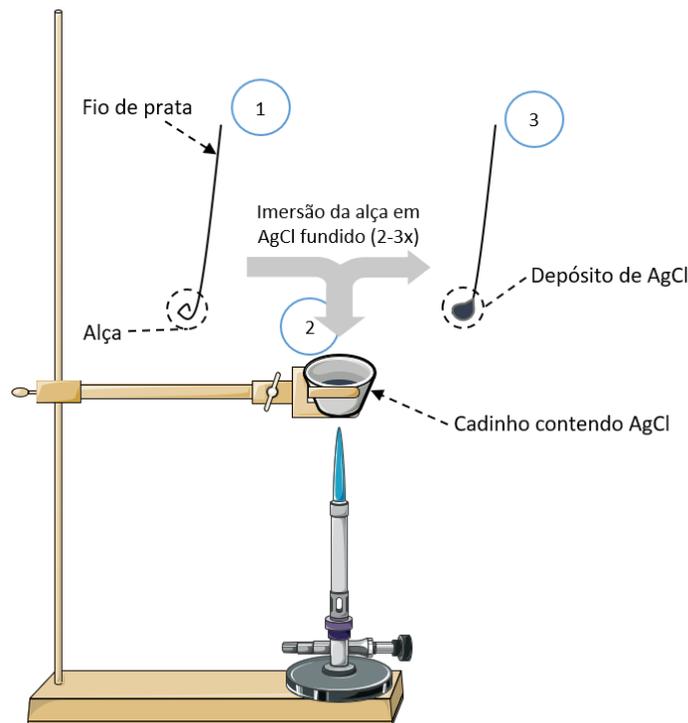


Figura 8: Esquema de preparo do eletrodo negativo (cátodo) de cloreto de prata (AgCl). 1: fio de prata com alça moldada na ponta; 2: imersão da alça em AgCl fundido; 3: alguns segundos após a retirada da alça de prata do AgCl, o sal resfria e se solidifica, formando o eletrodo de AgCl. Fonte: ilustração adaptada de SÁ⁹⁴.

Já o preparo dos ânodos de prata – eletrodos positivos – é feito por meio de uma reação de oxirredução, catalisada por corrente elétrica, onde o eletrodo de AgCl é ligado ao terminal negativo de uma fonte geradora de corrente e mergulhado em um recipiente contendo solução salina saturada e um fio de platina (ligado ao terminal positivo da mesma fonte), formando um

circuito (Figura 9). A fonte, então, é ligada e é aplicada uma corrente de 0,5 mA por 24 horas. Essa corrente, em meio salino, permite o transporte de elétrons e redução do cloreto de prata em prata metálica, formando o eletrodo de prata.

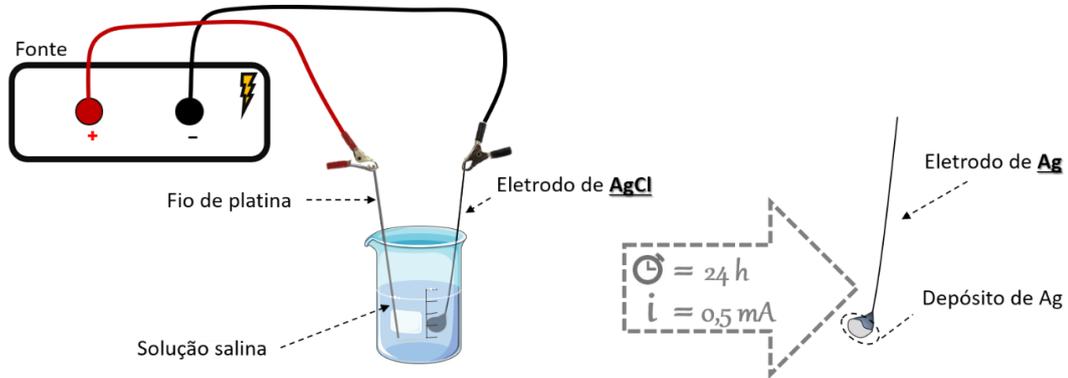


Figura 9: Processo de redução do eletrodo de cloreto de prata (AgCl, negativo) para a obtenção do eletrodo de prata (Ag, positivo). Fonte: ilustração adaptada de SÁ⁹⁴.

4.2.10.2. Ensaios de Permeação Ativa (Iontoforética)

Os ensaios de permeação ativa, utilizando iontoforese, foram realizados seguindo os mesmos moldes dos ensaios de permeação passiva, quanto ao preparo das peles, montagem das células e processamento das peles após o ensaio, para posterior extração do fármaco e análise quali/quantitativa.

4.2.10.2.1. Esquema para Ensaios em Célula de Difusão

Para os ensaios de permeação em células de difusão (do tipo Franz, modificadas), as células foram ligadas em série, com os ânodos (eletrodo de Ag) alocados nos compartimentos doadores e os cátodos nos compartimentos receptores, conforme a Figura 10, a seguir.



Figura 10: Esquema ilustrativo da aplicação de iontoforese em experimentos com células de difusão. As células são conectadas em série – com ânodos em vermelho e cátodos em preto – formando um circuito, em que os ânodos são alocados no compartimento doador e os cátodos, no receptor. Suportes são utilizados para que os eletrodos fiquem suspensos nas soluções, sem qualquer contato direto com peles ou membranas. Fonte: registros do autor.

Após a conexão de todos os eletrodos, a fonte é ligada e a amperagem é ajustada para o valor requerido pelo ensaio – usualmente, entre 0,1 e 0,5 mA/cm², a depender do teste.

4.2.10.3. Esquema para Ensaio em Placa de Cultura

A aplicação da iontoforese em placas de cultura necessita de adaptações metodológicas para evitar contaminação e assegurar que a presença do sistema não venha a interferir na atividade biológica do organismo, ou célula que está sendo cultivada.

Para isso, ao invés de utilizar os eletrodos diretamente dentro dos poços de cultivo, foram preparadas “pontes salinas”, para viabilizar a passagem de corrente pelos poços do modo mais inerte possível. As ditas “pontes salinas” são pequenos cilindros flexíveis de gel de agarose a 3% em solução salina a 0,9%.

Apesar de não serem reutilizáveis como os eletrodos de Ag/AgCl, seu custo de produção é muito baixo e seu preparo bastante simples, o que viabiliza a produção de uma grande quantidade de pontes e, por sua vez, ensaios com várias placas, simultaneamente – o que não seria financeiramente viável com os eletrodos convencionais, em função do custo da matéria prima.

A preparação das pontes é feita em poucas etapas e o maior cuidado que se deve ter é com relação ao risco de contaminação, já que o gel é um potencial meio de cultura e que a ele não é adicionado qualquer tipo de conservante, uma vez que as pontes devem ser o mais inertes possível e estes compostos poderiam ser liberados da ponte durante os experimentos, interferindo nos resultados. Portanto, todas as soluções, utensílios e frascos utilizados devem estar esterilizados e todos os procedimentos que envolverem a exposição das soluções ou do gel ao ambiente, devem ser realizados dentro de uma capela de fluxo laminar, para reduzir os riscos de contaminação.

Primeiramente, em recipiente adequado, a agarose é dispersa em solução salina 0,9%. Em seguida, a mistura é esterilizada em autoclave. Após ser retirada da autoclave e ainda quente, o gel fluido é sugado com o auxílio de uma seringa para o interior de uma cânula de silicone de 3 mm de diâmetro e aproximadamente 100 cm de comprimento. As pontas da cânula são, então, vedadas com Parafilm[®] e esta é levada à refrigeração por, no mínimo, 12 horas.

Previamente ao início do experimento em placa, as cânulas são retiradas da refrigeração e dobradas em intervalos de 3 a 4 cm, de modo a delimitar o tamanho das pontes a serem criadas. Com uma seringa, solução salina 0,9% é, então, injetada na cânula, extrusando as pontes salinas para o interior de um frasco contendo solução salina estéril suficiente para recobri-las e mantê-

las hidratadas. Este procedimento deve ser realizado dentro de uma capela de fluxo laminar para evitar contaminação das pontes, que deverão ser utilizadas logo em seguida.(Figura 11).



Figura 11: Ponte salina, composta por agarose 3% em solução salina 0,9%. Fonte: registro do autor.

Na placa de cultura, as pontes salinas são cuidadosamente colocadas conectando um poço, ao seu vizinho seguinte, formando um circuito em série (como apresentado na Figura 12). É necessário o cuidado de se evitar o contato de umas com as outras, uma vez que isso pode desviar a corrente, que não mais passaria pelo poço e, sim, pelo caminho mais curto, o ponto de contato entre as pontes. A primeira e última ponta do circuito ficam de fora da placa, em um recipiente contendo solução salina e o eletrodo correspondente, ligado à fonte.

Nenhuma alteração nos protocolos de preparo das células foi necessária para os ensaios com aplicação de iontoforese, a não ser o escalonamento das culturas para placas de 24 poços – já explicado nos tópicos relativos aos protocolos de análise microbiológica.

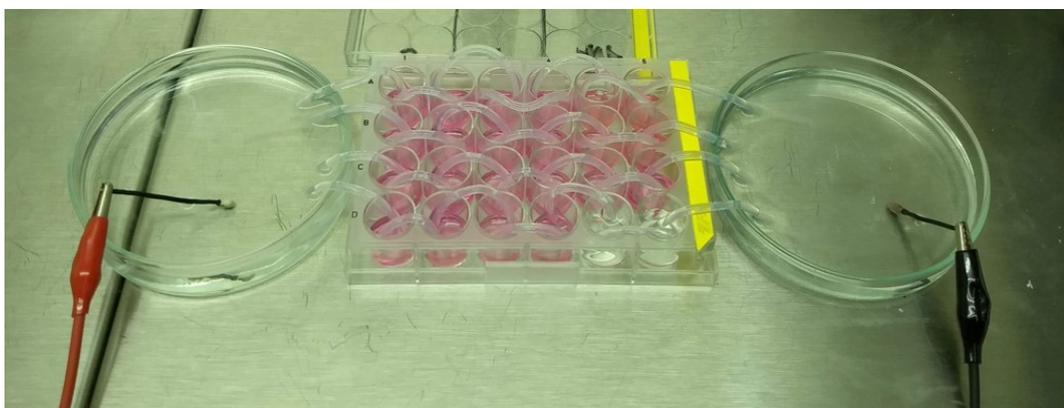


Figura 12: Esquema ilustrativo da iontoforese aplicada em placa de cultura, utilizando pontes salinas feitas de gel de agarose 3% em solução salina para carrear a corrente. Diferentes disposições das pontes podem ser utilizadas para a realização do experimento. Fontes: registros do autor.

4.2.10.4. Testes de Resistência à Aplicação de Corrente

Um ponto importante a ser verificado, antes mesmo de se avançarem os experimentos envolvendo iontoforese, é avaliar se a simples passagem de corrente, no tempo e intensidade planejados para tais experimentos poderia, de alguma maneira, interferir nos ensaios – seja por degradação do fármaco, mudança no comportamento/morte das células e micro-organismos que entrarão em contato com a técnica, dentre outros possíveis acontecimentos.

Para isso, o fármaco em solução e os macrófagos foram expostos à corrente pelo mesmo tempo dos experimentos, mas recebendo o dobro da corrente máxima utilizada em ensaios convencionais, de modo a simular um estresse superior ao que ocorreria em uma situação comum de experimento de iontoforese. A Figura 13 apresenta o teste sendo realizado e soluções de paromomicina a 1,0%.



Figura 13: Esquema para teste de resistência à corrente por solução de paromomicina 1% a 1,0 mA por 6 horas. Ensaio realizado no laboratório de Genebra. Fonte: Registros do autor.

Após a aplicação da corrente, a solução de paromomicina foi filtrada, diluída e quantificada por LC-MS e as concentrações encontradas foram comparadas com as concentrações quantificadas previamente ao início do teste. A viabilidade dos macrófagos após a aplicação da corrente foi verificada de acordo com o protocolo apresentado na seção 4.2.10 e os dados foram comparados com a viabilidade dos controles – que não receberam aplicação de corrente.

4.2.11. Ensaios Microbiológicos

4.2.11.1. Determinação de Citotoxicidade em Macrófagos

4.2.11.1.1. *Cultura dos Macrófagos*

As células de J774A.1 (Sigma[®]), linhagem imortalizada de células murinas, foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose; Sigma[®]), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco[®]), gentamicina 25 mg/L e MEM 1% (Minimum Essential Medium Eagle - Non-essential Amino Acid Solution 100×; Sigma[®]). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e a cultura foi mantida a 37 °C e 5% de CO₂.

4.2.11.1.2. *Ensaio de Citotoxicidade*

Inicialmente, a viabilidade dos macrófagos foi avaliada por meio de contagem em câmara de contagem Fuchs-Rosenthal, com solução de Azul de Tripán 0,2%. Após a contagem, as células foram aderidas em placa de 96 poços na concentração de 8×10^4 células por poço e mantidas por 24 horas a 37 °C e 5% CO₂.

4.2.11.2. Iontoforese em Estudos Microbiológicos: Estudo de Resistência à Corrente

Para o ensaio de resistência à corrente, foi aplicada uma tensão maior que a tensão de trabalho proposta e por um tempo superior. Neste caso, foram aplicados 2,0 mA/cm², por 40 minutos. Essa corrente é 4 vezes mais intensa que a corrente de trabalho usual, de 0,5 mA/cm².

A aplicação da iontoforese foi a única etapa a mais adicionada aos protocolos de realização dos ensaios microbiológicos. Após o plaqueamento das células, as pontes salinas foram cuidadosamente dispostas na placa, de modo a gerar o mínimo de perturbação no meio e com atenção para que uma ponte não mantivesse contato com outra(s), conforme técnica apresentada no item 4.2.9.3.

4.3. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados quantitativos abordados neste trabalho estão apresentados como média \pm desvio padrão das replicatas e foram trabalhados em dois *softwares*: GraphPad Prism[®] 8 (GraphPad Software, Inc) e OriginPro[®] 2020 (OriginLab Corporation) – este último utilizado apenas para a confecção dos gráficos dos ensaios de análise térmica. As diferenças

significativas entre os conjuntos de dados foram verificadas por análise de variância, com correção pelo teste de Tukey, para múltiplas comparações.

5. RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A correta quantificação do fármaco, nas diferentes matrizes em que ele possa ser encontrado ao longo do estudo de desenvolvimento de novas formulações, é um fator imprescindível para o sucesso do trabalho. Desta forma, fez-se necessário o desenvolvimento de um método analítico capaz de quantificar adequadamente a paromomicina em matrizes de pele de orelha de porco, em soluções aquosas do fármaco, em diluições das formulações e em tampão (utilizado nos experimentos de permeação e liberação), sem sofrer influência dos interferentes presentes nas amostras.

Como comentado anteriormente, aminoglicosídeos como a paromomicina não costumam ser bem detectados por detectores de UV-Visível ou Fluorescência, nem tampouco eluem bem em colunas cromatográficas de fase reversa (técnicas e aparatos mais comuns para este tipo de análise) em função de suas estruturas⁸⁷ e, inclusive a farmacopeia americana (USP, do inglês, *United States Pharmacopeia*) ainda recomenda um método microbiológico para a quantificação da paromomicina⁹⁵, algo extremamente laborioso e inviável quando se pensa no volume de amostras que precisam ser analisadas em alguns experimentos – que podem chegar a centenas em estudos de liberação, por exemplo.

Mesmo técnicas como a LC-MS, por vezes possuem limitações no que tange a quantificação direta destes compostos, o que faz com que tratamentos adicionais nas amostras, como derivatizações e etapas de extração do fármaco em fase sólida, sejam utilizados para permitir as análises por estes equipamentos^{88,95-97}. Novamente, a falta de simplicidade no processo analítico para a quantificação do fármaco nas amostras pode acarretar na inviabilidade da execução de alguns experimentos⁹⁸.

Assim, procurou-se encontrar uma metodologia de análise capaz de quantificar as amostras com a necessária precisão e exatidão, mas demandando o mínimo de tempo e etapas possível entre a obtenção de uma amostra e sua referida análise.

O primeiro método de análise da paromomicina desenvolvido para este trabalho foi baseado nos trabalhos de Mokh e colaboradores^{87,88} e testado no equipamento do laboratório brasileiro (LC-MS-BR). Na ocasião, a primeira coluna cromatográfica testada já apresentou resultados satisfatórios com a fase móvel utilizada (H₂O:ACN, 70:30 + 0,1% de AF), demandando apenas o posterior refinamento do método.

Infelizmente, em função de alguns fatores, em especial a configuração do equipamento do laboratório suíço (LC-MS-SZ) e a indisponibilidade de uma coluna cromatográfica igual ou similar à usada no método inicial, foi necessário o desenvolvimento de um novo método para as análises a serem realizadas no dado laboratório.

O LC-MS-SZ contava com um programa que testava e, automaticamente, selecionava as melhores condições de detecção do composto de interesse. Neste caso, cabia ao analisador “apenas” encontrar as melhores condições cromatográficas para o método: fluxo e composição da fase móvel, fase estacionária (coluna cromatográfica), tempo de análise e volume de injeção de amostra. Dentre estes parâmetros, a interação entre as fases móvel e estacionária pode ser destacada como o fator determinante para a correta eluição do fármaco até o analisador de massa, onde este será detectado. Na Figura 14, estão representadas as combinações entre as fases e móveis e estacionárias testadas a fim de se chegar a uma combinação ideal.

Coluna Cromatográfica	H ₂ O + 0,1% AF	ACN + 0,1% AF
✗ ACQUITY UPLC BEH HILIC - 1,7 µm, 2,1 x 100 mm	}	70 : 30
✗ ACQUITY UPLC BEH Amide - 1,7 µm, 2,1 x 100 mm		75 : 25
✗ Xbridge UPLC BEH C18 - 2,5 µm, 2,1 x 50 mm		80 : 20
✗ ACQUITY UPLC BEH300 C4 - 1,7 µm, 2,1 x 50 mm		85 : 15
✗ Zorbax Eclipse XDB C8 - 5 µm, 4,6 x 150 mm	}	50 : 50
✗ Kromasil 100 C18 - 5 µm, 4,0 x 125 mm		60 : 40
✓ LiChrospher 100 RP 18 - 5 µm, 4,0 x 125 mm		70 : 30
		75 : 25
		80 : 20
		85 : 15
		90 : 10
		95 : 05

Figura 14: Combinações entre fase móvel testadas no desenvolvimento do método de quantificação da paromomicina por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa para análises feitas no laboratório suíço. A combinação destacada foi a única que apresentou boas condições de reprodutibilidade e seguiu para as demais etapas de validação. Fonte: autoria própria.

Para o LC-MS-SZ, o melhor arranjo entre fase estacionária e fase móvel foi com a coluna de LiChrospher 100 RP 18, que compartilha algumas semelhanças com a coluna utilizada no Brasil. A fase móvel, porém, precisou ter uma maior concentração de água.

A Figura 15 apresenta picos do fármaco, bem como os parâmetros definitivos das metodologias de ambos os equipamentos.

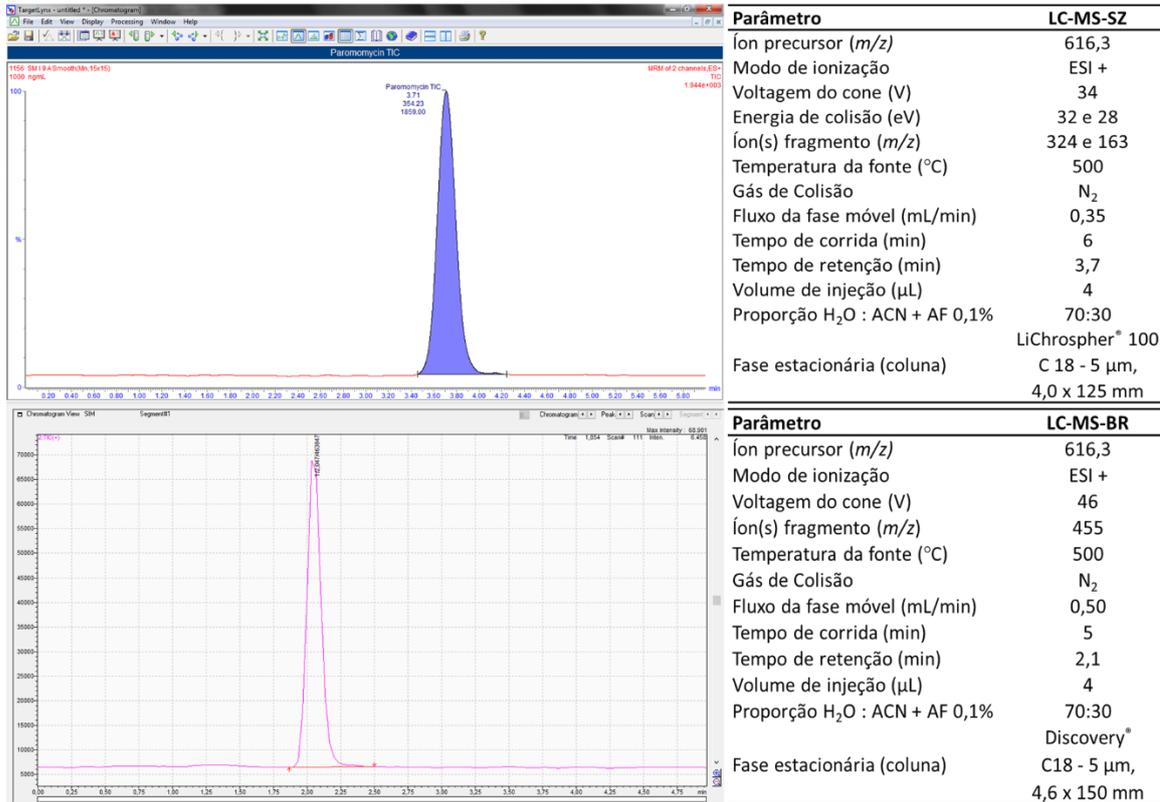


Figura 15: Cromatogramas ilustrativos de um pico de paromomicina no equipamento suíço (acima) e brasileiro (abaixo), com suas respectivas especificações para o método de análise quantitativa por espectrometria de massa. Fonte: autoria própria.

A paromomicina possui peso molecular de 615,6 Da e a depender da intensidade de energia aplicada na molécula, esta pode se fragmentar ainda na fonte de íons do espectrômetro e é por essa razão que foi possível realizar a quantificação do fármaco a partir de um íon fragmento (455), ao invés do íon precursor, em um equipamento que possui apenas um simples quadrupolo, como é o caso do LC-MS-BR. Neste caso, a dificuldade maior foi a de encontrar um íon que remetesse de forma seletiva a um possível fragmento da molécula precursora e que fosse estável o suficiente para manter sua taxa de fragmentação independente das concentrações de fármaco e matrizes analisadas.

5.1.1. Seletividade

Como comentado no item 4.2.2.1, a seletividade de métodos analíticos baseados em LC-MS pode ser verificada pelo próprio caráter intrínseco da técnica, que apresenta como resultado das análises apenas os íons selecionados (quando fora do modo de análise em varredura) e suprime quaisquer outros sinais das outras espécies presentes⁹⁹. Apesar da possibilidade de duas moléculas com o mesmo peso molecular coexistirem, os padrões de fragmentação e, conseqüentemente, os fragmentos oriundos de tais moléculas, dificilmente terão mesma razão

massa/carga (m/z)⁹⁸⁻¹⁰⁰. Além disso, antes da chegada do fármaco ao detector de massa, a amostra necessita correr pela fase estacionária do sistema de cromatografia líquida que é, por definição, uma técnica de separação de substâncias, o que reduz ainda mais a possibilidade de eluição simultânea de compostos presentes na amostra^{98,99}.

Estes fatores conferem alto grau de seletividade à técnica⁹⁹, ao ponto em que a detecção do íon precursor e de seu respectivo fragmento em uma mesma amostra, sem deslocamento significativo dos picos em presença de diferentes matrizes (extrato de pele, tampão, etc.)¹⁰¹ pode ser considerada prova suficiente para afirmar a presença do composto de interesse, na dada amostra.

5.1.2. Linearidade e Curva Analítica

A linearidade é um importante ponto a ser avaliado em metodologias de quantificação, uma vez que indica a capacidade do método em correlacionar de modo diretamente proporcional os valores obtidos pelas análises, com as concentrações das amostras (em uma dada faixa de concentração).

De modo a se comprovar a linearidade do método proposto, foram preparadas curvas analíticas de paromomicina contemplando as concentrações de trabalho (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0 e 4,0 $\mu\text{g/mL}$) para ambos os equipamentos utilizados. As curvas foram preparadas em solução diluente ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, 70:30 + 1% AF), tampão HEPES e, também, em filtrado de pele extraído com solução diluente. Deste modo, foi possível avaliar o comportamento das curvas nos diferentes diluentes em que as amostras poderiam ser obtidas.

A Figura 16 apresenta as triplicatas das curvas analíticas, em seus diferentes diluentes possíveis, realizadas nos equipamentos dos dois laboratórios.

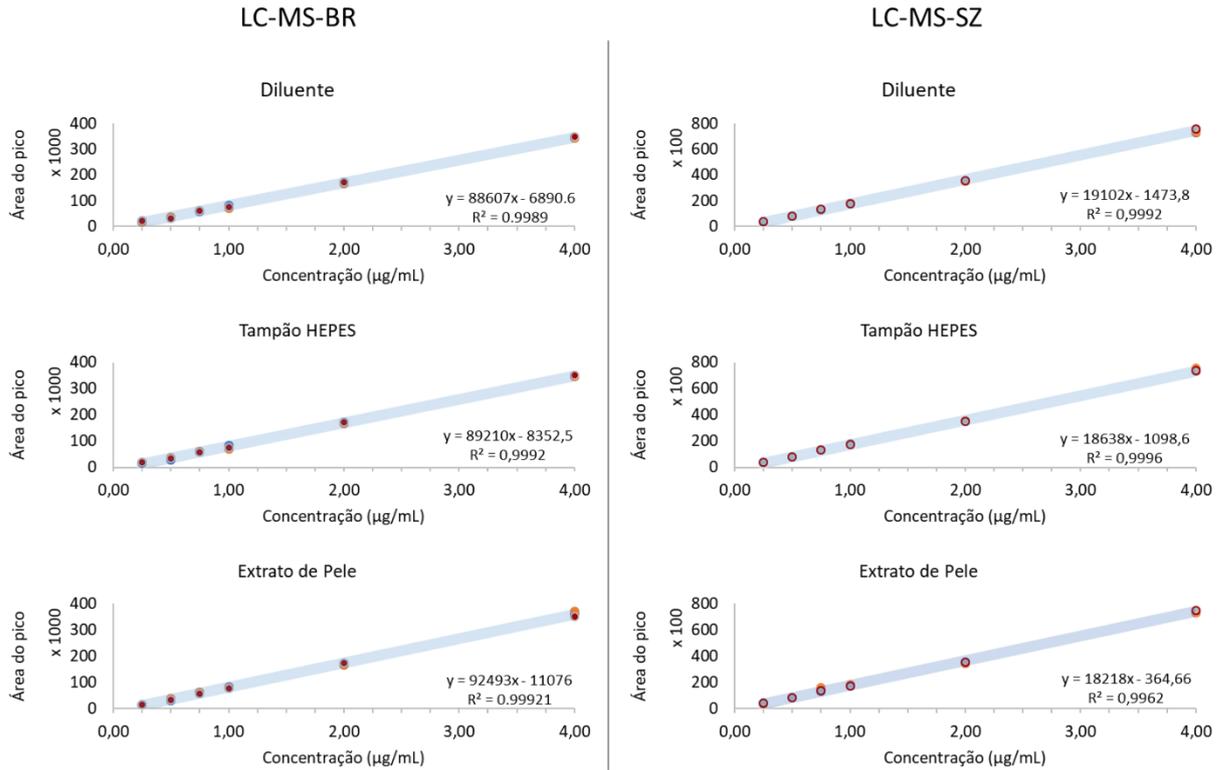


Figura 16: Triplicatas das curvas analíticas da paromomicina em solução diluente, tampão e extrato de pele diluídos nas concentrações de 0,25 a 4 µg/mL de fármaco. À esquerda, resultados das curvas no laboratório brasileiro e à direita, as do suíço.

Com base nos gráficos apresentados, é possível afirmar que os métodos utilizados se apresentaram lineares ao longo de toda a curva analítica, conforme preconizado pela ANVISA⁸⁹ e recomendado pelo ICH⁹¹.

5.1.3. Limites de Detecção e Quantificação

O conhecimento dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do fármaco pela metodologia analítica aplicada são essenciais para que se tenha a segurança de que as amostras analisadas estarão em faixas de concentração detectáveis e devidamente quantificáveis pelo equipamento, evitando conclusões errôneas sobre as concentrações de fármaco presentes na amostra avaliada.

As concentrações teóricas do LD e do LQ foram calculadas com base nas curvas analíticas preparadas e estão apresentadas na Tabela 4, a seguir.

Tabela 4: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) da paromomicina dos três diferentes solventes utilizados nas análises: solução diluente de H₂O:Acetonitrila (70:30 + 0,1% AF), tampão HEPES e extrato de pele diluído. Limites apresentados para os dois equipamentos utilizados.

		Diluyente (µg/mL)	Tampão (µg/mL)	Pele (µg/mL)
LD	<i>LC-MS-BR</i>	0.066	0,060	0,068
	<i>LC-MS-SZ</i>	0.065	0,055	0,065
LQ	<i>LC-MS-BR</i>	0.200	0,189	0,212
	<i>LC-MS-SZ</i>	0.196	0,173	0,201

Os valores encontrados para ambos os equipamentos, na ordem de algumas dezenas à poucas centenas de ng/mL são reflexo da alta sensibilidade do método analítico na detecção e quantificação de substâncias em muito baixas concentrações – algo determinante para ensaios como os de biodistribuição. Além disso, a similaridade entre resultados dos dois equipamentos demonstra a boa adequabilidade dos métodos, o que permite fazer comparações entre as análises feitas aqui (Brasil) e lá (Suíça) com segurança analítica.

5.1.4. Precisão e Exatidão

Os ensaios de precisão e exatidão servem para demonstrar a reprodutibilidade e a capacidade do método analítico em retornar valores de concentração fidedignos às concentrações reais de fármaco presentes nas amostras analisadas.

A precisão e a exatidão foram analisadas simultaneamente, utilizando os mesmos seis pontos de concentração da curva analítica, o que possibilitou uma avaliação mais completa do que apenas os 5 pontos usualmente demandados^{89,91}. Cada replicata foi preparada de forma individual, para cada dia. As Tabelas 5 e 6, a seguir, apresentam os dados de precisão e exatidão, intra e intercorrida para os dois espectrômetros utilizados.

Não foram verificados pontos fora dos limites preconizados pela legislação vigente, que aceita desvios de até 15%, tanto para precisão, quanto para exatidão, a não ser para o limite inferior de quantificação, para o qual são aceitos desvios de até 20%.

Tabela 5: Dados de precisão e exatidão intracorrída e intercorrída no LC-MS-BR. DP: desvio padrão (5 replicatas), CV: coeficiente de variação.

Dia 1	Conc. (µg/mL)	Média ± DP (µg/mL)	Precisão (CV %)	Exatidão (E %)
	0.25	0.268 ± 0,0111	4.15	107.27
	0.50	0.528 ± 0,230	4.35	105.61
	0.75	0.74 ± 0,0115	1.56	98.68
	1.00	0.992 ± 0,0126	1.27	99.15
	2.00	1.946 ± 0,0464	2.39	97.28
	4.00	4.027 ± 0,0988	2.45	100.66
Dia 2				
	0.25	0.250 ± 0.0133	5.32	99.95
	0.50	0.368 ± 0.0117	3.18	73.69
	0.75	0.694 ± 0.0353	5.08	92.53
	1.00	1.096 ± 0.0788	7.19	109.55
	2.00	2.179 ± 0.0378	1.73	108.91
	4.00	3.914 ± 0.0118	0.30	97.85
Dia 3				
	0.25	0.299 ± 0.0241	8.06	119.70
	0.50	0.507 ± 0.0165	3.26	101.40
	0.75	0.764 ± 0.0310	4.06	101.89
	1.00	0.941 ± 0.0701	7.45	94.11
	2.00	1.961 ± 0.0431	2.20	98.04
	4.00	4.028 ± 0.0901	2.24	100.69

Tabela 6: Dados de precisão e exatidão intracorrída e intercorrída no LC-MS-SZ. DP: desvio padrão (5 replicatas), CV: coeficiente de variação.

Dia 1	Conc. (µg/mL)	Média ± DP (µg/mL)	Precisão (CV %)	Exatidão (E %)
	0.25	0.27 ± 0.0025	0.92	106.34
	0.50	0.50 ± 0.0023	0.46	99.03
	0.75	0.77 ± 0.0180	2.35	102.01
	1.00	1.00 ± 0.0205	2.05	100.34
	2.00	1.95 ± 0.0117	0.60	97.46
	4.00	4.02 ± 0.0799	1.99	100.53
Dia 2				
	0.25	0.27 ± 0.0064	5.32	106.94
	0.50	0.49 ± 0.0066	3.18	98.64
	0.75	0.75 ± 0.0244	5.08	99.71
	1.00	1.03 ± 0.0208	7.19	103.10
	2.00	1.96 ± 0.0467	1.73	97.88
	4.00	3.96 ± 0.0497	0.30	99.10
Dia 3				
	0.25	0.26 ± 0.0092	3.49	104.99
	0.50	0.50 ± 0.0147	2.93	100.22
	0.75	0.77 ± 0.0273	3.56	102.30
	1.00	1.04 ± 0.0898	8.62	104.12
	2.00	1.98 ± 0.0514	2.59	99.06
	4.00	4.01 ± 0.0508	1.27	100.27

5.1.5. Recuperação do Fármaco

A avaliação da recuperação do fármaco em matriz biológica demonstra a competência da solução extratora em remover o fármaco impregnado nas camadas da pele e viabilizar sua detecção e quantificação de forma eficiente.

As análises feitas no Brasil, renderam taxas de recuperação de 103,2%, 92,1% e 88,4% para as concentrações de 0,25, 1,0 e 4,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já as análises no equipamento do laboratório suíço, renderam recuperações de 97,5%, 90,7% e 89,9%, para as mesmas concentrações de 0,25, 1,0 e 4,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

A recuperação acima de 100%, como no visto na recuperação da concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ no laboratório brasileiro, pode ser explicada pela evaporação de parte do solvente orgânico presente na solução extratora ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, 70:30 + 0,1% AF) ao longo do processo de extração, concentrando, modificando a proporção fármaco/solvente.

Todas as concentrações recuperadas estiveram acima dos 80%, o que corrobora com os demais ensaios de validação em demonstrar a eficácia e eficiência do método analítico para a quantificação da paromomicina ao longo das etapas de validação.

5.2. ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

5.2.1. Análises Térmicas

Estudos de análise térmica são uma importante ferramenta para a verificação das características de degradação térmica dos compostos da formulação e se a mistura destes compostos acelera ou retarda os processos de degradação, o que é comumente interpretado como uma possível futura desestabilização, ou estabilização (respectivamente) dos componentes da formulação, em especial, do fármaco. As Figuras 20 e 21, a seguir, apresentam os resultados das análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e de termogravimetria, respectivamente.

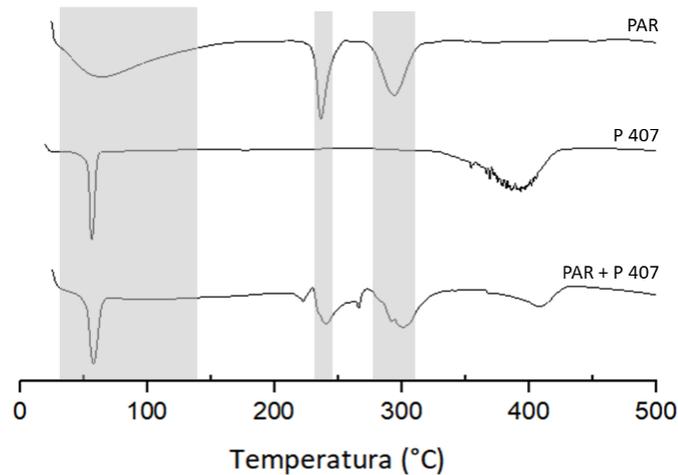


Figura 17: Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos dois principais constituintes dos géis, a paromomicina (PAR) e o poloxamer 407 (P 407), bem como da mistura física (1:1, p/p) de ambos. As faixas em cinza destacam as regiões onde ocorrem os principais eventos térmicos da PAR, que se mantiveram quando em mistura.

Na análise de DSC, a paromomicina apresenta três eventos endotérmicos, sendo o primeiro (entre 30,39 e 128,79 °C) devido à perda gradual de humidade em função de sua alta higroscopicidade⁸⁶ e os dois seguintes (principais) à degradação por pirólise^{86,116}. Estes eventos que ocorreram entre 230,84 e 245,9 °C, com pico em 236,61 °C; e entre 277,09 e 310,34 °C, com pico em 293,99 °C se mantiveram na amostra contendo a mistura de PAR e P 407, mas de forma menos intensa e com deslocamentos de suas temperaturas iniciais, assim como de seus picos, para a direita. Isso indica que houve uma interação benéfica entre o fármaco e o polímero, levando a um retardo do início da decomposição da paromomicina, quando em mistura¹¹⁶.

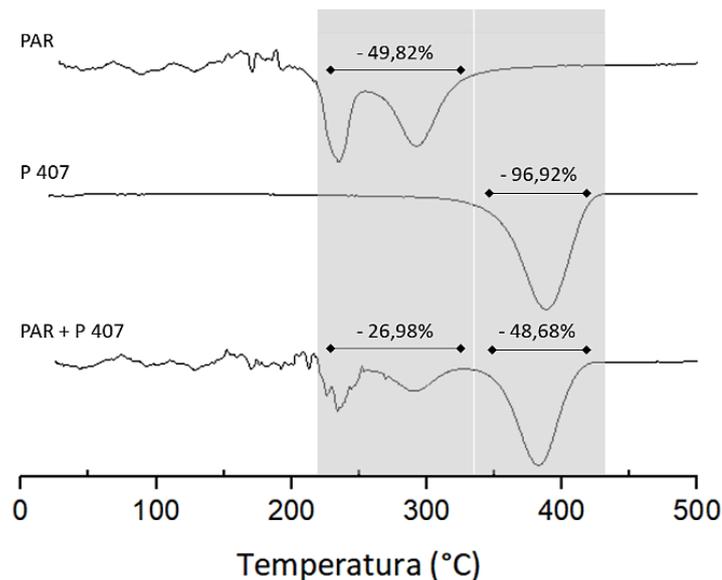


Figura 18: Primeira derivada das curvas de perda de massa das análises termogravimétricas (TGA) dos dois principais constituintes dos géis, a paromomicina (PAR) e o poloxamer 407 (P 407), bem como da mistura física (1:1, p/p) de ambos. As percentagens exibidas indicam as perdas de massa da amostra no intervalo dos principais eventos térmicos originadores de perda de massa de cada composto (destacados em cinza).

O dois principais eventos endotérmicos apresentados pela paromomicina, descritos na Figura 20 (DSC), são os principais eventos geradores de perda de massa do composto, correspondendo a 49,82% de perda, conforme apresentado na Figura 21 (TGA). O poloxamer 407 também apresentou o mesmo padrão, tendo em sua endoterma de degradação (em 393,72 °C) a maior perda de massa (96,92%). Ao analisarmos a curva da mistura entre fármaco e polímero, feita da proporção de 1:1 (p/p), verificam-se os valores de perda de massa de 26,98% (na faixa das duas principais endotermas da PAR) e 48,68% na região da endoterma do P 407. Estes percentuais de perda encontrados na mistura representam cerca de 50% dos valores encontrados para as curvas dos compostos isolados, indicando que não houve antecipação da degradação dos compostos, quando em uma mistura, corroborando com os achados de DSC e indicando a provável compatibilidade do fármaco com o polímero testado.

5.3. DELINEAMENTO DAS FORMULAÇÕES

Apesar de utilizar apenas dois componentes, além da água, preparar uma formulação estável de paromomicina em gel de poloxamer 407 e capaz de gelificar em temperaturas próximas à da superfície da pele (± 32 °C), ou, ao menos, entre a temperatura ambiente padrão (25 °C) e a da pele foi bastante desafiador.

Inicialmente, foram pensadas duas concentrações de paromomicina (2,5 e 5,0%) para a formulação dos géis. Apesar de serem concentrações menores do que as comumente verificadas na literatura para formulações tópicas de paromomicina^{27,46,47,102-104}, boa parte destes estudos testaram as formulações em pacientes, ou em modelos animais sem um prévio estudo de permeação *in vitro*, que poderiam ajudar a avaliar a biodisponibilidade do fármaco. Além disso, a julgar as características da paromomicina (altamente hidrossolúvel) e das lesões cutâneas a serem tratadas (usualmente desprovidas de estrato córneo, que é um dos principais limitadores para a penetração de moléculas hidrofílicas na pele), não seria improvável considerar que as preparações testadas em outras publicações possuísem concentrações de fármaco muito acima das necessárias, o que tende a contribuir não só com o encarecimento da formulação, quanto com a possibilidade de reações adversas, como irritações cutâneas que, em alguns casos, podem reduzir a adesão do paciente ao tratamento.

Os primeiros modelos de delineamento das formulações pensados, possuíam concentração fixa de paromomicina, variavam as proporções de água e poloxamer 407 (vide Tabela 2, no Item 4.2.3). Essa abordagem não rendeu resultados satisfatórios, sendo que das formulações contendo polímero + PAR (2,5%), apenas as formulações FA-02 (5% P407) e FA-

03 (10% P407) se apresentaram estáveis 24 horas após o final do preparo. Das formulações com polímero + PAR 5%, apenas a FB-02 (5% P407) mostrou-se estável. Com concentrações de poloxamer $\leq 10\%$, nenhuma das formulações apresentou gelificação, ou qualquer aumento de viscosidade em função do aumento de temperatura.

Brugués e colaboradores⁹⁶ obtiveram sucesso na obtenção de um gel de poloxamer 407 (20%) e paromomicina (5%). A formulação FB-05 possuía essa mesma composição e, de fato, resultou em um gel homogêneo. Porém, mas após alguns dias em geladeira, a formulação entrou em processo de separação de fase, como boa parte das outras que apresentaram instabilidade (Figura 17). Diversos fatores podem estar envolvidos na não reprodutibilidade da formulação de Brugués, como a pureza das matérias-primas, ou outras questões como detalhes da técnica de preparo que, por alguma razão, foram omitidas pelos autores do artigo, por exemplo.



Figura 19: Formulação com separação de fases – evento de desestabilização mais comum entre as formulações preparadas. Fonte: Registros do autor.

Com o insucesso da primeira abordagem em se obter formulações estáveis e com concentrações de polímero suficientes para a gelificação da formulação na faixa de temperatura desejada, novos testes foram necessários. Assim, uma diferente abordagem, agora com concentrações fixas de polímero e variações nas concentrações do fármaco, foi desenhada. Duas concentrações de poloxamer 407 que já haviam sido testadas em géis placebo, em etapas anteriores ao início do delineamento das formulações foram selecionadas: 15 e 18% e que possuíam temperaturas de transição dentro da faixa desejável. Nesta nova abordagem, concentrações ainda menores de fármaco foram testadas. Os resultados podem ser verificados na Tabela 7.

Tabela 7: Avaliação inicial das formulações preparadas com base na segunda abordagem de delineamento. As formulações ressaltadas apresentaram-se estáveis em período superior a 24 horas do término de seu preparo. As duas formulações com destacadas com preenchimento em verde foram selecionadas para prosseguir com os demais estudos do trabalho.

Formulação	PAR (%)	P407 (%)	Temp. de Transição (°C)*
FC-01 (placebo)	0	18	~24
FC-02	0,1	18	~25
FC-03	0,5	18	~25
FC-04	1,0	18	~26
FC-05	1,5	18	não estável
FC-06	2,0	18	não estável
FC-07 (placebo)	0	15	~30
FC-08	0,1	15	~31
FC-09	0,5	15	~31
FC-10	1,0	15	>40
FC-11	1,5	15	>40
FC-12	2,0	15	>40

* Neste primeiro momento, as temperaturas de transição sol-gel foram avaliadas de forma visual e aproximada, utilizando termômetro de infravermelho e banho termostático.

As formulações FC-04 e FC-09, contendo 1% PAR/18% P407 e 0,5% PAR/15% P407, respectivamente, foram selecionadas para ir adiante nos demais testes propostos neste trabalho por serem as capazes de conter a maior concentração de fármaco para cada concentração de polímero testada. As formulações FC-10, 11 e 12 se mostraram estáveis, porém, mantiveram-se como soluções ligeiramente viscosas ao longo de toda faixa de temperatura de transição desejada, não apresentando sinais de gelificação até temperaturas de aproximadamente 40 °C sendo, assim, desconsideradas.

5.4. CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS DE PAROMOMICINA

5.4.1. Aspectos Gerais das Formulações

Ambas as formulações selecionadas (FC-04 e FC-09) podem ser descritas como soluções ligeiramente viscosas, inodoras, incolores, translúcidas e homogêneas quando em temperaturas abaixo da temperatura ambiente. Acima de sua temperatura de transição, as duas mantêm-se inodoras, incolores, translúcidas e com aspecto homogêneo, porém, formam um gel firme, incapaz de escoar ao se inclinar o recipiente que os contém.

Sobre a pele, logo após a aplicação, as formulações começam a gelificar e, após o término da transição, formam uma espécie de filme sobre a região da aplicação.

5.4.2. Verificação Comportamento Reológico

Conhecer as características reológicas da formulação abre caminho para que as estratégias de aplicação do produto sejam delineadas com mais eficiência. No caso de sua veiculação em forma de *spray*, por exemplo, é importante saber se o frasco deverá ser mantido abaixo de uma determinada temperatura previamente à sua utilização para correta dispersão da formulação, ou o tipo de válvula mais adequada para a produção de um jato homogêneo em função da viscosidade do produto, por exemplo.

Assim, as formulações selecionadas foram submetidas a estudos de comportamento reológico de modo a verificação de suas temperaturas de transição ($T_{sol-gel}$) e viscosidade aparente em diferentes temperaturas. O terceiro parâmetro citado na metodologia, “região viscoelástica linear” foi, na verdade, o primeiro parâmetro a ser estudado. Sua avaliação, em triplicata, permite determinar a faixa mínima da tensão de cisalhamento (gerada pela oscilação) suportada pelo gel sem que este apresente deformação – região em que o módulo de elasticidade da amostra (G' – que indica a capacidade da amostra em armazenar energia) se apresenta linear, independente da tensão aplicada. Este é um dado importante, pois, para o estudo da viscosidade aparente e da temperatura de transição, é necessário indicar a força de cisalhamento que será aplicada pelo equipamento.

Explicando de maneira bastante simplificada, o reômetro é capaz de determinar a viscosidade aparente e a $T_{sol-gel}$ da formulação a partir da aplicação de sutis oscilações de seu aparato (o cone, no caso deste estudo) que está em contato direto com o gel, em uma área controlada¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Estas oscilações são realizadas com uma força constante ao longo de todo o tempo da rampa de temperatura (que, para este estudo, foi de 15 a 50 °C, 10 °C/min). Conforme a formulação vai alterando seu estado físico em função da temperatura, a resistência aos movimentos oscilatórios do cone varia. O equipamento capta estas sutis variações de resistência e utiliza estes dados para a avaliação do comportamento reológico da amostra. Assim, é imperativo que, antes de se avaliar os demais parâmetros, seja estudada a tensão que deverá ser utilizada, dado que uma tensão muito baixa pode não gerar alterações detectáveis pelo equipamento e uma tensão muito alta pode interferir na capacidade de resistência à oscilação, pela amostra. As Figuras 18 e 19, a seguir, apresentam gráficos indicando a região viscoelástica e a temperatura de transição para uma das formulações preparadas.

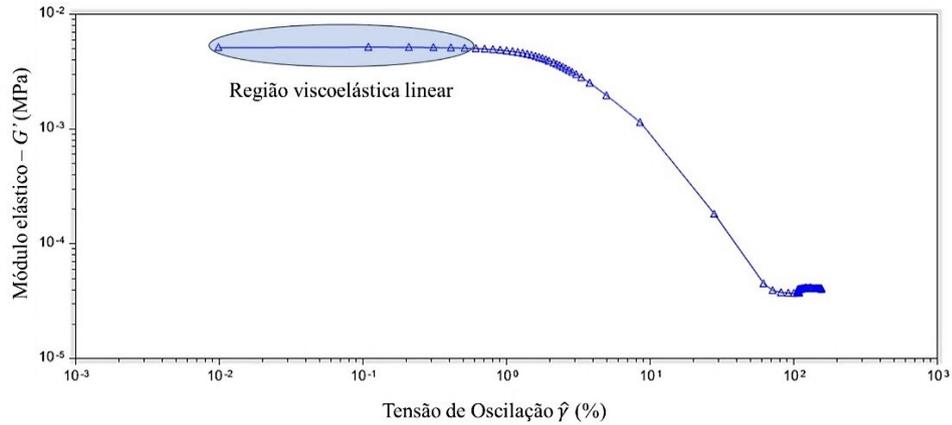


Figura 20: Gráfico representativo da região viscoelástica linear da formulação FC-09.

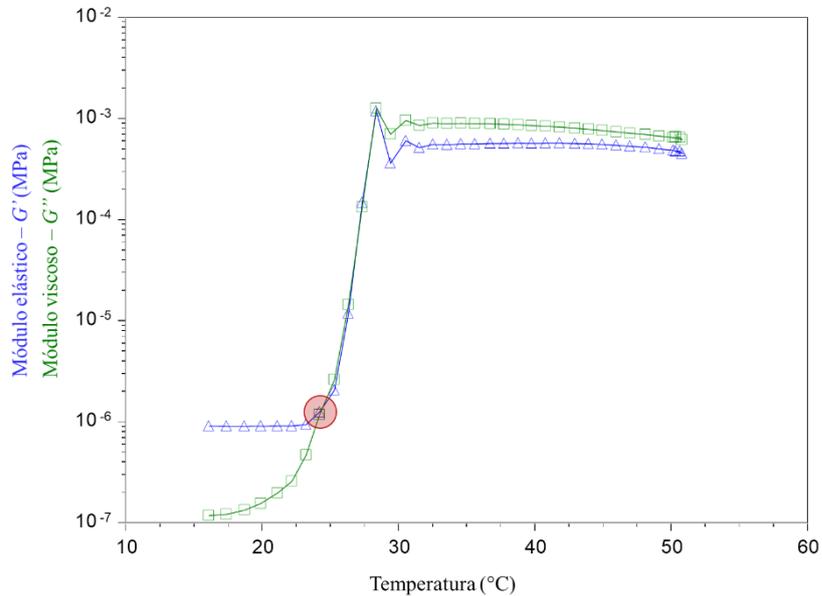


Figura 21: Gráfico representativo do perfil reológico da formulação FC-04. O destaque em vermelho indica a interseção dos módulos elástico (G') e viscoso (G''), que caracteriza o início do estágio de transição sol-gel.

Os estudos de comportamento reológico foram realizados com as formulações FC-04 e FC-09. Os géis placebo referentes às formulações também foram analisados de modo a avaliar se a presença do fármaco poderia gerar algum tipo de alteração no comportamento das formulações. Os dados seguem representados na Tabela 8, a seguir.

Tabela 8: Resultado das análises de reologia dos géis com e sem fármaco. A temperatura de transição $T_{sol-gel}$ foi interpretada como sendo a temperatura referente ao ponto no gráfico onde os módulos elástico (G') e visco (G'') se cruzam. Os dados de viscosidade aparente apresentados foram escolhidos para representar três diferentes condições de temperatura: uma abaixo da temperatura de transição (20 °C); a temperatura média da superfície da pele e o primeiro ponto de temperatura aferido logo após a fase de transição.

Formulação	PAR (%)	P407 (%)	Transição $T_{sol-gel}$ (°C)	Viscosidade a 20 °C (cP)	Viscosidade a 32 °C (cP)	Viscosidade após gelificação (cP)
FC-01	-	18	26,7	93,6	635.108	79.620
FC-04	1,0		25,5	93,1	105.635	12.527
FC-07	-	15	35,4	91,3	118,6	194.471
FC-09	0,5		34,8	90,4	102,8	117.345

Pelas análises, foi possível verificar que os valores de viscosidade aparente de todos os géis testados estiveram bastante próximos em temperaturas abaixo de suas respectivas temperaturas de transição sol-gel (entorno de 90 cP – o equivalente à viscosidade de um suco de frutas concentrado, por exemplo). Na temperatura média da superfície cutânea (± 32 °C), apenas as formulações com 18% de polímero já haviam gelificado no equipamento, apresentando viscosidades na ordem de 10^5 cP (a título de comparação, um gel fixador para cabelos tem viscosidade entorno de 10^4).

Aparentemente, a presença do fármaco na formulação produziu ligeira redução da temperatura de transição, bem como na viscosidade aparente em temperaturas abaixo da $T_{sol-gel}$ das formulações. Após a gelificação, o impacto da presença do fármaco na viscosidade apresenta-se de forma mais expressiva, principalmente nas formulações com maior concentração de polímero e fármaco.

Sabe-se que aditivos como sais, solventes polares e outros tipos de moléculas pode influenciar na estrutura e micelização dos géis de poloxamer, impactando em sua viscosidade e temperatura de transição¹⁰⁹⁻¹¹¹. As características físico-químicas da paromomicina, como sua alta hidrofiliçidade, polaridade e disponibilidade para formar interações de hidrogênio¹¹², por exemplo, podem ser alguns dos fatores que influenciam nas características reológicas dos géis de poloxamer e isso poderia estar correlacionado com a desestabilização de géis, vista em algumas das formulações testadas na fase de delineamento. Apenas um estudo mais aprofundado envolvendo diversas técnicas, inclusive de quantificação e imagem, poderia ser capaz de validar tais suposições, mas, de qualquer modo, os géis FC-04 e FC-09 apresentaram características condizentes como proposto para o trabalho, possuindo perfil sensorial de acordo com o esperado.

5.4.3. Avaliação do pH e Condutividade

Além de ser uma medida importante em formulações tópicas, em especial para aquelas que entrarão em contato direto com lesões (como é o caso das formulações deste trabalho), a avaliação do pH permite estudar a estabilidade das formulações ao longo do tempo. Eventos que ocorrem em escala microscópica, ou mesmo molecular e que inicialmente podem não ser verificados a olho nu, como dissociações iônicas e contaminação por micro-organismos, podem gerar alterações no pH da formulação sendo, muitas vezes, o primeiro indício de instabilidade da formulação. O pH também é de grande importância no que diz respeito à protonação da paromomicina (assim como de outras moléculas), que está relacionada com sua capacidade de se acoplar às subunidades de RNA – um dos mecanismos pelos quais acredita-se que o fármaco exerça sua ação.

Tabela 9: Avaliação inicial do pH e condutividade das formulações. Ensaios em triplicata.

Formulação	pH	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)
FC-01	$5,43 \pm 0,08$	$167,4 \pm 1,37$
FC-04	$5,35 \pm 0,06$	$627,1 \pm 2,21$
FC-07	$5,48 \pm 0,02$	$139,2 \pm 1,89$
FC-09	$5,39 \pm 0,05$	$409,4 \pm 3,76$

Conforme pode ser verificado na Tabela 9, o pH das formulações mostrou-se de acordo com o indicado para formulações cutâneas. Uma vez que o pH fisiológico destas áreas é ligeiramente ácido (entre 4,5 e 6,0¹¹³), utilizar formulações com pH similar reduz as chances de reações de estresse cutâneo, como irritações.

A condutividade dos géis contendo paromomicina foi bem maior que a dos géis puros de poloxamer 407. Isso pode ser explicado pelo fato da paromomicina possuir cinco grupamentos amino, que em pH ácido tendem a estar protonados, aumentando a disponibilidade de íons em solução e, portanto, a condutividade do meio^{114,115}.

5.5. ESTABILIDADE DOS GÉIS

Os géis contendo paromomicina (FC-04 e FC-09) foram testados ao longo de seis meses para avaliar, de modo preliminar, sua estabilidade em condições ideais de armazenamento

(refrigeração). O estudo foi feito ao longo de seis após o seu preparo, com amostragens a cada 30 dias. Os resultados estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10: Resumo dos resultados de estabilidade das formulações de paromomicina em gel de poloxamer 407. Análises feitas ao longo de 6 meses com amostras mantidas em geladeira. T: tempo em dias.

FC-04

Parâmetro	T0	T30	T60	T90	T120	T150	T180
Concentração (% da nominal)	98,6	98,9	98,8	99,1	99,8	100,4	101,2
pH	5,35	5,33	5,38	5,35	5,29	5,31	5,43
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	627,1	625,8	629,2	631,4	630,3	642,0	639,9
Aspecto visual de acordo com padrão?	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Separação de fases após centrifugação?	não	não	não	não	não	não	não

FC-09

Parâmetro	T0	T30	T60	T90	T120	T150	T180
Concentração (% da nominal)	97,4	97,7	96,8	97,3	98,0	97,8	98,4
pH	5,39	5,41	5,37	5,36	5,33	5,42	5,36
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	409,4	403,3	405,2	408,3	407,6	408,8	408,0
Aspecto visual de acordo com padrão?	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Separação de fases após centrifugação?	não	não	não	não	não	não	não

Ao longo deste estudo preliminar de estabilidade, não foram encontradas quaisquer alterações significativas nos parâmetros avaliados. As concentrações de PAR em gel acima de 100% descritas no quinto e sexto mês da formulação FC-04, bem como sua leve tendência ao aumento em função do tempo (verificada pelas concentrações ligeiramente crescentes desde o T0), podem ter ocorrido em função da perda de água da formulação para o ambiente, o que geraria um discreta elevação na concentração do fármaco. Embora os géis estivessem armazenados tubos com tampa, essa possibilidade não deve ser descartada.

5.6. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Apesar da iontoforese ser uma técnica utilizada há bastante tempo, até o presente momento, não há na literatura material que confronte se a aplicação direta, ou indireta da corrente, por si só, não poderia causar algum tipo de alteração nos macrófagos. Portanto, é importante verificar a citotoxicidade da aplicação de corrente nesta que é uma das principais células humanas envolvidas na infecção por leishmania.

Assim, os ensaios microbiológicos realizados neste trabalho objetivaram avaliar a citotoxicidade da aplicação da iontoforese em macrófagos.

Os experimentos com macrófagos revelaram que não houve qualquer alteração em sua viabilidade após 40 minutos de aplicação de corrente a $2,0 \text{ mA/cm}^2$ ($102\% \pm 14,2$). Tendo em vista que a corrente proposta para aplicação neste trabalho é de $0,5 \text{ mA/cm}^2$, acredita-se que a técnica, então, seria segura para aplicação, no que diz respeito à citotoxicidade aos macrófagos.

5.7. PERFIL DE LIBERAÇÃO

Ao se desenvolver qualquer formulação que não seja administrada em vias com acesso direto à corrente sanguínea (como as intravenosas, por exemplo), um importante aspecto a ser verificado é a capacidade da formulação em liberar o fármaco para o meio em concentrações adequadas para sua atividade terapêutica. Em geral, isso deve ser avaliado em função de um determinado tempo.

O perfil de liberação passiva da paromomicina foi avaliado ao longo de 360 minutos. Foram avaliados os dois géis, FC-04 e FC-09 (contendo 1,0% e 0,5% de PAR, respectivamente) e uma solução aquosa de PAR a 5%.

O resultado pode ser verificado no gráfico da Figura 22, que apresenta a % de fármaco que foi recuperada no compartimento receptor em relação à quantidade presente no doador.

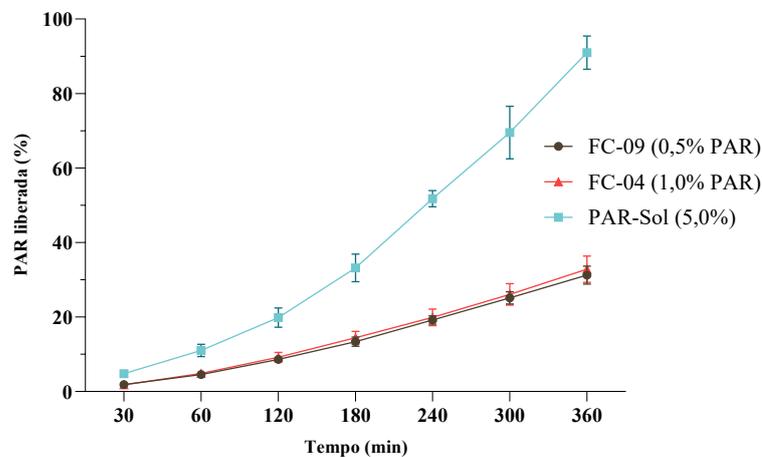


Figura 22: Gráfico representativo do perfil de liberação da paromomicina pelos géis desenvolvidos e por uma solução-controle de paromomicina 5% em água.

A paromomicina é uma molécula altamente hidrossolúvel ($> 50 \text{ mg/mL}$) o que permite que haja uma difusão constante do fármaco presente no meio doador para a solução receptora, desde que obedecidas as *sink conditions* – o meio receptor deve garantir que, se todo o fármaco depositado no doador difundisse para o receptor, a concentração final na atinja 10% da solubilidade do fármaco, neste dado meio.

Em solução, as moléculas da PAR têm maior mobilidade e, portanto, maiores chances de entrar em contato com a membrana e difundirem-se para o meio receptor. Somando-se isso à garantia de fluxo positivo para o receptor em função da manutenção das *sink conditions*, a solução de paromomicina 5% teve fluxo de difusão crescente, atingindo cerca 90% liberação do fármaco ao final de 6 horas.

No caso dos géis, sua hidrofiliabilidade e a estrutura de sua matriz polimérica reduzem a mobilidade da molécula, diminuindo sua velocidade de liberação, porém, mantendo-a constante, o que pode representar uma liberação controlada do fármaco, em função do tempo de aplicação. Ao longo de 6 horas, 32,98% ($\pm 4,66$) e 31,23% ($\pm 3,06$) do fármaco foram liberados para as formulações FC-04 e FC-09, correspondendo a 3,3 mg ($\pm 0,36$) e 0,78 mg ($\pm 0,06$), respectivamente.

5.8. ENSAIOS *IN VITRO* DE PERMEACÃO DE PAROMOMICINA

A utilização de pele porcina como modelo comparável à pele humana em ensaios *in vitro* já é prática bastante aceita e utilizada por diferentes grupos de pesquisa e desenvolvimento que estudam absorção de compostos pelas vias tópica e transdérmica¹¹⁷⁻¹¹⁹. Dentre as vantagens que podem ser citadas pela utilização deste modelo, estão o fato de ser um modelo barato, que não requer o abate do animal em função do experimento (as peles são oriundas de animais que já seriam abatidos de forma comercial para consumo) e cuja boa similaridade estrutural com a pele humana viabiliza estudos *in vitro* com significativo grau de comparabilidade.¹²⁰⁻¹²⁷. Assim, a escolha deste modelo mostrou-se apropriada para avaliar, inicialmente, a capacidade de penetração e permeação da paromomicina nos sistemas desenvolvidos.

As formulações preparadas foram avaliadas tanto no modelo de pele íntegra, quanto em um modelo experimental de pele de lesionada em que a orelha porcina teve seu estrato córneo removido por *tape stripping* (previamente aos ensaios). Ao longo dos experimentos iniciais, novas hipóteses foram surgindo e diferentes controles, como soluções e pomadas de PAR (base de vaselina líquida 10% + vaselina sólida 90%) foram utilizados de modo a se tentar traçar um perfil das características de penetração do fármaco, de acordo com variações de veículo, concentração e condições experimentais. A Tabela 11 compila todos os ensaios de permeação realizados e a quantificação das amostras.

Tabela 11: Compilado das permeações de paromomicina em pele de orelha porcina lesionada ou não e de modo passivo, ou iontoforético.

Preparação	Tempo (min)	Tipo de Permeação	Condição da Pele	PAR Permeada (μg)	PAR Recuperada (μg)
0,5% Gel (FC-09)	360	passiva	íntegra	< LD	15,89 \pm 3,27
0,5% Gel (FC-09)	360	passiva	lesionada	694,97 \pm 224,05	1162,68 \pm 188,67
0,5% Solução	360	i = 0,50 mA/cm ²	íntegra	1147,19 \pm 239,83	392,85 \pm 136,82
1,0% Solução	360	passiva	íntegra	< LD	5,93 \pm 0,46
1,0% Solução	30	passiva	lesionada	< LQ	661,83 \pm 40,83
1,0% Gel (FC-04)	360	passiva	íntegra	< LD	16,72 \pm 2,41
1,0% Gel (FC-04)	360	passiva	lesionada	6097,87 \pm 1871,16	1791,14 \pm 186,37
1,0% Solução	360	i = 0,50 mA/cm ²	íntegra	5650,28 \pm 1463,07	2286,09 \pm 534,87
1,0% Solução	360	i = 0,25 mA/cm ²	íntegra	2880,50 \pm 919,41	367,84 \pm 102,11
1,0% Solução	360	i = 0,10 mA/cm ²	íntegra	1469,14 \pm 248,49	404,52 \pm 95,53
1,0% Solução	10	i = 0,50 mA/cm ²	íntegra	< LD	135,67 \pm 35,29
1,0% Solução	30	i = 0,50 mA/cm ²	íntegra	< LD	261,58 \pm 7,85
1,0% Solução	30	i = 0,50 mA/cm ²	lesionada	< LQ	1057,52 \pm 155,62
2,5% Pomada	360	passiva	íntegra	< LD	4,25 \pm 0,90
2,5% Solução	360	passiva	íntegra	< LD	41,16 \pm 14,83
2,5% Gel (FA-03)	360	passiva	íntegra	< LD	23,24 \pm 7,55
5,0% Solução	360	passiva	íntegra	< LD	374,66 \pm 124,24
15% Pomada	360	passiva	íntegra	< LD	7,21 \pm 0,63
15% Pomada	360	passiva	lesionada	< LD	89,30 \pm 17,47

* média \pm desvio padrão de 6 replicatas

i: permeação iontoforética (parâmetros da aplicação de corrente)

LD: limite de detecção da paromomicina (< 0,066 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

LQ: limite de quantificação da paromomicina (< 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Os dados da tabela serão discutidos nos próximos itens e representados nas Figuras 23, 24 e 25.

5.8.1. Permeação Passiva em Pele Íntegra

De modo a verificar a capacidade de penetração da paromomicina na intrincada estrutura cutânea, foram realizados experimentos de permeação passiva em pele íntegra, onde as amostras ficaram em contato com a pele por seis horas quando, então, foram processadas e o fármaco quantificado. O resultado está apresentado na Figura 23, que segue.

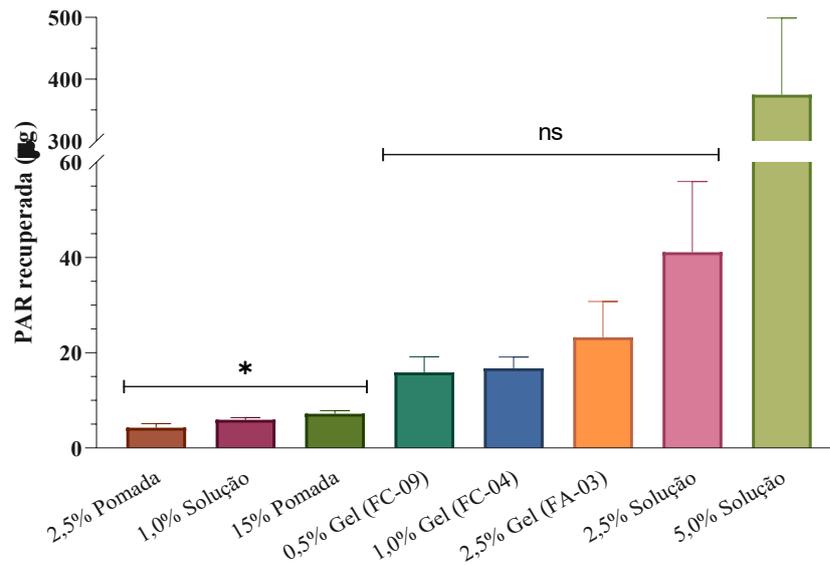


Figura 23: Quantidade total paromomicina recuperada das peles após 6 horas de experimento de permeação cutânea passiva com diferentes formulações. *ns*: $p > 0,05$; * = $0,01 < p < 0,05$.

Após 6 horas de estudo foram recuperados da pele $5,93 \mu\text{g} (\pm 0,46)$ de paromomicina da solução de PAR 1%, quantidade ligeiramente inferior à da pomada a 15% ($7,21 \mu\text{g} \pm 0,63$) e ligeiramente superior à da pomada a 2,5% ($4,25 \mu\text{g} \pm 0,90$). Apesar das diferenças terem sido estatísticas ($p < 0,05$), as variações foram pouco significativas em termos práticos, em função das quantidades terem sido bastante pequenas. Sendo assim, pode se considerar que as três obtiverem desempenho semelhante.

Quanto aos géis, em especial o FC-09 (0,5% de PAR) e o FC-04 (1,0% de PAR), a quantidade de paromomicina que penetrou na pele foi equivalente, com $15,89 \mu\text{g} (\pm 3,27)$ e $16,72 \mu\text{g} (\pm 2,41)$ de paromomicina recuperados para FC-09 e FC-04, respectivamente. Apesar de aparentarem ser valores pequenos, estas quantidades foram aproximadamente duas vezes maiores do que as recuperadas após os ensaios com a pomada de PAR 15%, que continha concentração entre 15 e 30 vezes maior de ativo na formulação e foi usada como controle por ser uma das preparações mais comumente encontradas em estudos envolvendo administração tópica da paromomicina^{13,43,46,104}.

A quantidade recuperada de PAR pelas soluções de 1, 2,5 e 5% apresentou certa linearidade ($y = 96,388x - 132,52$; $r^2 = 0,92$), levando a crer que o fármaco penetre por difusão simples, obedecendo a um gradiente de concentração fisiologicamente determinado, o que explicaria as baixas quantidades recuperadas (< 1% do total aplicado), uma vez que o fármaco é altamente hidrofílico, encontra-se ionizado em meio aquoso e possui peso molecular superior a 500 Da, o colando fora dos parâmetros da chamada “regra dos 500 Daltons”⁴⁸⁻⁵⁰. Esta regra

indica que, de um modo geral, moléculas acima de 500 Da (e, em especial, as hidrofílicas e/ou carregadas) possuem maior dificuldade em atravessar o estrato córneo e alcançar as camadas mais profundas da pele. De acordo com a regra, compostos com gradiente de partição mais lipofílico e com peso molecular inferior aos ditos 500 Da conseguiriam penetrar pelo estrato córneo com mais facilidade, entremeando os corneócitos e queratinócitos, pelos espaços intercelulares.

Veículos lipofílicos, como as pomadas, tendem a aumentar a penetração de fármacos hidrofílicos, uma vez que, além de gerar oclusão, possuem baixa afinidade a tais compostos, reduzindo o tempo de permanência do fármaco em seu meio e auxiliando em sua difusão pela superfície cutânea^{128,129}. Isso, porém, não se viu refletido neste trabalho, possivelmente pelo fato de que as pomadas, dada sua alta densidade, dificultam a mobilidade das moléculas do fármaco pela ação da gravidade e, assim, apenas após a fusão do veículo sobre a superfície cutânea (processo bastante lento, dependendo da temperatura da pele e da composição da base), é que as moléculas hidrofílicas da paromomicina alcançariam o estrato córneo para iniciar sua difusão. Essa hipótese se fortifica ao se notar que as quantidades de paromomicina recuperadas pelas pomadas com 2,5% e 15% de fármaco foram praticamente as mesmas. Possivelmente, apenas as moléculas de PAR que estavam espacialmente mais externas na formulação e na região de interface da pomada com a pele é que foram capazes de difundir-se pela densa base lipofílica e chegar à superfície cutânea.

De modo contrário, veículos hidrofílicos costumam retardar e controlar a liberação de moléculas hidrofílicas. O que se verificou, porém, foi que os géis preparados tiveram performance expressivamente maior, principalmente se for considerado que os géis tinham concentrações entre 5 e 30 vezes menores que as de seus controles em pomada.

O gel FA-03 também penetrou quantidades superiores às da pomada controle (aproximadamente 3x), porém, por ser uma formulação que não possuía transição para estado de gel, esta foi estudada apenas para investigar a possibilidade de se haver uma correlação entre a concentração do fármaco em gel e a quantidade recuperada, bem como verificado com as soluções. Tal correlação mostrou-se até mais linear que a das soluções ($y = 3.8302x + 13.514$; $r^2 = 0,98$), mesmo com os géis possuindo diferentes viscosidades entre si em função da concentração de poloxamer 407. Esta informação reforça a tese anteriormente levantada sobre a penetração da paromomicina ocorrer por um mecanismo de difusão simples, mediado por um gradiente de concentração fisiológico.

5.8.2. Permeação Passiva em Pele Lesionada

Uma vez que a proposta deste trabalho é desenvolver sistemas para o tratamento de lesões cutâneas, isso significa que a pele não estará íntegra e, portanto, diferenças no padrão de penetração/permeação do fármaco podem ocorrer. No caso das lesões cutâneas resultantes da leishmaniose, umas das fases do desenvolvimento das lesões é a formação de lesões ulcerosas, onde não há mais a presença do estrato córneo, principal barreira cutânea à penetração de moléculas externas.

Sendo este um dos principais limitadores para a penetração do fármaco, optou-se por utilizar a técnica de *tape stripping* diferencial para remover o estrato da pele de orelha porcina, de modo a viabilizar o estudo de permeação do fármaco em uma pele desprovida de tal camada de proteção. Este tipo de abordagem já foi sugerida e utilizada com sucesso em alguns trabalhos que careciam trabalhar com modelos similares^{121,130-134}.

Neste modelo, os ensaios foram limitados à estudos com os dois géis principais, a solução aquosa de paromomicina 1% e a pomada de paromomicina 15%. Também foi realizado um ensaio com solução de paromomicina 1% sob aplicação de corrente e que será debatido no item 5.7.3, juntamente com os outros resultados dos estudos de iontoforese. A Figura 24 apresenta um comparativo entre os resultados de quantificação da PAR recuperada de amostras de pele íntegra e lesionada, após os ensaios de permeação passiva.

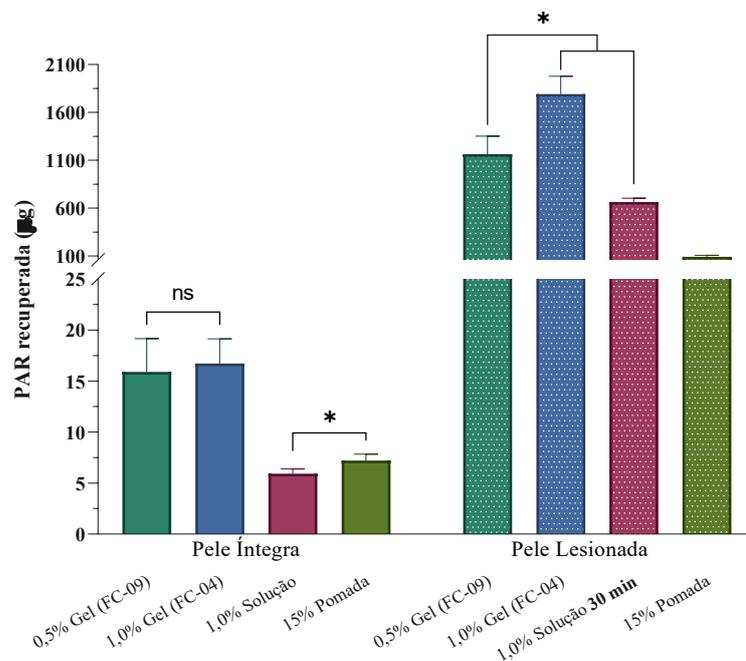


Figura 24: Comparativo entre as quantidades de paromomicina recuperadas após ensaio de permeação passiva em pele íntegra e lesionada ao longo de 6 horas, com exceção, apenas, da solução de paromomicina 1% no ensaio em pele lesionada, foi analisada após 30 minutos. ns: $p > 0,05$; * = $0,01 < p < 0,05$.

A remoção do estrato córneo resultou em uma penetração entre 12 e 110 vezes a quantidade média de fármaco recuperada da pele íntegra. A performance da pomada foi a menor dentre as analisadas, mesmo estando em concentração 15 a 30 vezes maior que as outras amostras analisadas. Ainda assim, a ausência do estrato córneo permitiu a penetração de 12x mais fármaco por esta preparação. O destaque maior deste estudo, porém, vai para a solução de paromomicina 1% que, em apenas **30 minutos** de permeação no modelo de pele lesionada, foi capaz de fazer penetrar uma quantidade em média 110 vezes maior que a mesma solução, em contato por 6 horas com a pele íntegra. Foram 661,83 μg ($\pm 40,83$) recuperados, o que equivale a $\sim 13,2\%$ do total de paromomicina depositado sobre a pele para a realização do experimento.

Os géis também apresentaram performances bastante interessantes passadas as 6 horas de teste. Foram, aproximadamente, 1162,68 μg ($\pm 188,67$) e 1791,14 μg ($\pm 186,37$) de fármaco recuperados para os géis FC-09 e FC-04, respectivamente e que correspondem a uma liberação de 46,5% e 35,8% do fármaco total presente nas células. A liberação de um percentual maior do fármaco pelo gel FC-09 apesar de possuir metade da concentração deu-se, provavelmente, pelo fato da formulação ainda não ter finalizado sua transição sol-gel na temperatura em que as células de difusão foram mantidas (32 ± 1 °C), ao passo que o FC-04 já estava em estado de gel e, portanto, limitando a mobilidade das moléculas de fármaco na amostra.

5.8.3. Ensaio de Permeação Passiva e Iontoforética em Pele Lesionada

A iontoforese, como já abordado anteriormente, é uma técnica cujo conceito já era trabalhado ainda na virada dos séculos XVII. No entanto, somente no século XX que sua utilização começou a ser pesquisada com mais afinco no que tange o transporte de moléculas bioativas pela pele^{82,135,136}.

Para este trabalho, a ideia da utilização da iontoforese está focada na possibilidade de se utilizar a técnica para aplicar uma dose de ataque do fármaco, logo no início do tratamento, na intenção de acelerar a estabilização da concentração terapêutica, o que espera-se que resulte em uma redução do tempo de tratamento, com conseqüente melhora na adesão e um desfecho mais satisfatório.

A paromomicina, quando em solução, apresentou excelentes taxas de penetração cutânea de forma passiva e em curtos períodos – especialmente quando o estrato córneo estava ausente. Para aplicação da iontoforese, a formulação é confinada em um compartimento. Assim, a solução seria a opção que possibilitaria a maior mobilidade das moléculas.

A Figura 25 apresenta os ensaios de iontoforese realizados, com concentrações de 0,5 e 1,0% de fármaco em solução, aplicado tanto em pele íntegra, quanto em lesionada e sob diferentes regimes de tempo e corrente.

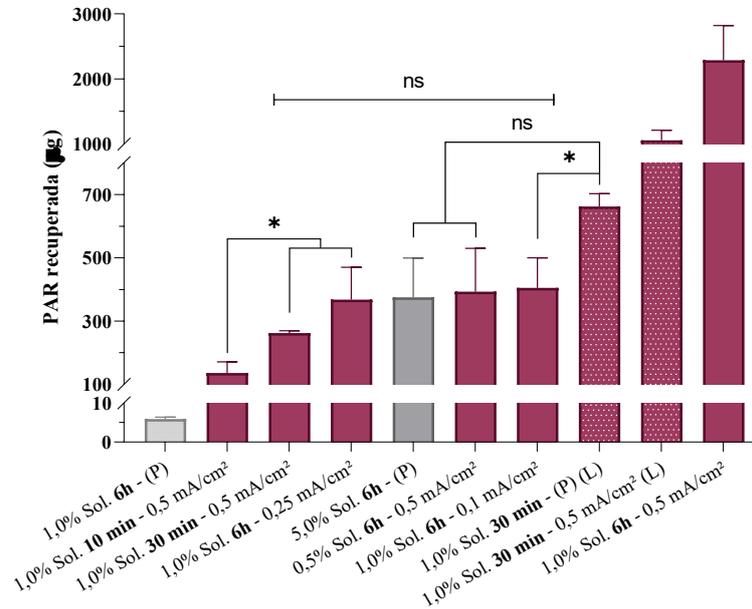


Figura 25: Recuperação da PAR em solução após ensaios de permeação. Diferentes concentrações de fármaco, intensidades de corrente e tempos de aplicação. Amostras analisadas com aplicação de iontoforese em pele íntegra, a não ser quando indicado o oposto. (P): *ensaio passivo*; (L): *pele lesionada*; ns: $p > 0,05$; * = $0,01 < p < 0,05$.

Ao analisar o gráfico, é possível perceber a influência da corrente na penetração da PAR de forma muito mais intensa que o tempo de exposição. Testes feitos com a corrente fixada em 0,5 mA/cm² apresentaram, em 10 e 30 minutos, resultados bastante próximos (em alguns casos, sem qualquer diferença estatística) aos ensaios que correram por 6 horas, mas com intensidade de corrente mais baixa. Com apenas 10 minutos de aplicação da solução a 1% em pele íntegra e com corrente de 0,5 mA/cm², foi possível recuperar uma média de 135,7 µg (± 35,3) de paromomicina. A mesma solução, com 30 minutos de permeação em pele intacta praticamente dobrou a quantidade de fármaco penetrado (261,6 ± 7,9 µg). Ao observar a quantidade recuperada após 30 minutos de iontoforese (0,5 mA/cm²) em solução de PAR 1% sobre pele lesionada, vê-se que alcançou uma média de 1057,5 µg (± 155,6), concentração que supera em quase 12 vezes a encontrada para a pomada de paromomicina 15%.

5.8.4. Ensaios de Biodistribuição

De modo a verificar como se daria a penetração do fármaco através das membranas cutâneas foram realizados ensaios de biodistribuição, em que a pele é seccionada após o ensaio de permeação e cada porção é analisada individualmente.

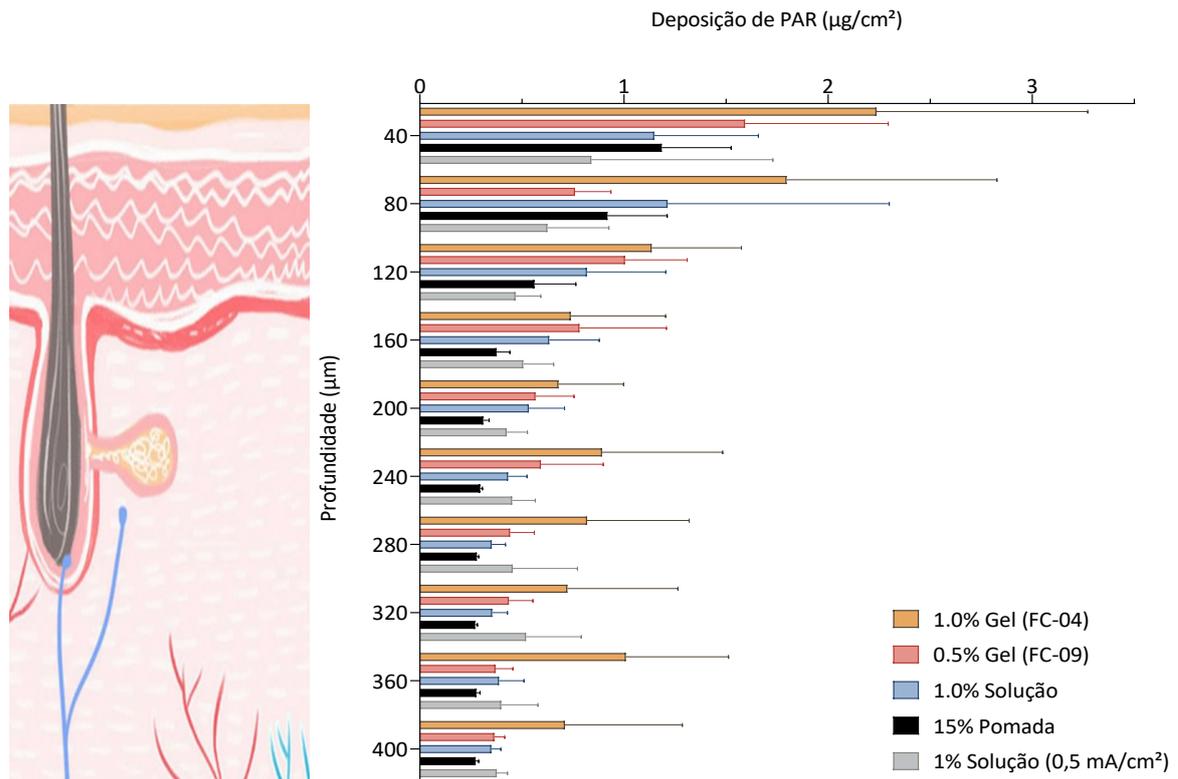


Figura 26: Estudo de biodistribuição apresentando a quantidade de fármaco que foi recuperada nas diferentes profundidades da pele em função da área de aplicação. A ilustração à direita apresenta de forma aproximada a profundidade em que o fármaco foi recuperado. Fonte: Dados do autor, ilustração retirada de <<https://bit.ly/2LulkwY>>, com adaptações.

De modo a simplificar a apresentação dos dados, apenas as cinco formulações mais relevantes para a discussão foram apresentadas da Figura 26.

O fato deste ensaio ter sido realizado em pele íntegra possibilita visualizar de forma bastante clara o impacto do estrato córneo em limitar a penetração de agentes externos. Os testes de liberação mostraram que, por exemplo, as replicatas do gel FC-04 liberaram para o meio, em média, 3,3 **miligramas** de paromomicina ao longo de 6 horas. Para o mesmo tempo de contato, foram recuperados apenas 16,7 **microgramas**. Isso significa que apenas cerca de 0,5% de todo o fármaco (teoricamente) liberado pela formulação foi capaz de atravessar o estrato córneo e penetrar na epiderme viável.

Além disso, apesar dos modelos estatísticos revelarem pouca, ou nenhuma diferença significativa entre as formulações, no que tange as quantidades de fármaco depositadas nas profundidades de pele avaliadas, é possível verificar que há uma tendência de valores ligeiramente maiores para o gel com 1% de paromomicina, em comparação às outras formulações, ao longo de todo o percurso da molécula rumo às camadas dérmicas mais profundas.

Outro ponto interessante a ser reparado, diz respeito às quantidades de fármaco depositadas com o auxílio da iontoforese. Conforme apresentado nos tópicos anteriores, a solução de paromomicina a 1%, quando aplicada com o auxílio de iontoforese, possibilitou uma deposição total de cerca de 380 vezes a obtida de modo passivo. Verificou-se, também, que altas quantidades já estariam depositadas após apenas alguns minutos de aplicação da técnica ($135,67 \pm 35,29 \mu\text{g}$ em 10 minutos), demonstrando o quão eficiente a técnica pode ser como adjuvante à absorção de fármacos pela via cutânea, especialmente àqueles cujas moléculas são, ou possuem, grupamentos polares.

Após alcançar a derme, rumo a profundidades superiores a $200 \mu\text{m}$, a deposição de paromomicina parece estar em níveis constantes, pouco diferindo entre a composição do veículo, concentração inicial aplicada e o tipo de permeação (passiva/iontoforética). Isso talvez ocorra por limitações compartimentais (a região está “saturada” e não consegue comportar mais fármaco – seja por um impedimento bioquímico, físico ou outro), ou mesmo um gradiente de fluxo específico, por exemplo. Porém, essa é apenas uma hipótese, que necessitaria de uma análise mais ampla, com um maior número de secções, replicatas e com diferentes concentrações, veículos e fluxos de corrente para ser validada.

A observação de dados como os apresentados neste trabalho demonstra a relevância de se realizarem estudos de liberação, permeação e biodistribuição no desenvolvimento de formulações, em especial as de uso tópico e transdérmico. Ao avaliar o perfil de biodistribuição é possível inferir os possíveis fatores relacionados às taxas de deposição e fluxo do fármaco através da pele, o que pode auxiliar (juntamente com dados de ensaios de atividade antimicrobiana) na determinação da concentração ideal do fármaco na formulação e da quantidade ideal de aplicação, possibilitando a redução de custos com matérias-primas e a otimização de processos de produção, bem como da posologia.

De um modo geral, foi possível verificar que, tanto o veículo utilizado para a aplicação da paromomicina, quanto a aplicação da técnica de iontoforese impactaram diretamente na quantidade de fármaco depositada na pele, sendo que o último permitiu a deposição de 12 vezes mais fármaco em 1/12 do tempo, via uma preparação que continha 15 vezes menos fármaco (comparação entre a deposição alcançada pela solução de paromomicina 1% testada por 30 min com aplicação de $0,5 \text{ mA/cm}^2$ e a pomada de paromomicina 15% testada por 6 horas, ambas em modelo de pele lesionada).

A título de exemplo, os discos de pele dos quais foram realizados os estudos de recuperação da paromomicina, após ensaio de permeação, possuíam aproximadamente $0,3 \text{ mL}$

de volume ($333 \pm 20,9 \text{ mm}^3$) e mais de 1 g de fármaco foi recuperado pelo gel FC-09 (0,5% PAR) após estudo em pele lesionada. Isso significa que, na área de 2 cm^2 em que ocorreu a difusão do fármaco, foi recuperado o equivalente a uma dose de aproximadamente $3,5 \text{ mg/mL}$ de fármaco. Enquanto isso, apenas cerca de $90 \text{ }\mu\text{g}$ de PAR foram recuperados após a aplicação da pomada de 15% na pele lesionada. Esse valor equivaleria a uma dose de aproximadamente $270 \text{ }\mu\text{g/mL}$, compatível com o descrito na literatura^{137,138} como o IC_{50} do fármaco para *L (L.) amazonensis*, *L (V.) brasiliensis* e *L (L.) infantum chagasi* (todas entre $133,8$ e $264,8 \text{ }\mu\text{g/mL}$, porém, abaixo do IC_{90} para estas mesmas espécies (~ 966 , ~ 430 e ~ 487 para *L (L.) amazonensis*, *L (V.) brasiliensis* e *L (L.) infantum chagasi*, respectivamente).

Apesar de não ser possível fazer uma extrapolação direta entre os dados de concentração do fármaco na pele e a concentração inibitória do fármaco nas espécies de *Leishmania*, é possível supor que esta possa ser uma das razões pelas quais são necessárias concentrações tão altas de paromomicina nas formulações testadas atualmente, geralmente, em regimes de associação com outros fármacos, inclusive^{137,139–145}.

As formulações desenvolvidas neste trabalho foram bastante bem sucedidas por possuírem um sensorial adequado e alcançarem níveis de deposição da PAR estatisticamente iguais, ou mesmo superiores aos do controle (pomada 15%), ainda que possuindo apenas uma fração de sua concentração. Assim, considerando que outras formulações (pomadas, cremes e géis) com concentrações similares às da pomada controle vêm apresentando resultados promissores em ensaios clínicos ao longo das últimas décadas^{44,47,146–149}, é possível assumir que os géis FC-04 e FC-09 possam representar alternativas eficazes e até mais eficientes quando comparados à estas formulações.

Além disso, por mais que a paromomicina não possua custo muito elevado (em comparação aos outros agentes antileishmaniais^{26,146}), o custo de uma preparação contendo 15% de fármaco provavelmente será superior ao de uma contendo 1%, mesmo levando-se em conta a natureza e preço dos demais componentes da formulação. Deve-se considerar, também, que a redução da concentração do fármaco para concentrações mais adequadas ao tratamento, reduz a possibilidade do aparecimento de reações adversas, como vermelhidão, prurido e dor, comumente relatados pelos pacientes em uso das apresentações tópicas convencionais de paromomicina^{9,11,43–46}.

Por fim, o desenvolvimento de géis capazes de modificar seu estado físico de acordo com a temperatura e a possibilidade de modular essa temperatura de transição para a temperatura da pele, abre caminho para a veiculação de formulações por meio de um *spray*, por

exemplo, que possibilitaria uma regulagem mais assertiva da quantidade (e, conseqüentemente, dosagem) aplicada, em função da quantidade de bombeamentos da válvula do *spray*. A iontoforese, neste caso, poderia atuar como um adjuvante ao tratamento, por meio da aplicação de *patches* contendo solução de paromomicina a ser liberada sobre as lesões no início do tratamento, permitindo uma dose de ataque, que seria mantida com a aplicação do gel em tempos previamente determinados.

6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de formas farmacêuticas mais adequadas para a liberação de fármacos, de acordo com suas características intrínsecas e ação esperada é de extrema importância. Para tal, géis hidrofílicos de poloxamer contendo paromomicina foram preparados, visando sua aplicação tópica sobre lesões cutâneas decorrentes de infecções por *Leishmania spp.* Os géis mostraram-se adequados para aplicação tópica em termos reológicos, capazes de transitar entre os estados sol e gel de acordo com a temperatura, permitindo uma gelificação *in situ* em função da temperatura da pele. As formulações apresentaram grande capacidade de penetração cutânea em ensaios *in vitro* com modelos de pele íntegra e lesionada e com capacidade de promover liberação e penetração entre 100 e 200 vezes superiores às da pomada (controle). A aplicação da iontoforese como adjuvante ao tratamento mostrou-se promissora e, analisando estes resultados, é possível crer que o sistema proposto seria capaz de desempenhar uma atividade superior aos demais na eliminação do parasito, possibilitando uma resolução mais eficiente, menos invasiva e, espera-se que, com menores taxas de recidivas.

7. REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly Epidemiol Rec.* 2016;91(5).
2. WHO WHO. Number of cases of cutaneous leishmaniasis reported - Data by country. WHO. Geneva: World Health Organization; 2020.
3. Bailey F, Mondragon-Shem K, Haines LR, Olabi A, Alorfi A, Ruiz-Postigo JA, et al. Cutaneous leishmaniasis and co-morbid major depressive disorder: A systematic review with burden estimates. Boelaert M, organizador. *PLoS Negl Trop Dis.* 25 de 2019
4. Al-Kamel MA. Stigmata in cutaneous leishmaniasis: Historical and new evidence-based concepts. *Our Dermatology Online.* 2017;8(1):81–90.
5. WHO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. 2017.
6. OPAS OP-A da S, Saúde OP-A da. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas - dezembro 2019. *Inf Leishmanioses.* 2019.
7. WHO technical report series. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2010.
8. Ravis WR, Llanos-Cuentas A, Sosa N, Kreishman-Deitrick M, Kopydlowski KM, Nielsen C, et al. Pharmacokinetics and absorption of paromomycin and gentamicin from topical creams used to treat cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013.
9. Kim DH, Chung HJ, Bleys J, Ghohestani RF. Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(2):e381.
10. Carneiro G, Santos DCM, Oliveira MC, Fernandes AP, Ferreira LS, Ramaldes GA, et al. Topical delivery and in vivo antileishmanial activity of paromomycin-loaded liposomes for treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Liposome Res.* 2010;20(1):16–23.
11. Masmoudi A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *J Dermatol Case Rep.* 2013;7(2):31–41.
12. de Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol.* 2015;16(2):99–109.
13. Sundar S, Chakravarty J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother.* 2015;16(2):237–52.
14. Epidemiológica BM da SS de V em SD de V. Manual for Surveillance of American Integumentary Leishmaniose. 2007;181.
15. Epidemiológica BM da SS de V em SD de V. Atlas of American Integumentary Leishmaniasis: clinical and differential diagnoses. 2006. 136 p.

16. Salmaso S, Caliceti P. Stealth properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers. *J Drug Deliv.* 2013;2013:374252.
17. Gratieri T, Gelfuso GM, de Freitas O, Rocha EM, Lopez RFV V. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;79(2):320–7.
18. Gupta NK, Tomar P, Sharma V, Dixit VK. Development and characterization of chitosan coated poly- (□ -caprolactone) nanoparticulate system for effective immunization against influenza. *Vaccine.* 2011;29(48):9026–37.
19. Kumari A, Yadav SKSC, Yadav SKSC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;75(1):1–18.
20. Djabri A, Guy RH, Bego M. Transdermal iontophoresis of ranitidine : An opportunity in paediatric drug therapy. 2012;435:27–32.
21. Ca J, Naik A, Kalia YN. Transdermal Delivery of Cytochrome C — A 12 . 4 kDa Protein — Across Intact Skin by Constant – Current Iontophoresis. 2007;24(7):1360–8.
22. Gratieri T, Gelfuso GM, Thomazini J a., Lopez RF V. Excised Porcine Cornea Integrity Evaluation in an in vitro Model of Iontophoretic Ocular Research. *Ophthalmic Res.* 2010;43(4):208–16.
23. Green PG, Hinz RS, Kim A, Szoka FC, Guy RH. Iontophoretic delivery of a series of tripeptides across the skin in vitro. *Pharm Res.* 1991;8(9):1121–7.
24. Lane ME. The transdermal delivery of fentanyl. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;84(3):449–55.
25. BRASIL M da SS de V em SD de VE. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de bolso. Brasília; 2010. 448 p.
26. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Kirk M, organizador. *PLoS One.* 2012;7(5):e35671.
27. Mokni M. Leishmanioses cutanées. *Ann Dermatol Venereol.* 2019;146(3):232–46.
28. OPAS OPA de S. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. O. D. Salomon, F. Edilson Ferreira Lima Jr RA e S, organizador. OPAS Organização Pan Americana de Saúde. Washington: OPAS; 2019. 166 p.
29. Couto DV, Filho GH, Medeiros MZ, Vicari CFS, Barbosa AB, Takita LC. American tegumentary leishmaniasis - a case of therapeutic challenge. *An Bras Dermatol.* 2014;89(6):974.
30. Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012;3:301.
31. Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9(10):925–32.
32. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em Saúde no Brasil 2003/2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. *Bol Epidemiológico.* 2019;50:1–154.
33. Mokni M, Mebazaa A, Boubaker S. Leishmanioses cutanées. *Ann Dermatol Venereol.* 2011;138(4):354–6.
34. Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous

- leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. Vol. 73, Journal of the American Academy of Dermatology. 2015.
35. de Menezes JP, Saraiva EM, da Rocha-Azevedo B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):264.
 36. Rossi M, Fasel N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! *Int Immunol*. 2018;30(3).
 37. Petropolis DB, Rodrigues JCFF, Viana NB, Pontes B, Pereira CFAA, Silva-Filho FC. Leishmania amazonensis promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. *PeerJ*. 2014;2:e317.
 38. Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Mortara RA, Tedesco RC, Cardoso FO, Carvalho LOP, et al. Extracellular matrix alterations in experimental murine Leishmania (L.) amazonensis infection. *Parasitology*. 2004;128(Pt 4):385–90.
 39. Fonseca AG da, Dias junior LB, Ferreira Junior A, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, et al. Adenocarcinoma papilifero primario de pelve renal e ureter. Relato de caso.. Vol. 22, Revista Paraense de Medicina. Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará; 2008. 9–20 p.
 40. Brasil M da SS de V em SD de V das DT. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar [recurso eletrônico]. Ministério da Saúde S de V em, Saúde D de V das DT, organizadores. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 189 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf
 41. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Vol. 73, *Drugs*. 2013.
 42. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother*. 2004;10(6):307–15.
 43. Carneiro G, Aguiar MG, Fernandes AP, Ferreira LAM. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012;9(9):1083–97.
 44. Soto J, Soto P, Ajata A, Luque C, Tintaya C, Paz D, et al. Topical 15% Paromomycin-Aquaphilic for Bolivian *Leishmania braziliensis* Cutaneous Leishmaniasis: A Randomized, Placebo-controlled Trial. *Clin Infect Dis*. 2019;68(5):844–9.
 45. Nassif PW, De Mello TFP, Navasconi TR, Mota CA, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. Vol. 144, *Parasitology*. 2017.
 46. Nagle AS, Khare S, Kumar AB, Supek F, Buchynskyy A, Mathison CJN, et al. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. *Chem Rev*. 2014;114(22):11305–47.
 47. Santos AM dos, Noronha EF, Ferreira LAM, Carranza-Tamayo CO, Cupolillo E, Romero GAS. Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com antimonial pentavalente. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(5):444–8.
 48. Bos JD, Meinardi MMHM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*. 2000;9(3):165–9.
 49. Goyal R, Macri LK, Kaplan HM, Kohn J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. *J Control Release*. 2016;240:77–92.

50. Petrilli R, Lopez RFV, Petrilli R, Lopez RFV. Physical methods for topical skin drug delivery: concepts and applications. *Brazilian J Pharm Sci.* 2018;54
51. Gratieri T, Kalia YN. Mathematical models to describe iontophoretic transport in vitro and in vivo and the effect of current application on the skin barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(2):315–29.
52. Gómez Pérez V, García-Hernandez R, Corpas-López V, Tomás AM, Martín-Sánchez J, Castanys S, et al. Decreased antimony uptake and overexpression of genes of thiol metabolism are associated with drug resistance in a canine isolate of *Leishmania infantum*. *Int J Parasitol Drugs drug Resist.* 2016;6(2):133–9.
53. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):111–26.
54. Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barrett MP, Madhubala R. Paromomycin: Uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* 2009;164(2):111–7.
55. Hendrickx S, Boulet G, Mondelaers A, Dujardin JC, Rijal S, Lachaud L, et al. Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *Parasitol Res.* 2014;113(5):1875–81.
56. Bavarsad N, Fazly Bazzaz BS, Khamesipour A, Jaafari MR. Colloidal, in vitro and in vivo anti-leishmanial properties of transfersomes containing paromomycin sulfate in susceptible BALB/c mice. *Acta Trop.* 2012;124(1):33–41.
57. Umezawa H, Kondo S. Ion-exchange chromatography of aminoglycoside antibiotics. In: Sidney P. Colowick; Nathan O. Kaplan, organizador. *Methods in Enzymology* v 43. 1º ed London: Academic Press; 1975. p. 263–78.
58. Serrano JM, Silva M. Rapid and sensitive determination of aminoglycoside antibiotics in water samples using a strong cation-exchange chromatography non-derivatisation method with chemiluminescence detection. *J Chromatogr A.* 2006;1117(2):176–83.
59. Lehotay SJ, Mastovska K, Lightfield AR, Nuñez A, Dutko T, Ng C, et al. Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* outubro de 2013;1313:103–12.
60. Tao Y, Chen D, Yu H, Huang L, Liu Z, Cao X, et al. Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2012;135(2):676–83.
61. Róna K, Klausz G, Keller E, Szakay M, Laczay P, Shem-Tov M, et al. Determination of paromomycin residues in turkey tissues by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2009;877(30):3792–8.
62. Oertel R, Neumeister V, Kirch W. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *J Chromatogr A.* 2004;1058(1–2):197–201.
63. Neva FA, Ponce C, Ponce E, Kreutzer R, Modabber F, Olliaro P. Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91(4):473–5.
64. Gonçalves GS, Fernandes AP, Souza RCC, Cardoso JE, de Oliveira-Silva F, Maciel FC, et al. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Trop.* 2005;93(2):161–7.
65. Ferreira LAMLS, Ramaldes GA, Nunan EA, Ferreira LAMLS. In Vitro Skin Permeation and Retention of Paromomycin from Liposomes for Topical Treatment of the Cutaneous Leishmaniasis. *Drug Dev Ind*

- Pharm. 3 de 2004;30(3):289–96.
66. Jaafari MR, Bavarsad N, Fazly Bazzaz BS, Samiei A, Soroush D, Ghorbani S, et al. Effect of Topical Liposomes Containing Paromomycin Sulfate in the Course of Leishmania major Infection in Susceptible BALB/c Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2259–65. <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01319-08>
 67. Heilmann S, Kuchler S, Wischke C, Lendlein A, Stein C, Schäfer-Korting M. A thermosensitive morphine-containing hydrogel for the treatment of large-scale skin wounds. *Int J Pharm.* 2013;444(1–2):96–102.
 68. Ying L, Tahara K, Takeuchi H. Drug delivery to the ocular posterior segment using lipid emulsion via eye drop administration: Effect of emulsion formulations and surface modification. *Int J Pharm.* 2013;453(2):329–35.
 69. Gratieri T, Gelfuso GM, Rocha EM, Sarmiento VH, de Freitas O, Lopez RFV. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;75(2):186–93.
 70. Liu Y, Yang F, Feng L, Yang L, Chen L, Wei G, et al. In vivo retention of poloxamer-based in situ hydrogels for vaginal application in mouse and rat models. *Acta Pharm Sin B.* 2017;7(4):502–9.
 71. Niu G, Du F, Song L, Zhang H, Yang J, Cao H, et al. Synthesis and characterization of reactive poloxamer 407s for biomedical applications. *J Control Release.* 2009;138(1):49–56.
 72. Yuan Y, Cui Y, Zhang L, Zhu H, Guo Y-S, Zhong B, et al. Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide. *Int J Pharm.* 2012;430(1–2):114–9.
 73. Djekic L, Krajisnik D, Martinovic M, Djordjevic D, Primorac M. Characterization of gelation process and drug release profile of thermosensitive liquid lecithin/poloxamer 407 based gels as carriers for percutaneous delivery of ibuprofen. *Int J Pharm.* 2015;490(1–2):180–9.
 74. Lu C, Liu M, Fu H, Zhang W, Peng G, Zhang Y, et al. Novel thermosensitive in situ gel based on poloxamer for uterus delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2015;77:24–8.
 75. Yu S, Zhang X, Tan G, Tian L, Liu D, Liu Y, et al. A novel pH-induced thermosensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan and poloxamer cross-linked by glutaraldehyde for ophthalmic drug delivery. *Carbohydr Polym.* 2017;155:208–17.
 76. POON K, CASTELLINO V, CHENG Y-L. Polymeric hydrophilic polymers in targeted drug delivery. In: *Artificial Cells, Cell Engineering and Therapy.* Elsevier; 2007. p. 42–71.
 77. Patel A, Cholkar K, Agrahari V, Mitra AK. Ocular drug delivery systems: An overview. *World J Pharmacol.* 2013;2(2):47–64.
 78. Erlanger G. Iontophoresis, a Scientific and Practical Tool in Ophthalmology. *Ophthalmologica.* 1954;128(4):232–46.
 79. Shoebibi N, Mahdizadeh M, Shafiee M. Iontophoresis in ophthalmology: A review of the literature. *Rev Clin Med.* 2014;1(4):183–8.
 80. Eljarrat-Binstock E, Domb AJ. Iontophoresis: a non-invasive ocular drug delivery. *J Control Release.* 2006;110(3):479–89.
 81. Burnette RR, Ongpipattanukul B. Characterization of the permselective properties of excised human skin

- during iontophoresis. *J Pharm Sci.* 1987;76(10):765–73.
82. Helmstädter A. The history of electrically-assisted transdermal drug delivery "iontophoresis". *Pharmazie.* 2001;56(7):583–7.
 83. Lopez RFV, Lange N, Guy R, Bentley MVLB. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(1):77–94.
 84. Gratieri T, Pujol-Bello E, Gelfuso GM, de Souza JG, Lopez RF V, Kalia YN. Iontophoretic transport kinetics of ketorolac in vitro and in vivo: demonstrating local enhanced topical drug delivery to muscle. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;86(2):219–26.
 85. Schultz AA, Strout TD, Jordan P, Worthing B. Safety, tolerability, and efficacy of iontophoresis with lidocaine for dermal anesthesia in ED pediatric patients. *J Emerg Nurs.* 2002;28(4):289–96.
 86. Khan W, Kumar N. Characterization, thermal stability studies, and analytical method development of Paromomycin for formulation development. *Drug Test Anal.* 2011;3(6):363–72.
 87. Mokh S, Jaber F, Kouzayha A, Budzinski H, Al Iskandarani M. Optimization and Comparisons for Separation, Detection and Quantification of 12 Aminoglycosides Using 2 Chromatographic Conditions by LC-MS/MS. *Am J Anal Chem.* 2014;05(14):982–94.
 88. Mokh S, El Hawari K, Nassar R, Budzinski H, Al Iskandarani M. Optimization of a Solid-Phase Extraction Method for the Determination of 12 Aminoglycosides in Water Samples Using LC-ESI-MS/MS. *Chromatographia.* 2015;78(9–10):631–40.
 89. BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 27, DE 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos. 2012.
 90. BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166 de 24 de 2017. Guia para validação de métodos analíticos. 2017.
 91. SUÍÇA. ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q2 (R1) “Validation of analytical procedures: text and methodology”. 2005.
 92. Damasceno TÂ de OS. Combinação de nanocarreadores lipídicos e métodos físicos para retenção de propionato de clobetasol em folículos pilosos. 2018;
 93. Quartier J, Capony N, Lapteva M, Kalia YN. Cutaneous Biodistribution: A High-Resolution Methodology to Assess Bioequivalence in Topical Skin Delivery. *Pharmaceutics.* 2019;11(9).
 94. Sá FAP de. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas mucoadesivos para liberação ocular de fármacos. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2015.
 95. Hertzler S, Knuth K, Preston R, Adams R, Lawrence K. Investigation of unknown impurities of Paromomycin in a 15% topical cream by liquid chromatography combined with mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2019;rcm.8513.
 96. Brugués AP, Naveros BC, Calpena Campmany AC, Pastor PH, Saladrigas RF, Lizandra CR. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine.* 2015;10(2):227–40.
 97. Sargent M, organizador. Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, RSC Analytical Methods Committee. LGC; 2013.

98. Berendsen BJA, Stolker L (A.)A. M, Nielen MWF, Nielen MWF. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. *TrAC Trends Anal Chem.* 2013;43:229–39.
99. Skoog D, Wasr D, Holler J, Crouch S. *Fundamentos de Química Analítica.* 2º ed. Cengage Learning; 2014. 1088 p.
100. Mizuno H, Ueda K, Kobayashi Y, Tsuyama N, Todoroki K, Min JZ, et al. The great importance of normalization of LC-MS data for highly-accurate non-targeted metabolomics. *Biomed Chromatogr.* 2017;31(1):e3864.
101. Smeraglia J, Baldrey SF, Watson D. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. *Chromatographia.* 2002;55(S1):S95–9.
102. Padilla JR, Gutierrez P, Grogl M, Berman JD, Arboleda M, Soto JM, et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): phase 2 pilot study. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(2):147–51.
103. Cota GF, de Sousa MR, Fereguetti TO, Saleme PS, Alvarisa TK, Rabello A. The Cure Rate after Placebo or No Therapy in American Cutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. Diemert DJ, organizador. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149697.
104. Armijos RX, Weigel MM, Calvopiña M, Mancheno M, Rodriguez R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004;91(2):153–60.
105. Murata H. Rheology - Theory and Application to Biomaterials. In: *Polymerization.* InTech; 2012.
106. Macosko CW. *Rheology : principles, measurements, and applications.* VCH; 1994. 550 p.
107. Han CD. *Polymer rheology.* Oxford University Press; 2007. 707 p.
108. Yanovsky YG. Some Theoretical and Numerical Approaches to Describing the Viscoelastic Properties of Polymer Systems. In: *Polymer Rheology: Theory and Practice.* Dordrecht: Springer Netherlands; 1993. p. 1–56.
109. Pereira GG, Dimer FA, Guterres SS, Kechinski CP, Granada JE, Cardozo NSM. Formulation and characterization of poloxamer 407®: Thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. *Quim Nova.* 2013;36(8):1121–5.
110. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharm Res.* 2006;23(12):2709–28.
111. Bodratti A, Alexandridis P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *J Funct Biomater.* 2018;9(1):11.
112. Jia G, Wang F, Yang X, Qian J. The hydrogen bonding dynamics and cooperative interactions of NMP–water mixture studied by dielectric relaxation spectroscopy. *J Mol Liq.* 2014;197:328–33.
113. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci.* 2006;28(5):359–70.
114. Swapna Rao P, Sathyanarayana DN, Jeevananda T. Conducting Polymers: Synthesis and Electrical Conductivity. In: Nalwa HS, organizador. *Advanced Funcional Molecules and Polymers: Electroni Vol 3c and Photonic Properties.* Amsterdã: Gordon & Breach; 2001.

115. McManus PM, Cushman RJ, Yang SC. Influence of oxidation and protonation on the electrical conductivity of polyaniline. *J Phys Chem.* 1987;91(3):744–7.
116. Ghadiri M, Vatanara A, Doroud D, Roholamini Najafabadi A. Paromomycin loaded solid lipid nanoparticles: Characterization of production parameters. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2011;16(3):617–23.
117. Patel A, Bell M, O'Connor C, Inchley A, Wibawa J, Lane ME, et al. Delivery of ibuprofen to the skin. *Int J Pharm.* 2013;457(1):9–13.
118. Lin CH, Fang CL, Al-Suwayeh SA, Yang SY, Fang JY. In vitro and in vivo percutaneous absorption of seleno-L-methionine, an antioxidant agent, and other selenium species. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(9):1181–90.
119. Angelo T, El-Sayed N, Jurisic M, Koenneke A, Gelfuso GM, Cunha-Filho M, et al. Effect of physical stimuli on hair follicle deposition of clobetasol-loaded Lipid Nanocarriers. *Sci Rep.* 2020;10(1):176.
120. Sekkat N, Kalia YN, Guy RH. Biophysical Study of Porcine Ear Skin In Vitro and Its Comparison to Human Skin In Vivo. *J Pharm Sci.* 2002;91(11):2376–81.
121. Davies DJ, Heylings JR, McCarthy TJ, Correa CM. Development of an in vitro model for studying the penetration of chemicals through compromised skin. *Toxicol Vitr.* 1 de 2015;29(1):176–81.
122. Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, et al. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Ski Res Technol.* 2007;13(1):19–24.
123. Meyer W, Kacza J, Zschemisch N-H, Godynicki S, Seeger J. Observations on the actual structural conditions in the stratum superficiale dermidis of porcine ear skin, with special reference to its use as model for human skin. *Ann Anat - Anat Anzeiger.* 2007;189(2):143–56.
124. Ge L, Zheng S, Wei H. Comparison of histological structure and biocompatibility between human acellular dermal matrix (ADM) and porcine ADM. *Burns.* 1 de 2009;35(1):46–50.
125. Franzen L, Mathes C, Hansen S, Windbergs M. Advanced chemical imaging and comparison of human and porcine hair follicles for drug delivery by confocal Raman microscopy. *J Biomed Opt.* 19 de 2012;18(6):061210.
126. Avci P, Sadasivam M, Gupta A, De Melo WC, Huang YY, Yin R, et al. Animal models of skin disease for drug discovery. Vol. 8, *Expert Opinion on Drug Discovery.* 2013. p. 331–55.
127. Khiao In M, Richardson KC, Loewa A, Hedtrich S, Kaessmeyer S, Plendl J. Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. *Anat Histol Embryol.* 2019;48(3):207–17.
128. Trommer H, Neubert RHH. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin Pharmacol Physiol.* 2006;19(2):106–21.
129. Lüllmann H. *Color atlas of pharmacology.* Thieme; 2000. 386 p.
130. Rubio L, Alonso C, López O, Rodríguez G, Coderch L, Notario J, et al. Barrier function of intact and impaired skin: percutaneous penetration of caffeine and salicylic acid. *Int J Dermatol.* 2011;50(7):881–9.
131. Guth K, Schäfer-Korting M, Fabian E, Landsiedel R, van Ravenzwaay B. Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. *Toxicol Vitr.* 2015;29(1):113–23.
132. Breternitz M, Flach M, Präbller J, Elsner P, Fluhr JW. Acute barrier disruption by adhesive tapes is

- influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping; a randomized, controlled study. *Br J Dermatol.* 2007;156(2):231–40.
133. Berrutti LE, Singer AJ, McClain SA. Histopathologic Effects of Cutaneous Tape Stripping in Pigs. *Acad Emerg Med.* 2000;7(12):1349–53.
 134. Dabboue H, Builles N, Frouin É, Scott D, Ramos J, Marti-Mestres G. Assessing the Impact of Mechanical Damage on Full-Thickness Porcine and Human Skin Using an *In Vitro* Approach. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1–10. /
 135. ABELL E, MORGAN K. Pharmacology and Treatment The treatment of idiopathic hyperhidrosis by glycopyrronium bromide and tap water iontophoresis. *Br J Dermatol.* 1974;91(1):87–91.
 136. Levit F. Simple Device for Treatment of Hyperhidrosis by Iontophoresis. *Arch Dermatol.* 1968;98(5):505–7.
 137. de Morais-Teixeira E, Gallupo MK, Rodrigues LF, Romanha AJ, Rabello A. In vitro interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(1):150–4.
 138. Maarouf M, Adeline MT, Solignac M, Vautrin D, Robert-Gero M. Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite.* 1998;5(2):167–73.
 139. Aguiar MG, Pereira AMM, Fernandes AP, Ferreira LAM. Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):699–704.
 140. Aguiar MG, Silva DL, Nunan FA, Nunan EA, Fernandes AP, Ferreira LAM. Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(6):1234–40.
 141. Fernandes AP, Carvalho FAA, Tavares CAP, Santiago HC, Castro GA, Tafuri WL, et al. Combined Interleukin-12 and Topical Chemotherapy for Established Leishmaniasis Drastically Reduces Tissue Parasitism and Relapses in Susceptible Mice. *J Infect Dis.* 2001;183(11):1646–52.
 142. Arana BA, Rizzo NR, Mendoza CE, Kroeger A. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(5):466–70.
 143. Grogl M, Schuster BG, Ellis WY, Berman JD. Successful Topical Treatment of Murine Cutaneous Leishmaniasis with a Combination of Paromomycin (Aminosidine) and Gentamicin. *J Parasitol.* 1999;85(2):354.
 144. Soto J, Fuya P, Herrera R, Berman J. Topical Paromomycin/Methylbenzethonium Chloride Plus Parenteral Meglumine Antimonate as Treatment for American Cutaneous Leishmaniasis: Controlled Study. Vol. 26, *Clinical Infectious Diseases.* Oxford University Press;. p. 56–8.
 145. EI-On J, Jacobs GP, Weinrauch L. Topical chemotherapy of cutaneous Leishmaniasis. *Parasitol Today.* 1988;4(3):76–81.
 146. Zulfiqar B, Shelper TB, Avery VM. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discov Today.* 2017;22(10):1516–31.
 147. de Morais-Teixeira E, Aguiar MG, Soares de Souza Lima B, Ferreira LAM, Rabello A. Combined

- suboptimal schedules of topical paromomycin, meglumine antimoniate and miltefosine to treat experimental infection caused by *Leishmania Viannia) braziliensis*. *J Antimicrob Chemother.* 2015
148. Jaafari MR, Bavarsad N, Fazly Bazzaz BS, Samiei A, Soroush D, Ghorbani S, et al. Effect of Topical Liposomes Containing Paromomycin Sulfate in the Course of *Leishmania major* Infection in Susceptible BALB/c Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2259–65.
149. Kapil S, Singh PK, Silakari O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. *Eur J Med Chem.* 2018;157:339–67.