



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

**ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DE  
USO TÓPICO CONTENDO IMMUCILLIN-DI4G COMO ALTERNATIVA  
TERAPÊUTICA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Mestranda

Fernanda Grendene Pacheco

Orientador

Prof. Dr. Pablo Machado

Co-Orientadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Temis Weber Furlanetto *Corte*

Porto Alegre

2016

FERNANDA GRENDENE PACHECO

**ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DE  
USO TÓPICO CONTENDO IMMUCILLIN-DI4G COMO ALTERNATIVA  
TERAPÊUTICA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador

Prof. Dr. Pablo Machado

Co-Orientadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Temis Weber Furlanetto *Corte*

Porto Alegre

2016

FERNANDA GRENDENE PACHECO

**ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DE  
USO TÓPICO CONTENDO IMMUCILLIN-DI4G COMO ALTERNATIVA  
TERAPÊUTICA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Fernanda Andreia Rosa – UEM

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rafael Fernandes Zanin – Unilasalle

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cristiano Valin Bizarro – PUCRS

Porto Alegre

2016

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Diógenes Santiago dos Santos por me proporcionar a oportunidade de trabalhar no laboratório do CPBMF.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Pablo Machado pelos ensinamentos, confiança, amizade e principalmente pela paciência em meus momentos de aflição.

A minha Co-Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Temis Weber Furlanetto Corte pelo apoio, incentivo, amizade, ajuda, participação no desenvolvimento deste trabalho e também por me acolher desde o primeiro dia com muito carinho e atenção.

A Farmácia Universitária por ceder o espaço para o desenvolvimento das formulações.

Ao Dr. Guilherme Petersen por me ajudar a realizar os estudos no CLAE.

Aos meus pais pelo investimento, incentivo, apoio, compreensão, amor e carinho sempre. Esta conquista também é de vocês!

Ao meu irmão, pelo carinho, apoio e paciência durante estes dois anos de mestrado.

Ao pessoal do laboratório da Cosmetologia em especial, Alex, Andressa e Eduardo pela compreensão e ajuda nos momentos de dificuldades no laboratório.

Aos meus colegas do laboratório do CPBMF, pelo convívio, amizade, conselhos e ajuda em todos os momentos que precisei.

Aos meus amigos por sempre me apoiarem.

E a todos que de certa forma contribuíram para esta conquista.

## RESUMO

**Introdução:** A Leishmaniose Cutânea é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas através das fêmeas dos mosquitos do gênero *Lutzomyia*. A Leishmaniose cutânea pode se manifestar de diferentes formas clínicas: cutânea localizada, cutânea disseminada, recidiva cútis e cutânea difusa. A região Norte e Nordeste são as mais acometidas pela doença. Os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B são os medicamentos mais utilizados para o tratamento desta doença, porém podem causar vários efeitos adversos fazendo com que muitos pacientes abandonem o tratamento. O controle ou a progressão da doença estão diretamente relacionados com a resposta imunológica desencadeada pelo indivíduo. A PNP é a enzima chave na rota de salvamento de purinas, catalisa a fosforólise reversível de nucleosídeos purínicos como deoxinosina e deoxiguanosina formando suas respectivas bases e deoxirribose-1-fosfato. Os inibidores da PNP podem ser utilizados para tratamento de doenças causadas por desordem mediada pelas células T, através da inibição segura e seletiva da proliferação da célula T. O Immucillin-DI4G (Immucillin de 4ª geração; 7-((bis(2-hidroxietil)amino)metil)-1,5-diidro-4H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-ona) é considerado como um potente inibidor da PNP.

**Objetivo:** desenvolver estudos de pré-formulação e formulação de uma forma farmacêutica de uso tópico contendo o Immucillin-DI4G como candidato a fármaco para tratamento da Leishmaniose Cutânea. **Materiais e Métodos:** Foi realizada a caracterização do composto através do RMN, EMS e FTIR-ATR. A estabilidade do pó amorfo foi avaliada durante 90 dias, o doseamento foi realizado através do CLAE. Formulações foram desenvolvidas para o estudo de estabilidade, estudos reológicos e espalhabilidade durante 30 e 90 dias. Um método para o doseamento do fármaco nas formulações foi desenvolvido e validado empregando o método de CLAE. **Resultados e discussão:** O Immucillin-DI4G (pó amorfo) mostrou-se estável até 30 dias quando armazenado a 4 °C e 25 °C. A formulação 1 (*Immucillin-DI4G a 1,1% em Gel polímero Carboxivinílico a 2% )* mostrou-se estável apenas quando armazenada a 4 °C por um período de 60 dias; é considerada como um Fluido Não-Newtoniano de comportamento pseudoplástico, sem alterações na viscosidade durante 90 dias, porém com alterações significativas na espalhabilidade quando armazenada a

45 °C. A formulação que continha aditivos (formulação 2) apresentou uma melhora na estabilidade quando armazenada a 45 °C num período de 30 dias, porém apresentou queda significativa no teor do fármaco quando armazenada a 4 °C e 25 °C. As formulações 3 (*Immucillin-DI4G a 1,1% em Creme-Gel*) e 4 (*Immucillin-DI4G a 1,1% em Gel Polímero Hidroxipropilcelulose a 2%*) apresentaram perdas significativas no teor do fármaco em 30 dias quando armazenadas a 45 °C. Os resultados demonstram que novos estudos devem ser realizados para a análise de possíveis produtos de degradação, para possíveis ajustes nas formulações.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cutaneous leishmaniasis is caused by *Leishmania* protozoan and transmitted through the female of *Lutzomyia* sandflies. The disease can manifest itself in different clinical forms: localized cutaneous leishmaniasis, disseminated cutaneous leishmaniasis, recidivans and diffuse cutaneous leishmaniasis. The North and Northeast (Brazil) are the most affected area by the disease. Pentavalent antimonials and amphotericin B have been the most used drugs for the treatment of this disease but may cause many side effects, which leads the patients to discontinue treatment. Control or progression of the disease has been related to the immune response triggered by the individual. PNP (purine nucleoside phosphorylase) is the key enzyme in the purine salvage route catalyzing the reversible phosphorolysis of purine nucleosides such as deoxyinosine or deoxyguanosine producing their respective bases and deoxyribose-1-phosphate. The PNP inhibitors can be used for treating diseases caused by disorder mediated by T cells. Immucillin - DI4G (4th generation Immucillin ; 7-((bis(2-hydroxyethyl)amine)methyl)-1,5-dihydro-4H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidin-4-one) is considered as a potent inhibitor of PNP.

**Objective:** development of pre-formulation and formulation studies of a pharmaceutical form for topical use containing Immucillin-DI4G as drug candidate for Cutaneous Leishmaniasis treatment. **Material and Methods:**

Characterization of the compound was performed by NMR, FTIR-ATR and HRMS. The stability of the amorphous powder was evaluated over 90 days using a HPLC method for quantification. Formulations have been developed for stability, rheological and spreadability studies over 30 and 90 days. A method for the quantification of Immucillin-DI4G in the formulation was developed and validated using the HPLC. **Results and discussion:** The Immucillin - DI4G (amorphous powder) was stable up to 30 days when stored at 4 °C and 25 °C. Formulation 1 (*Immucillin - DI4G 1.1% Carboxyvinylpolymer gel 2%*) was stable only when stored at 4 °C for a period of 60 days. Formulation 1 was considered as a non-Newtonian fluid with pseudoplastic behavior and no alterations in viscosity was observed over 90 days. On the other hand, significant changes in spreadability was observed when topical formulation was stored at 45 °C. The formulation containing additives (formulation 2) showed an improvement in

stability when stored at 45 °C for a period of 30 days, but there was a significant decrease in drug content when stored at 4 °C and 25 °C. Formulations 3 (*Immucillin-DI4G a 1,1% Gel-Cream*) and 4 (*Immucillin-DI4G 1.1% in Hydroxypropylcellulose polymer at 2%*) presented significant loss in the drug content in 30 days when stored at 45 °C. The results shows that further studies should be conducted in order to analyze the possible degradation products looking for design of novel formulations.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de transmissão da leishmaniose .....	18
Figura 2: PNP catalisa a fosforólise reversível de deoxiguanosina .....	22
Figura 3: Estrutura química do compostos análogos de nucleosídeos com capacidade de inibir a Purina Nucleosídeo Fosforilase Humana (hPNP).....	24
Figura 4: Curvas de fluidez e viscosidade de materiais com diferentes comportamentos reológicos. ....	27
Figura 5: Gradiente da fase móvel .....	38
Figura 6: RMN de <sup>1</sup> H do Immucillin-DI4G.....	43
Figura 7: RMN de <sup>13</sup> C do Immucillin-DI4G. ....	44
Figura 8: Espectro do infravermelho do Immucillin-DI4G. ....	45
Figura 9: Espectro de massas do Immucillin-DI4G DI4G obtido utilizando técnica de ESI ( <i>Electrospray Ionization</i> ).....	46
Figura 10: Comparação dos cromatogramas do Immucillin-DI4G armazenados a 4 °C, 25 °C e 45 °C nos tempos iniciais e finais.....	48
Figura 11: Cromatograma do hidrogel contendo apenas os excipientes da formulação sendo representado pelo pico cromatográfico no tempo de retenção (T <sub>R</sub> ) 8,64 min. ....	49
Figura 12: O cromatograma do hidrogel contendo os excipientes (T <sub>R</sub> = 8,60 min) e Immucilin-DI4G (T <sub>R</sub> = 5,03 min).....	50
Figura 13: Representação gráfica da regressão linear do método de doseamento para Immucilin-DI4G.....	51
Figura 14: Comparativo dos cromatogramas da formulação-1 com Immucillin-DI4G no tempo inicial e final armazenadas à 4 °C, 25 °C e 45 °C. ....	57

Figura 15: Reograma da Formulação 1 - Controle .....	58
Figura 16: Reograma da Formulação 1 - Immucillin-DI4G .....	59
Figura 17: Viscosidade aparente da F1 (Controle) armazenada a 4 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 (s <sup>-1</sup> ) nos tempos 0, 30 e 90 dias. ....	60
Figura 18: Viscosidade aparente da F1 (Immucillin-DI4G) armazenada a 4 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 (s <sup>-1</sup> ) nos tempos 0, 30 e 90 dias.....	60
Figura 19: Viscosidade aparente da F1 (Controle) armazenada a 25 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 (s <sup>-1</sup> ) nos tempos 0, 30 e 90 dias. ....	60
Figura 20: Viscosidade aparente da F1 (Immucillin-DI4G) armazenada a 25 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 (s <sup>-1</sup> ) nos tempos 0, 30 e 90 dias.....	60
Figura 21: Viscosidade aparente da F1 (Controle) armazenada a 45 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 (s <sup>-1</sup> ) nos tempos 0, 30 e 90 dias. ....	61
Figura 22: Viscosidade aparente da F1 (Immucillin-DI4G) armazenada a 45 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 (s <sup>-1</sup> ) nos tempos 0, 30 e 90 dias.....	61
Figura 23: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1(Controle) armazenada à 4 °C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (*p < 0,05)..	62
Figura 24: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1(Immucillin-DI4G) armazenada à 4 °C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (*p < 0,05) .....	62
Figura 25: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1(Controle) armazenada à 25 °C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (*p < 0,05)	62
Figura 26: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1(Immucillin-DI4G) armazenada à 25 °C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (*p < 0,05) .....	62

Figura 27: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1(Controle) armazenada à 45° C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (\*p < 0,05) 63

Figura 28: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1(Immucilin-DI4G) armazenada à 45 °C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (\*p < 0,05)..... 63

Figura 29: Avaliação citotóxica das formulações em MTT. .... 64

Figura 30: Comparativo dos cromatogramas da formulação-2 com Immucillin-DI4G no tempo inicial e final armazenadas a 4 °C, 25 °C e 45 °C ..... 66

Figura 31: Comparativo dos cromatogramas da formulação-3 com Immucillin-DI4G no tempo inicial e final armazenadas a 4 °C, 25 °C e 45 °C. .... 67

Figura 32: Comparativo dos cromatogramas da formulação-3 com Immucillin-DI4G no tempo inicial e final armazenadas a 4 °C, 25 °C e 45 °C. .... 68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Solubilidade do Immucillin-DI4G em diferentes tampões e pHs.....	46
Tabela 2: Viabilidade das células da linhagem Vero após 72 h de incubação com Immucillin-DI4G. ....	47
Tabela 3: Estabilidade do Immucillin-DI4G (pó amorfo) armazenado a 4 °C, 25 °C e 45 °C. ....	48
Tabela 4: Dados analíticos para curva de calibração do doseamento .....	50
Tabela 5: Doseamento realizado pelo Analista 2 das 5 (cinco) preparações de Immucillin-DI4G na concentração de 31,25 µg/mL. DP = Desvio Padrão, DPR = Desvio Padrão Relativo, E = Exatidão.....	52
Tabela 6: Dados analíticos da repetibilidade das análises conduzidas com o Analista 2 na concentração de 100 µg/mL. ....	52
Tabela 7: Dados analíticos da repetibilidade das análises conduzidas com o Analista 2 na concentração de 250 µg/mL. ....	52
Tabela 8: Percentual de recuperação obtida nas diferentes concentrações ....	53
Tabela 9: Análise quanto à avaliação da estabilidade da amostra a temperatura ambiente:.....	54
Tabela 10: Análise quanto a avaliação da estabilidade da amostra a 4 °C:.....	54
Tabela 11: Análise com variação do fluxo de 1,5 para 1,4 mL/min. ....	54
Tabela 12: Análise com variação do fluxo de 1,5 para 1,6 mL/min. ....	55
Tabela 13: Análise com alteração no comprimento de onda de 254 nm para 249 nm: .....	55
Tabela 14: Análise com alteração do no comprimento de onda de 254 nm para 259 nm: .....	55

Tabela 15: resumo das análises de aspecto, cor, pH e teor do teste de estabilidade da formulação controle e com Immucillin-DI4G..... 56

Tabela 16: Viabilidade das células da linhagem Vero após 72 h de incubação com as formulações. .... 63

Tabela 17: Teor de Immucillin-DI4G na Formulação 1 armazenada à 4 °C, 25 °C e 45 °C nos tempos inicial e final (30 dias). .... 64

Tabela 18: Teor de Immucillin-DI4G na Formulação 2 armazenada à 4 °C, 25 °C e 45 °C nos tempos inicial e final (30 dias). .... 65

Tabela 19: Teor de Immucillin-DI4G na Formulação 3 armazenada à 4 °C, 25 °C e 45 °C nos tempos inicial e final (30 dias). .... 66

Tabela 20: Teor de Immucillin-DI4G na Formulação 4 armazenada à 4 °C, 25 °C e 45 °C nos tempos inicial e final (30 dias). .... 68

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
BHT – di-terc-butil metil fenol  
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência  
D<sub>2</sub>O – Óxido de deutério  
dCyt - Deoxicitidina quinase  
dGMP – Deoxiguanosina monofosfato  
dGTP – Deoxiguanosina trifosfato  
dGUO - Deoxiguanosina  
DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
DMSO-d<sub>6</sub> - Dimetilsulfóxido *deuterado*  
DP – Desvio Padrão  
DPR – Desvio Padrão Relativo  
E - Exatidão  
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético  
IFN- $\gamma$  - Interferon-gama  
IL-10 – Interleucina 10  
IL-12 – Interleucina 12  
IL-2 – Interleucina 2  
IL-4 – Interleucina 4  
INPI - Instituto Nacional de Propriedade Intelectual  
IPBC – Iodopropinil butilcarbamato  
LC - Leishmaniose cutânea  
LCL - Leishmaniose cutânea localizada  
LDC - Leishmaniose cutânea disseminada  
LV - Leishmaniose visceral  
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio  
OMS - Órgão mundial de saúde  
PNP – Purina nucleosídeo fosforilase  
RE – Resolução  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
SEM – *Standard Error Of The Mean* (Erro padrão da média)

TCD4<sup>+</sup> - Linfócito TCD4<sup>+</sup>

TGF- $\beta$  - *Transforming growth factor-beta*

Th<sub>1</sub> - T helper tipo 1

Th<sub>2</sub> – T helper tipo 2

TMS - tetrametil silano

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral

UATR - *Universal Attenuated Total Reflectance*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT .....	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	9
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 LEISHMANIOSE .....	16
1.2 TRATAMENTO .....	19
1.3 RESPOSTA IMUNE .....	20
1.4 PURINA NUCLEOSÍDEO FOSFORILASE (PNP).....	22
2. FORMULAÇÕES DE APLICAÇÃO TÓPICA (SEMISSÓLIDA) .....	25
3. REOLOGIA.....	26
4. OBJETIVOS .....	29
4.1 OBJETIVOS GERAIS .....	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4.2.1 Realizar a caracterização da matéria-prima através dos seguintes parâmetros:.....	29
4.2.2 Realizar estudos de estabilidade do composto.....	29
4.2.3 Desenvolver diferentes formulações utilizando o Immucillin-DI4G como candidato a fármaco proposto. ....	29
4.2.4 Desenvolver e validar um método para a quantificação do Immucillin-DI4G em formulações tópicas através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. ....	29
4.2.5 Caracterizar os parâmetros físico-químicos das formulações através dos parâmetros:.....	29
4.2.6 Realizar o estudo de estabilidade preliminar das formulações. ....	29
4.2.7 Realizar o estudo de estabilidade acelerada ou normal das formulações .....	29
4.2.8 Determinar o comportamento reológico das formulações:.....	30
4.2.9 Determinar a espalhabilidade das formulações .....	30
4.2.10 Avaliação citotoxicidade <i>in vitro</i> da formulação em células Vero....	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32

5.1 MATÉRIAS-PRIMAS E REAGENTES .....	32
5.2 EQUIPAMENTOS .....	32
5.3 IMMUCILLIN-DI4G .....	32
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	32
5.4.1 Identificação do composto por ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C.     33	
5.4.2 Identificação do composto por espectroscopia no infravermelho .....	33
5.4.3 Identificação do composto por espectrometria de massas. ....	33
5.4.4 Determinação da solubilidade do composto. ....	34
5.4.5 Citotoxicidade do composto .....	34
5.5 ESTABILIDADE DO COMPOSTO .....	34
5.6 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES .....	35
5.7 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO IMMUCILLIN-DI4G EM FORMULAÇÕES TÓPICAS ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	37
5.7.1 Preparação da amostra para doseamento.....	37
5.7.2 Parâmetros cromatográficos:.....	37
5.7.3 Validação .....	38
5.8 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS FORMULAÇÕES .....	39
5.8.1 Avaliação das características organolépticas .....	39
5.8.2 Determinação do pH.....	39
5.8.3 Determinação do teor do composto nas formulações utilizando CLAE   39	
5.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR.....	40
5.10 ESTABILIDADE ACELERADA OU NORMAL .....	40
5.11 COMPORTAMENTO REOLÓGICO .....	40
5.11.1 Viscosidade aparente .....	40
5.11.2 Fluidez e Tixotropia .....	41
5.12 ESPALHABILIDADE .....	41
5.13 AVALIAÇÃO CITOXICIDADE DA FORMULAÇÃO. ....	41
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6.1 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE <sup>1</sup> H.....	43

6.2 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE <sup>13</sup> C.....	44
6.3 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....	44
6.4 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	45
6.5 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO COMPOSTO .....	46
6.6 CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO .....	47
6.7 ESTABILIDADE DO COMPOSTO .....	47
6.8 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO IMMUCILLIN-DI4G EM FORMULAÇÕES TÓPICAS ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	49
6.8.1 Especificidade e seletividade.....	49
6.8.2 Linearidade .....	50
6.8.2 Precisão.....	51
6.8.3 Exatidão.....	53
6.8.4 Robustez.....	54
6.9 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS ORGANOLÉPTICOS, FÍSICO-QUÍMICOS E ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO 1.....	56
6.10 COMPORTAMENTO REOLÓGICO DA FORMULAÇÃO 1.....	57
6.11 ESPALHABILIDADE DA FORMULAÇÃO 1 .....	61
6.12 AVALIAÇÃO CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> EM CÉLULAS VERO DA FORMULAÇÃO.....	63
6.13 ESTABILIDADE PRELIMINAR DE OUTRAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS.....	64
6.13.1 Formulação 1 (Immucillin-DI4G a 1,1% em Gel polímero Carboxivinílico a 2%) .....	64
6.13.2 Formulação 2 (Immucillin-DI4G a 1,1% em Gel polímero Carboxivinílico a 2% com aditivos) .....	65
6.13.3 Formulação 3 (Immucillin-DI4G a 1,1% em Creme-Gel).....	66
6.13.4 Formulação 4 (Immucillin a 1,1% em Gel Polímero Hidroxipropilcelulose a 2%) .....	67
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	70
8. REFERÊNCIAS.....	73

## *INTRODUÇÃO*

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose se encontra entre as seis principais doenças endêmicas que acomete o mundo. Reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada, a leishmaniose está presente em 98 países distribuídos por cinco continentes. Os números apontam para aproximadamente 1.3 milhões de casos novos com 20.000 a 50.000 óbitos anualmente<sup>1</sup>. Existem fatores de risco que podem aumentar a probabilidade de desenvolvimento da doença, como as condições socioeconômicas da população, mobilidade, mudanças ambientais e climáticas<sup>1-5</sup>. Entretanto, é importante destacar que, através da análise dos dados epidemiológicos da doença, se observa um aumento gradual do número de casos de leishmaniose em regiões onde a infraestrutura e saneamento básico são considerados adequados<sup>1-7</sup>.

A leishmaniose é causada por protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. O gênero é subdividido em *Leishmania*, no qual o protozoário é maior e coloniza o intestino anterior, médio e posterior, e *Viannia* sendo um protozoário menor que coloniza apenas o intestino anterior e médio<sup>1; 3; 7-10</sup>.

Nas Américas a leishmaniose é transmitida por mosquitos, exclusivamente através das fêmeas do gênero *Lutzomyia*, pertencente à ordem Díptera. São conhecidas popularmente como “mosquito-palha”, “birigui” e apresenta coloração castanho-claro<sup>2; 3; 7; 9; 10</sup>.

No Brasil as espécies mais encontradas são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (V.) Lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi* e *Leishmania (V.) shawi*. As três últimas espécies citadas foram encontradas recentemente no país. Tal fato pode estar relacionado com a presença dos vetores e reservatórios silvestres necessários<sup>3; 8-11</sup>.

De acordo com a espécie do protozoário a doença pode ser manifestada em duas formas, Visceral e Tegumentar. A Leishmaniose Visceral (LV), conhecida mundialmente como doença Kala-azar, é a manifestação mais grave, podendo levar o indivíduo a óbito rapidamente se não tratada. Esta forma é geralmente causada pelas espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* e afeta órgãos internos. Segundo

a OMS, mais de 90% dos 300.000 novos casos anuais de Leishmaniose Visceral ocorrem em países como Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão<sup>1; 5; 6; 12</sup>.

A Leishmaniose Tegumentar é subdividida na forma mucosa e a forma cutânea da doença, sendo classificadas de acordo com o seu aspecto clínico. Tem sido estimado aproximadamente 1 milhão de novos casos anualmente de Leishmaniose Tegumentar distribuídos principalmente em países como Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, Síria e Tunísia<sup>1; 5; 6; 13</sup>. No Brasil, as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste são as que mais apresentaram casos reportados no ano de 2013<sup>1; 5-7; 13</sup>.

Dentre as variantes da Leishmaniose Tegumentar, a Leishmaniose Mucosa ou Mucocutânea é considerada a mais agressiva, caracterizada por infiltração e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe e laringe deformando a face do indivíduo. Pode apresentar-se nas formas mucosa tardia, mucosa de origem indeterminada, mucosa contígua e mucosa primária<sup>3; 10</sup>.

A Leishmaniose Cutânea (LC) é causada principalmente pelas espécies *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L) amazonensis* e apresenta as formas clínicas: cutânea localizada, cutânea disseminada, recidiva cútis e cutânea difusa. Na LC, a lesão na pele surge depois da picada, após um período de incubação de 18 dias a 4 meses. A lesão é geralmente bem definida, arredondada, eritematosa podendo aumentar de tamanho e se transformar em uma úlcera. Pode haver a presença de exsudato, referente à infecção bacteriana associada. Esta forma da doença tende a cicatrizar espontaneamente, porém o indivíduo pode apresentar reinfecções cutâneas ou mucosas após um período<sup>2-4; 7; 9; 10; 14; 15</sup>.

A Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) se caracteriza por uma lesão única ou múltipla, do tipo úlcera, geralmente na mesma região da picada do inseto. Apresenta uma boa resposta ao tratamento e escassez do parasito. A Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD) é caracterizada por numerosas lesões em diversas partes do corpo, do tipo acneiforme, geralmente longe do local da picada. A lesão na forma recidiva cútis apresenta uma boa cicatrização central, porém presença de bordas infiltradas. A Leishmaniose Difusa é a forma mais rara e grave da leishmaniose cutânea, neste caso o indivíduo apresenta lesões deformantes, papulosas e ricas em parasito<sup>2-4; 7; 9; 10; 14-17</sup>.

## CICLO DE TRANSMISSÃO

O ciclo da transmissão começa quando a fêmea do flebotomíneo pica um animal ou indivíduo que já está infectado pelo protozoário. Ao picar o inseto ingere as células do sistema fagocitário infectadas pela *Leishmania* ou formas amastigotas que se encontram livres após a lise da célula hospedeira. Estas se desenvolvem no tubo digestivo do inseto, e se diferenciam em forma promastigotas pró-cíclicas, apresentando corpo ovoide e flagelo curto, e passam a se multiplicar. Os protozoários invadem então as porções anteriores do estômago e se transformam em formas promastigotas metacíclicas infectantes, cujo corpo celular é curto e delgado e são dotadas de um flagelo maior que facilitam a sua mobilidade. Quando o inseto pica novamente um indivíduo, o sangue não coagula, pelo fato de sua saliva ser rica em anticoagulantes. Então o inseto aspira o sangue, causando assim um relaxamento do músculo e posteriormente regurgitação de uma mistura do material aspirado juntamente com as formas promastigotas metacíclicas. Estas entram nas células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófago, e se diferenciam em amastigotas, na qual vão se multiplicar por meio de divisão binária simples, causando então o aumento destas formas dentro do macrófago. Por fim ocorre o esgotamento do citoplasma e ruptura da membrana do macrófago, liberando então as amastigotas para o meio extracelular conforme se observa na Figura 1<sup>2; 9; 10</sup>.

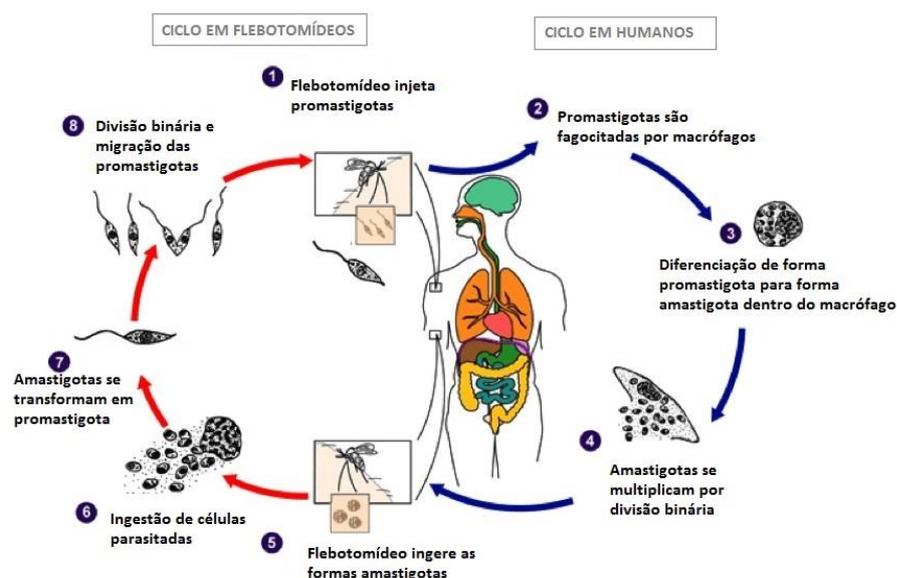


Figura 1: Ciclo de transmissão da leishmaniose (Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> acessado dia 10/07/14 as 19:07)

## 1.2 TRATAMENTO

Os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ) são os medicamentos utilizados como primeira escolha para o tratamento da leishmaniose. Estes fármacos apresentam desvantagens como: custo elevado e baixa adesão do paciente ao tratamento devido à necessidade de administração em um ambiente hospitalar. Além destes inconvenientes, estes medicamentos também podem causar vários efeitos colaterais indesejados (náuseas, vômito, dor abdominal, mialgia, etc) e não pode ser administrado em gestantes devido a sua alta toxicidade<sup>17; 18-22</sup>.

Atualmente, dois antimoniais são clinicamente disponíveis, o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime®). Importante mencionar que grande parte dos pacientes têm desenvolvido resistência aos fármacos a base de antimoniais pentavalentes. Este fato pode estar relacionado com a sua administração como primeira escolha desde a década de 40. Porém alguns autores também relatam que pode estar relacionado com a baixa adesão ao tratamento por parte dos pacientes. Este fato aumenta a seleção das formas resistentes do parasita e contribui para disseminação de protozoários resistentes aos fármacos<sup>18; 19; 23</sup>.

Anfotericina B é o medicamento de segunda escolha para tratar a leishmaniose, utilizado quando o paciente não apresenta melhoras com os antimoniais pentavalentes ou na impossibilidade do uso deste. Também se faz necessária sua administração em um âmbito hospitalar em virtude dos seus efeitos colaterais elevados. A anfotericina em forma lipossomal tem demonstrado efeitos adversos reduzidos, porém o seu custo é superior aos fármacos descritos anteriormente sendo, desta forma, mais utilizado em áreas endêmicas. No entanto, os pacientes que utilizam Anfotericina B precisam de monitoramento eletrocardiográfico e laboratorial das enzimas hepáticas e função renal, pois entre os efeitos adversos desenvolvidos encontra-se a insuficiência renal e alterações cardíacas<sup>4; 11; 18; 24-27</sup>.

Miltefosine é o único fármaco de administração por via oral utilizado principalmente para tratar a leishmaniose visceral e também o último medicamento lançado no mercado. É um medicamento de alta eficácia, inclusive para os casos que não respondem ao tratamento com antimoniais. Porém, a maior preocupação são seus possíveis efeitos adversos (anorexia, náusea, vômito e diarreia) combinado com uma baixa taxa de metabolização. Têm sido relatados eventos teratogênicos e tempos de meia-vida de aproximadamente 150 h a partir do uso do fármaco<sup>18-21; 28; 29</sup>.

Outro fármaco utilizado para tratamento da leishmaniose é o isotionato de pentamidina, que deve ser administrado via parenteral e, além de desenvolver vários efeitos adversos severos (diabetes mellitus, hipoglicemia severa, toxicidade renal) também é um tratamento com custo mais elevado (aproximadamente duas vezes mais caro) quando comparado ao tratamento de primeira escolha. Sabendo que o tratamento com antimoniais também gera despesas indiretas que estão relacionadas aos insumos hospitalares, afastamento do trabalho proporcionado pela eventual internação do paciente<sup>3-5; 9; 10; 11; 18; 19; 25</sup>.

No Brasil os medicamentos distribuídos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) são o Antimoniato *N*-metilglucamina, Anfotericina B e isotionato de pentamidina. Convém destacar que o esquema terapêutico utilizado para crianças é o mesmo que utilizado em pacientes adultos<sup>3-5; 9; 10; 11; 18-20; 25</sup>.

A Leishmaniose Cutânea é considerada uma doença tropical negligenciada e não fatal. Portanto não desperta o interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novas terapias. Foi estimado um custo de 13 milhões de dólares por ano durante os períodos de 2015 a 2030 com cuidado e tratamento de pacientes com a Leishmaniose Cutânea<sup>6; 14</sup>.

Nesse contexto, há uma urgência para a descoberta e desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da Leishmaniose Cutânea. Esses fármacos novos devem idealmente apresentar toxicidade reduzida, poucos efeitos adversos e possuírem custos baixos para que possam ser utilizados pela população de baixa renda.

### 1.3 RESPOSTA IMUNE

As células do sistema imune inato exercem uma função crucial na resistência ou suscetibilidade à *Leishmania*. Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutados no sítio da inoculação, eles fagocitam os parasitas e podem funcionar também como células hospedeiras temporárias do mesmo. Os neutrófilos apresentam um tempo de vida curto, logo sofrem a apoptose e são fagocitados pelos macrófagos que serão então contaminados<sup>16; 30-33</sup>.

Dentro dos macrófagos as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas e sofrem a ação de mecanismos leishmanicidas por espécies reativas do oxigênio e nitrogênio que são produzidas pelo macrófago depois de ser ativado por

citocinas. Alguns parasitas ainda sobrevivem a estas ações, devido à indução da ativação de células imunossupressoras como a TGF- $\beta$  que age inibindo a ativação do macrófago. Logo, o macrófago pode exercer mais de uma função na resposta imunológica ativada contra a leishmaniose, pois estas células podem servir como intermediárias para a replicação do parasita ou como moduladores da resposta imune, apresentando os parasitas para a célula T<sup>25; 30; 32-34</sup>.

A TGF- $\beta$  suprime a produção de IL-12, que está relacionada com a diferenciação das células T em células Th<sub>1</sub>. As células Th<sub>1</sub> são um dos tipos de células auxiliares (helper) do sistema imune. Estas células são muito importantes na caracterização da resposta imunológica desencadeada pela *Leishmania*. Estas células são responsáveis pela secreção de citocinas como a IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  as quais estão relacionadas com a destruição de parasitas<sup>16; 25; 33-37</sup>. Estudos posteriores revelaram que a IFN- $\gamma$  está associada diretamente com o controle da doença, pois ativam os macrófagos a produzirem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que estão relacionados com a destruição do parasita<sup>38; 39</sup>.

As células CD8 também participam do controle da infecção através da citotoxicidade mediada por estas. Através de um estudo foi possível constatar uma relação entre a resposta imune desencadeada pelas células CD8 e a lesão tecidual<sup>38; 39; 41</sup>.

Por outro lado, as células Th<sub>2</sub> se diferem por estarem ligadas à proliferação da doença. Estas secretam interleucinas, como IL-4 e IL-10, que além de participar da ativação macrófagica, também são responsáveis pela diferenciação e proliferação das células Th<sub>2</sub><sup>39; 41</sup>.

A interleucina-10 é uma das citocinas liberadas pelas células T relacionadas à doença, pois tem sido descrito que ela tem a capacidade de inibir a expressão da interleucina-12, favorecendo assim a progressão da enfermidade<sup>33; 35; 36</sup>.

De maneira geral, a resposta imunológica tende a ser bem característica de acordo com a classificação clínica. Indivíduos infectados com a Leishmaniose Cutânea Localizada apresentam inicialmente uma resposta das células Th<sub>1</sub> baixa, que tende a aumentar depois de um período. Porém tem sido observado que esta resposta tende a ser inadequada ou exagerada e que pode estar relacionada com inflamação severa das lesões. Nas lesões causadas por *L. braziliensis* é possível observar um infiltrado de linfócitos CD4, CD8, células B e macrófagos referentes a esta resposta exagerada<sup>38; 41-44</sup>.

Alguns autores destacam que esta resposta exagerada está relacionada com a excessiva ativação das células T e redução destas em serem moduladas de forma apropriadas por citocinas regulatórias<sup>38; 39; 40</sup>.

A Leishmaniose Cutânea Disseminada por sua vez desencadeia uma diminuição da imunidade celular (TCD4<sup>+</sup>). Na forma difusa observa-se uma falha na produção da resposta imunológica, portanto não há o controle da progressão ou multiplicação do parasito<sup>38; 41; 42; 45</sup>.

Logo, fármacos que possam modular a resposta imune, associados com medicamentos de primeira ou segunda escolha, também podem auxiliar no tratamento do paciente melhorando a resposta e aumentando as taxas de cura.

#### 1.4 PURINA NUCLEOSÍDEO FOSFORILASE (PNP)

A PNP é a enzima chave na rota de salvamento de purinas, catalisa a fosforólise reversível de nucleosídeos purínicos como deoxinosina e deoxiguanosina formando suas respectivas bases e deoxirribose-1-fosfato (Figura 2). Utiliza como substrato inosina e guanina, derivadas da hidrólise de ribonucleotídeos e 2-deoxiguanosina (dGUO) derivada da degradação do DNA<sup>46; 47</sup>. Há duas enzimas que utilizam dGUO como substrato são elas a PNP e Desoxicitidina quinase (dCyK), sendo que dCyK catalisa a conversão de dGUO em dGMP (Deoxiguanosina monofosfato), que é convertido posteriormente em dGTP (Deoxiguanosina trifosfato), logo dGUO apresenta maior afinidade pela dCyK do que PNP. Através da via de salvamento de purinas estas são resgatadas, gerando nucleotídeos para a síntese de DNA e RNA em células normais e, em especial, em células que estejam com a atividade proliferativa aumentada<sup>47-49</sup>.

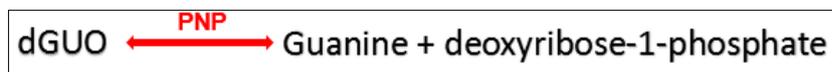


Figura 2: PNP catalisa a fosforólise reversível de deoxiguanosina (dGUO) gerando guanina e deoxirribose-1-fosfato. Adaptado Bzowska, A. et al. 2000.

Em humanos esta enzima é encontrada com maior atividade no fígado, linfócitos periféricos e granulócitos, sendo os eritrócitos a fonte mais abundante, por ser dependente da biossíntese de nucleotídeos pela via de salvamento<sup>47-49</sup>.

Esta enzima é considerada alvo de tratamentos em quimioterapias desde 1975, quando um pesquisador observou em uma criança que sofria de linfopenia com células T defeituosas e a diminuição na atividade da PNP. Assim, a busca por inibidores da PNP tornou-se uma prioridade<sup>47-50</sup>.

Os inibidores da PNP podem ser utilizados para tratamento de doenças causadas por desordem mediada pelas células T, através da inibição segura e seletiva da proliferação da célula T. As células T dependem da atividade da PNP para manter suas funções, logo a inibição seletiva da proliferação das células T pode ser ocasionada pela inibição da PNP e pelo acúmulo de dGTP no interior da célula uma vez que dGTP é tóxico para a célula linfóide. Este acúmulo de dGTP está relacionado a incapacidade de os nucleotídeos atravessarem a membrana celular, resultando na inibição da síntese do DNA e replicação celular<sup>47-50</sup>.

Entre os inibidores da PNP já estudados, a classe dos Immucillins (derivados 9-deazapurinas) foi a que apresentou maior eficácia, sendo considerado hoje como os inibidores mais potentes. Alguns desses compostos encontram-se atualmente em estudos clínicos de fase I e II para tratamento de leucemias com especificidade para células T<sup>47-53</sup>.

No geral, os compostos químicos com capacidade de inibir a PNP são análogos de nucleosídeos com modificações da base e/ou da pentose. Após a proposição do estado de transição do complexo ativado da reação catalisada pela enzima, compostos químicos potentes têm sido descritos<sup>47</sup>. Suas estruturas têm sido planejadas para mimetizar o estado de transição da reação e, deste modo, produzir interações intermoleculares eficientes com a proteína. A estrutura mais ativa da primeira série de inibidores do estado de transição foi o Immucilin-H com uma constante de dissociação ( $K_d$ ) de 56 pM (Figura 3)<sup>55</sup>. Posteriormente foi demonstrada a eficácia da molécula na imunossupressão seletiva de células-T.

Seguindo o desenvolvimento de inibidores novos uma segunda geração de compostos foi descrita. O composto mais efetivo desta segunda geração é conhecido como DADME-ImmH (Figura 3) e apresenta um  $K_d$  de 8,5 pM<sup>56</sup>. As mudanças estruturais simplificaram a molécula reduzindo o número de carbonos assimétricos o que proporcionou uma facilidade sintética maior. O DaTME-ImmH (Figura 3) é considerado um composto de terceira geração que apresenta estrutura similar ao Immucillin-H de primeira geração com uma cadeia lateral acíclica. A estrutura apresenta um  $K_d$  de 8,6 pM em relação à enzima<sup>56; 57;58</sup>.

Em 2010 uma quarta geração de análogos do estado de transição da reação catalisada pela PNP foram propostos. O composto denominado SerME-ImmH (Figura 3) foi descrito como o mais efetivo da série sintetizada com  $K_d$  de 5,2 pM<sup>57</sup>. Todos os compostos supracitados são descritos na literatura patentária o que induziu nosso grupo de pesquisa a desenvolver uma estrutura inédita que apresentasse inibição potente sobre a PNP humana. Assim, o Immucillin-DI4G (Immucillin de 4ª geração; 7-((bis(2-hidroxietil)amino)metil)-1,5-diidro-4*H*-pirrolo[3,2-*d*]pirimidin-4-ona) foi sintetizado e avaliado quanto a capacidade inibitória sobre a referida enzima. Dados de inibição apontaram que a molécula é capaz de inibir a reação catalisada pela enzima com  $IC_{50}$  de 40,6 nM com uma constante de inibição ( $K_i$ ) para o substrato inosina de 11,8 nM<sup>59</sup>. A estrutura foi também objeto de um pedido de depósito de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) uma vez que apresentou capacidade de reduzir a perda óssea em modelos murinos<sup>54</sup>.

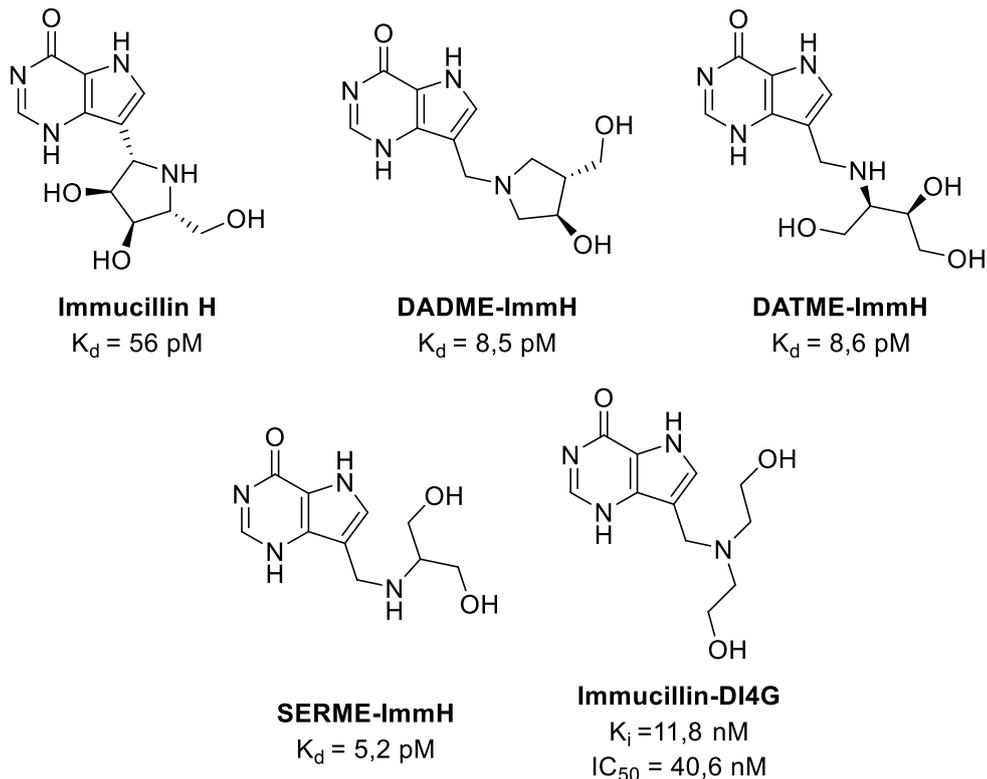


Figura 3: Estrutura química dos compostos análogos de nucleosídeos com capacidade de inibir a Purina Nucleosídeo Fosforilase Humana (hPNP).

Com o intuito de avaliar a capacidade do Immucillin-DI4G de modular a produção de IFN- $\gamma$ , o composto foi adicionado na concentração de 300 nM em culturas estimuladas com 1  $\mu\text{g}$  ou 5  $\mu\text{g}$  de antígeno solúvel de leishmania. A percentagem

média em culturas estimuladas com 1 µg foi de 46% e em culturas estimuladas com 5 µg foi de 72%. A dose do composto (300 nM) foi determinada após realizar uma curva dose resposta em culturas de células de indivíduos sadios estimuladas com mitégeno fitohemaglutinina (PHA). Nestes experimentos as concentrações de 300 nM e 600 nM de Immucillin-DI4G foram as que induziram maior supressão, sendo a concentração de 300 nM escolhida para avaliar a supressão da produção de IFN-γ em culturas estimuladas com antígeno de leishmania (dados não publicados) <sup>40</sup>.

## 2. FORMULAÇÕES DE APLICAÇÃO TÓPICA (SEMISSÓLIDA)

As formulações tópicas são muito utilizadas para o tratamento de doenças que acometem a pele, portanto podem ser uma alternativa para o tratamento da Leishmaniose Cutânea. Além disso, a formulação tópica apresenta grandes vantagens quando comparada ao tratamento convencional: fácil administração, menos efeitos adversos, aumento da adesão ao tratamento, baixo custo na produção e, por consequência, redução do custo do tratamento<sup>60-63</sup>.

Para o desenvolvimento de formulações tópicas é necessário ter informações sobre a lesão a qual será tratada e suas características, pois dependendo da forma da lesão certos veículos a serem utilizados podem não ser os mais apropriados<sup>59-62</sup>.

Tendo em vista que a lesão da LC trata-se de uma úlcera exposta, a formulação deve ter uma capacidade de adesão à superfície, para que permaneça no local de aplicação. Portanto, as formulações semissólidas são ideais para este tipo de tratamento devido ao seu comportamento reológico que confere a dificuldade de escoamento da formulação<sup>16; 60; 64</sup>.

Os géis são formas farmacêuticas semissólidas, caracterizadas por um sistema disperso de moléculas orgânicas ou inorgânicas. Esta forma farmacêutica é muito utilizada para o tratamento tópico devido a sua consistência, a qual é adquirida através de agentes gelificantes (polímeros) de alto peso molecular<sup>60; 62-64</sup>.

Os hidrogéis ou géis hidrofílicos são os mais utilizados por terem uma boa apresentação e boa espalhabilidade. Consistem principalmente de 85 a 95% de água ou álcool na sua formulação<sup>58; 63-67</sup>.

### 3. REOLOGIA

A reologia estuda a capacidade de escoamento e deformação da matéria de interesse quando aplicada uma tensão ou força externa sobre a mesma. Dentro da reologia podem-se obter informações quanto à viscosidade, fluidez, tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento do material. Estas características servem para a caracterização de formulações farmacêuticas, avaliar a modificação da formulação no decorrer dos testes de estabilidade, garantindo assim a qualidade do produto<sup>68</sup>.

A resistência para fluir é determinada através da viscosidade, portanto quanto maior a viscosidade maior a resistência para fluir. Ela pode ser obtida através da equação de Isaac Newton:

$$\eta = \frac{\tau}{D}$$

Onde  $\eta$  corresponde a viscosidade (Pa.s),  $\tau$  (Pa) correspondente à tensão de cisalhamento, D correspondente à velocidade ou taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ )<sup>68; 69</sup>.

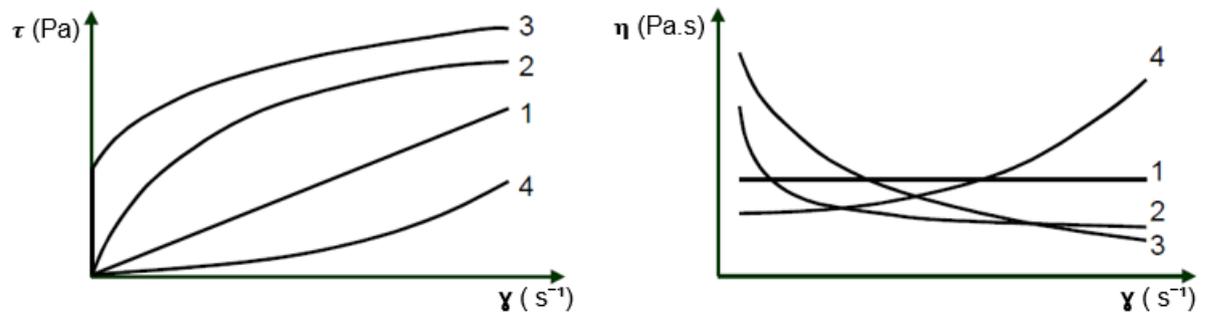
O reograma utilizado para quantificar o material quanto à reologia, é obtido através da representação gráfica da tensão de cisalhamento *versus* a taxa de cisalhamento. Através desta representação é possível realizar a classificação do fluido em Fluido Newtoniano ou Fluido Não-Newtoniano<sup>68; 69</sup>.

O Fluido Newtoniano ou de viscosidade ideal se caracteriza por apresentar uma viscosidade constante independente da taxa de cisalhamento<sup>68; 69</sup>.

O Fluido Não-Newtoniano não apresenta esta relação linear entre a viscosidade e taxa de cisalhamento. A viscosidade neste caso pode depender de outros fatores como a estrutura química, modo de preparo, etc. Normalmente formas farmacêuticas mais complexas como géis, emulsões, cremes e suspensões estão nessa classe comportamental. Os Fluidos Não-Newtonianos ainda podem ser classificados como apresentando um comportamento Plástico, Pseudoplástico e Dilatante<sup>67-70</sup>.

Fluidos Plásticos apresentam uma dificuldade inicial maior em fluir, porém depois de alcançar certa tensão o material flui com mais facilidade. Em produtos com comportamento pseudoplástico observa-se a redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Em fluidos dilatantes observa-se a o aumento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento<sup>67-70</sup>.

Além disso, os Fluidos Não-Newtonianos podem apresentar um comportamento dependente do tempo. Ou seja, quando a tensão de cisalhamento é cessada, o fluido demora a voltar à sua viscosidade inicial (Tixotropia)<sup>67-70</sup>.



- 1 - Fluido Newtoniano
- 2 - Fluido Não-Newtoniano (Pseudoplástico)
- 3 - Fluido Não-Newtoniano (Plástico)
- 4 - Fluido Não-Newtoniano (Dilatante)

Figura 4: Curvas de fluidez e viscosidade de materiais com diferentes comportamentos reológicos (Adaptado de RheoTec, 2015).

## *OBJETIVOS*

---

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver estudos de pré-formulação e formulação de uma forma farmacêutica de uso tópico contendo o Immucillin-DI4G, um candidato a fármaco pertencente à classe das Imucilinas de quarta geração para posteriores avaliações da sua eficácia e efetividade em modelos de Leishmaniose Cutânea.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Realizar a caracterização da matéria-prima através dos seguintes parâmetros:

- ✓ Identificação do composto por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massas.
- ✓ Determinação da solubilidade do composto.
- ✓ Estudos de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células VERO do composto.

4.2.2 Realizar estudos de estabilidade do composto

4.2.3 Desenvolver diferentes formulações utilizando o Immucillin-DI4G como candidato a fármaco proposto.

4.2.4 Desenvolver e validar um método para a quantificação do Immucillin-DI4G em formulações tópicas através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

4.2.5 Caracterizar os parâmetros físico-químicos das formulações através dos parâmetros:

- ✓ Avaliação das características organolépticas
- ✓ Determinação do teor do composto nas formulações utilizando CLAE

4.2.6 Realizar o estudo de estabilidade preliminar das formulações.

4.2.7 Realizar o estudo de estabilidade acelerada ou normal das formulações

4.2.8 Determinar o comportamento reológico das formulações:

- ✓ Viscosidade aparente
- ✓ Tixotropia
- ✓ Ponto de fluidez

4.2.9 Determinar a espalhabilidade das formulações

4.2.10 Avaliação citotoxicidade *in vitro* da formulação em células Vero.

## *MATERIAIS E MÉTODOS*

---

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 MATÉRIAS-PRIMAS E REAGENTES

Imidazolinidil uréia solução a 50%  
EDTA – Delaware  
Metabissulfito de sódio – All Chemistry  
AMP Ultra PC 2000 – Fagron  
Propilenoglicol – Galena  
Metilparabeno – Pharmanostra  
Carbomero 940 – All chemistry  
Metanol – Lichrosolv  
Acetonitrila – Panreac  
Acetato de Amônio – Quimex  
Mili-Q® Ultrapure  
DMSO – Cambridge Isotope Laboratories Inc.  
Immucillin-DI4G – SSKBIO – Índia

### 5.2 EQUIPAMENTOS

Espectrômetro de RMN de 60 MHz - Anasazi EFT-60  
Espectrômetro infravermelho - Spectrum 100, PerkinElmer  
Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) -  
Espectrômetro de massas de alta resolução- LTQ Orbitrap Discovery - Thermo  
Fisher Scientific  
Viscosímetro de Brookfield – Rheology International  
pHmetro digital – Thermo Orion 410  
Balança analítica – IKA® RCT basic  
Estufa a vácuo – Tecnal TE-395  
Aparato para teste de espalhabilidade  
Leitor de Microplaca – SpectraMax M2e, Molecular Devices  
Coluna EC250/4.6 Nucleodur 100-5 C18ec 5micras - Macherey- Nagel

### 5.3 IMMUCILLIN-DI4G

O Immucillin-DI4G foi sintetizado em quantidades de miligramas pelo nosso grupo, no Laboratório de Síntese Química do CPBMF, em Porto Alegre, e em quantidades de kg pela SSK Biociências Ltd, de Hyderabad na Índia.

### 5.4 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

#### 5.4.1 Identificação do composto por ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .

A técnica de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  fornece informações sobre a estrutura química das moléculas estudadas podendo-se estabelecer o padrão de conectividade dos átomos e os tipos de ligações químicas que compõem a estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi obtido através de um Espectrômetro de RMN de 60 MHz (Anasazi EFT-60), através do NUTS Pro Utility Transform Software – 2D Professional Version 20100128 (Anazaki Date Only).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi obtido através de um Espectrômetro de RMN Bruker (Fourier 300) operando em 75 MHz a uma temperatura de 25 °C, na Universidade de Caxias do Sul (UCS).

#### 5.4.2 Identificação do composto por espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho utiliza a parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das micro-ondas. A porção de maior utilidade está situada entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ . Os padrões das frequências de absorções dos grupamentos químicos fornecem a possibilidade de um número elevado de informações estruturais<sup>76</sup>.

O espectro foi obtido em um Espectrômetro de infravermelho (Spectrum 100, PerkinElmer), na região de  $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ , à temperatura ambiente utilizando o aparato UATR (*Universal Attenuated Total Reflectance*).

#### 5.4.3 Identificação do composto por espectrometria de massas.

A análise do composto foi realizada em um Espectrômetro de Massas utilizando o programa Qual Browser From Thermo Xcalibur 2.2 - Thermo Fisher Scientific.

A massa de Immucillin-DI4G (0,001g) foi determinada através da balança analítica e diluído com uma solução de Acetonitrila/Metanol (1:1). A solução foi filtrada (filtro  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ ) e diluída com uma solução padrão utilizada no Espectrômetro de Massas. A solução foi então injetada manualmente no aparelho para a obtenção do espectro.

#### 5.4.4 Determinação da solubilidade do composto.

A solubilidade foi avaliada em água (pH 6,7), tampão acetato (pH 2,5 e 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8).

Uma alíquota de 1 mL do solvente foi adicionada em tubos do tipo falcon de 50 mL. A amostra foi então adicionada de forma crescente em cada falcon até a obtenção de um sistema saturado do composto. Os tubos foram mantidos em agitação em um *shaker* à 18000 rpm, a uma temperatura de 25 °C durante um período de 24 horas. Após este período as amostras foram retiradas do shaker e passaram por um processo de centrifugação. O sobrenadante foi coletado, filtrado (filtro 0,22 µm) e diluído com o solvente. A quantificação foi realizada com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

#### 5.4.5 Citotoxicidade do composto

Uma cultura de células VERO (células de rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*)) foi previamente preparada, utilizando meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de Penicilina e Estreptomicina. A cultura foi mantida em estufa a 37 °C e atmosfera umidificada com 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente as células foram lavadas com tampão PBS e com uma solução de tripsina. As células foram então cultivadas em placas de 96 poços (5x10<sup>4</sup> células/mL) e tratadas com o composto em diferentes concentrações.

A citotoxicidade do composto foi avaliada pela viabilidade celular determinada através do teste de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). O meio com o tratamento foi removido e 0,1 mL de meio DMEM sem soro contendo MTT (1 mg/ml) foi adicionado. A placa foi incubada em estufa a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> por 2 horas. Após a remoção do meio com MTT foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver o precipitado. Após a agitação por 30 minutos foi realizada então a leitura espectrofotométrica a 570 nm em leitora de placa. Uma solução hidroalcoólica 80% foi utilizada como controle negativo. Como controle positivo foi efetuado tratamento com como agentes geradores de estresse oxidativo.

### 5.5 ESTABILIDADE DO COMPOSTO

Alíquotas de 0,010 g de Immucillin-DI4G foram armazenados em frascos de vidros (3 frascos de 10 mL), vedados com tampa e envoltos com papel alumínio. Cada frasco foi armazenado em uma condição diferente (4 °C, 25 °C, 45 °C). A estabilidade do composto foi avaliada através do teor por CLAE nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 dias.

## 5.6 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

### *Formulação 1 – Immucillin-DI4G a 1,1% em Gel polímero Carboxivinílico a 2%*

Componentes	Quantidade (g ou mL)	Função
Água	91,2	Veículo
Propilenoglicol	3	Umectante
Polímero Carboxivinílico	2,2	Agente de viscosidade
Aminometilpropanol	2	Alcalinizante
Immucillin – DI4G	1,1	Fármaco
Diazolinidil uréia + IPBC	0,5	Conservantes

#### Técnica de preparo

O método de preparo da formulação foi realizado à frio como descrito por Corte, T. (2000). Para manipular o gel base, todos os componentes da formulação foram pesados com o auxílio de uma balança analítica. O polímero carboxivinílico foi previamente triturado em um gral, e em seguida o conteúdo foi adicionado em um béquer contendo 76,2 mL de água. A mistura ficou em repouso pelo tempo necessário para sua completa hidratação. O propilenoglicol e o conservante (Diazolinidil Uréia + IPBC) foram previamente dissolvidos em 5 mL de água e a solução resultante foi adicionada ao polímero sob constante agitação. O aminometilpropanol foi dissolvido em 10 mL de água e adicionado sob constante agitação ao polímero para efetuar a neutralização do meio. O Immucillin-DI4G foi então previamente triturado em gral com a adição de 5 mL de água para a sua umidificação e incorporado sob constante agitação em 50 g do gel base. Para a manipulação da formulação controle (ausência do fármaco), 50 g do gel base anteriormente preparado foram separados, e 5,5 mL de água foram incorporadas no gel sob constante agitação.

*Formulação 2 – Immucillin-DI4G a 1,1% em Gel polímero Carboxivinílico a 2% com aditivos*

Componentes	Quantidade (g ou mL)	Função
Água	90,1	Veículo
Polímero Carboxivinílico	2,2	Agente de viscosidade
Propilenoglicol	3	Umectante
Aminometilpropanol	2	Alcalinizante
Immucillin-DI4G	1,1	Fármaco
Metabissulfito de sódio	1	Antioxidante
Diazolinidil uréia + IPBC	0,5	Conservantes
EDTA	0,1	Quelante

Técnica de preparo

A técnica utilizada para o desenvolvimento desta formulação foi a mesma já citada anteriormente. Porém o EDTA e metabissulfito de sódio são incorporados juntamente com o propilenoglicol e o conservante.

*Formulação 3 – Immucillin-DI4G a 1,1% em Creme-Gel*

Componentes	Quantidade (g ou mL)	Função
Polawax	48	Emulsificante
Água	42,1	Veículo
Propilenoglicol	3	Umectante
Polímero Carboxivinílico	2,2	Agente de Viscosidade
Aminometilpropanol	2	Alcalinizante
Immucillin-DI4G	1,1	Fármaco
Metabissulfito de sódio	1	Antioxidante
Diazolinidil uréia + IPBC	0,5	Conservantes
EDTA	0,1	Quelante

Técnica de preparo

O gel foi previamente manipulado utilizando a técnica já citada anteriormente. A base de Polawax foi incorporada aos poucos na formulação sob constante agitação até a completa homogeneização.

*Formulação 4 – Immucillin-DI4G a 1,1% em Gel Polímero Hidroxipropilcelulose a 2%*

Componentes	Quantidade (g ou mL)	Função
Álcool etílico	96,65	Veículo
Hidroxipropilcelulose	2,2	Agente de Viscosidade
Immucillin-DI4G	1,1	Fármaco
BHT	0,05	Antioxidante

### Técnica de preparo

As massas de hidroxipropilcelulose, BHT foram determinadas em balança analítica e adicionadas para um béquer. O volume álcool etílico 96% foi adicionado sobre os componentes e a mistura foi agitada até a completa dissolução dos componentes. O Immucillin-DI4G foi previamente triturado no gral com a adição de 5 mL de álcool etílico 96% para a sua umidificação e incorporado sob constante agitação em 45 g do gel base previamente preparado. Para a manipulação da formulação controle (ausência do fármaco), 5 mL de álcool etílico 96% foram adicionados à 45 g do gel base sob constante agitação.

## 5.7 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO IMMUCILLIN-DI4G EM FORMULAÇÕES TÓPICAS ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

### 5.7.1 Preparação da amostra para doseamento

Foi ressuspendido 0,5 g do gel com 50 mL de água Ultrapura (Milli-Q®). Posteriormente, foi homogeneizado uma alíquota de 1000 µL e pipetada em frascos para CLAE. Um volume de 10 µL de amostra foi injetado automaticamente no CLAE para efetuar a análise de quantificação.

### 5.7.2 Parâmetros cromatográficos:

Fase móvel: A - Acetonitrila/Metanol (1:1); B - Acetato de Amônia 0,01 M

Gradiente: 95%B – 30%B – 95%B

Comprimento de onda: 254 nm

Fluxo: 1,5 mL/min

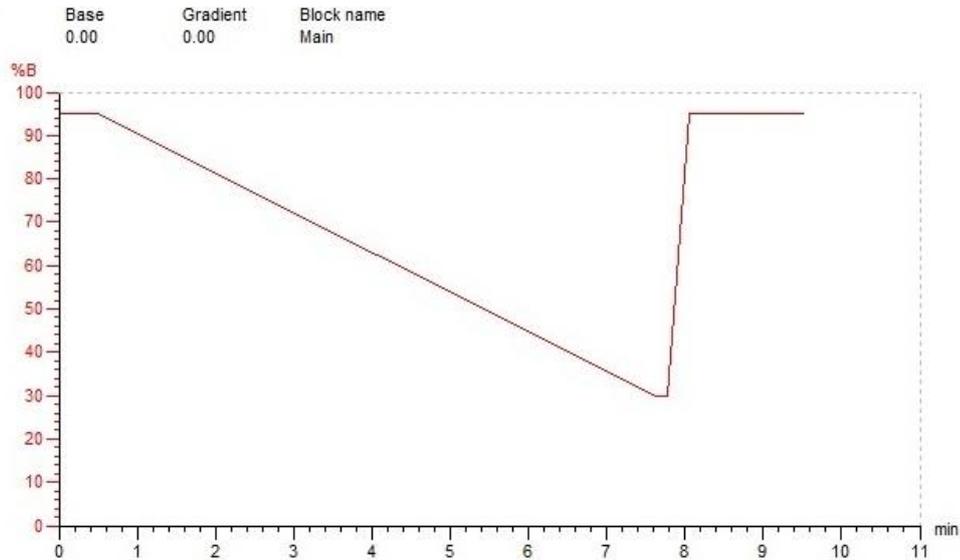


Figura 5: Gradiente da fase móvel

### 5.7.3 Validação

#### 5.7.3.1 Especificidade e seletividade

Para esta análise a formulação sem o composto de interesse e a formulação contendo Immucillin-DI4G foram preparadas e as soluções foram injetadas no equipamento de CLAE para a posterior análise.

#### 5.7.3.2 Linearidade

Para esta análise foram preparadas soluções contendo Immucillin-DI4G em seis concentrações diferentes (15,625; 31,25; 62,50; 100; 125 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ). Após o preparo, foram injetadas no equipamento de CLAE para a posterior análise. Através dos resultados obteve-se a curva de calibração da qual foi extraído o coeficiente de correlação linear ( $r$ )<sup>72</sup>.

#### 5.7.3.3 Precisão

Soluções de Immucillin-DI4G em três concentrações (31,25; 100; 250  $\mu\text{g/mL}$ ) foram preparadas e injetadas repetidamente no equipamento de CLAE. A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo (coeficiente de variação)<sup>72</sup>.

#### 5.7.3.4 Exatidão

Soluções de Immucillin-DI4G em três concentrações (31,25; 100; 250 µg/mL) foram preparadas e injetadas no CLAE em triplicata para a avaliar os resultados de recuperação obtidos.

#### 5.7.3.5 Robustez

Duas soluções de 100 µg/mL de Immucillin-DI4G foram preparadas em tubos de 15 mL do tipo falcon. Cada tubo foi posteriormente armazenado em duas temperaturas (4 °C e 25 °C) para a avaliar a estabilidade do composto. As injeções no equipamento de CLAE foram realizadas nos tempos 0, 3, 17 e 30 dias. Além deste parâmetro foram modificados o fluxo cromatográfico (de 1,5 mL/min para 1,4 e para 1,6 mL/min) e o comprimento de onda utilizado para detecção foi também modificado de 254 nm para 249 e, posteriormente para 259 nm). Neste procedimento foram avaliados o tempo de retenção do composto e teor<sup>72</sup>.

## 5.8 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS FORMULAÇÕES

### 5.8.1 Avaliação das características organolépticas

As formulações foram observadas quanto à cor e aspecto.

### 5.8.2 Determinação do pH

Pesou-se 0,5 g de cada formulação e feita uma diluição em 50 mL de água ultrapura proveniente do sistema Mili-Q®. O pH foi determinado com o auxílio de um Phmetro previamente calibrado.

### 5.8.3 Determinação do teor do composto nas formulações utilizando CLAE

A solução desenvolvida para a determinação do pH foi filtrada (filtro 22 µm) e uma alíquota de 10 µl foi injetada no equipamento de CLAE para a determinação do teor de cada formulação.

## 5.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

O estudo de estabilidade preliminar serve para auxiliar na escolha da formulação. As diferentes formulações desenvolvidas são armazenadas em condições específicas por um tempo reduzido<sup>73; 74</sup>.

As quatro formulações desenvolvidas foram armazenadas em três condições: Geladeira ( $4 \pm 2$  °C), Temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) e Estufa ( $45 \pm 2$  °C) durante um período de 30 dias. As características organolépticas e o teor do fármaco foram os parâmetros utilizados para a avaliação da estabilidade preliminar. As análises foram realizadas em triplicata nos tempos 0, 15 e 30 dias. As formulações foram acondicionadas em bisnagas de alumínio.

## 5.10 ESTABILIDADE ACELERADA OU NORMAL

A estabilidade acelerada tem como objetivo prever o tempo de vida útil, podendo ser empregado para estimar o prazo de validade do produto. Além disso, avalia a compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. Apenas a Formulação 1 foi avaliada quanto a estabilidade acelerada<sup>73; 74</sup>.

Neste estudo as formulações foram armazenadas em bisnagas de alumínio de 150 g e estocadas em geladeira ( $4 \pm 2$  °C), temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) e estufa ( $45 \pm 2$  °C) por um período de 90 dias. Os parâmetros para a avaliação da estabilidade acelerada foram as características organolépticas, determinação do pH, teor do fármaco e comportamento reológico das formulações.

## 5.11 COMPORTAMENTO REOLÓGICO

### 5.11.1 Viscosidade aparente

A viscosidade foi avaliada com o auxílio do viscosímetro rotacional Brookfield (modelo DV-I +), *Spindle* SC-25 a uma temperatura de 25 °C e velocidades (0,5 a 20 rpms). A leitura da viscosidade aparente e torque foram realizados após um minuto do ajuste de cada velocidade. As análises foram realizadas nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 dias.

### 5.11.2 Fluidez e Tixotropia

É obtido através do reograma da formulação, obtida graficamente através da tensão de cisalhamento versus a taxa de cisalhamento.

### 5.12 ESPALHABILIDADE

A espalhabilidade das formulações foi obtida através da metodologia adaptada por Knorst. Uma placa molde com orifício central é sobreposta com uma placa suporte de vidro milimetrada. Com o auxílio de uma espátula a amostra é colocada e nivelada no orifício da placa molde a qual é retirada cuidadosamente. Uma placa de vidro de peso conhecido é então colocada sobre a amostra e após um minuto faz-se a leitura dos diâmetros atingidos pela amostra, obtendo então o diâmetro médio. O procedimento é repetido sucessivamente com outras placas com pesos pré-determinados<sup>62; 63; 75</sup>.

A espalhabilidade é obtida através da equação:

$$Ei = \frac{d^2 \times \pi}{4}$$

Ei = espalhabilidade da amostra para um determinado peso (mm<sup>2</sup>)

d = diâmetro médio (mm)

### 5.13 AVALIAÇÃO CITOXICIDADE DA FORMULAÇÃO.

A citotoxicidade das formulações foi realizada através do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) utilizando células Vero. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µl de meio DMEN contendo (10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina, estreptomina e fungizona. Posteriormente, as células foram semeadas e incubadas por 48 horas para a sua adesão. Após este tempo, foram realizadas lavagens para a retirada do meio. As formulações foram previamente diluídas para o volume final de 100 µl para cada poço na concentração de 1% e incubadas por 72 horas a 37 °C. Ao final da incubação, foram adicionados 100 µl de solução de MTT a 10% e incubadas por 4 horas a 37 °C. O sobrenadante foi então descartado e 100 µl de DMSO foi adicionado, para a posterior leitura a 595 nm em leitor de placa<sup>30; 76</sup>.

## *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

---

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^1\text{H}$

A figura 6 representa o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do Immucillin-DI4G obtido em 60 MHz e utilizando DMSO- $d_6$  como solvente. A partir do sinal do TMS (tetrametil silano) foi observado um tripleto de integral quatro com deslocamento químico de 2,54 ppm. O sinal foi atribuído aos dois  $\text{CH}_2$  simétricos vizinhos ao nitrogênio. Um segundo tripleto de integral quatro foi obtido com deslocamento de 3,49 ppm. Este tripleto foi atribuído aos dois  $\text{CH}_2$  (simétricos) vizinhos aos oxigênios. Em 3,76 ppm foi observado um singleto de integral dois que corresponde ao  $\text{CH}_2$  ligado ao sistema heterocíclico. Os dois singletos em campo baixo foram atribuídos como os sinais correspondentes aos hidrogênios vinílicos do sistema pirrolo[3,2-*d*]pirimidin-4-ona. Enquanto o sinal com deslocamento químico em 7,34 ppm foi atribuído ao hidrogênio vinílico do anel de cinco membros, o hidrogênio com sinal em 7,83 foi atribuído à pirimidinona. O espectro demonstrou ainda a presença de sinais alargados próximos a 12 ppm contendo integração arbitrária do sinal (0,6).

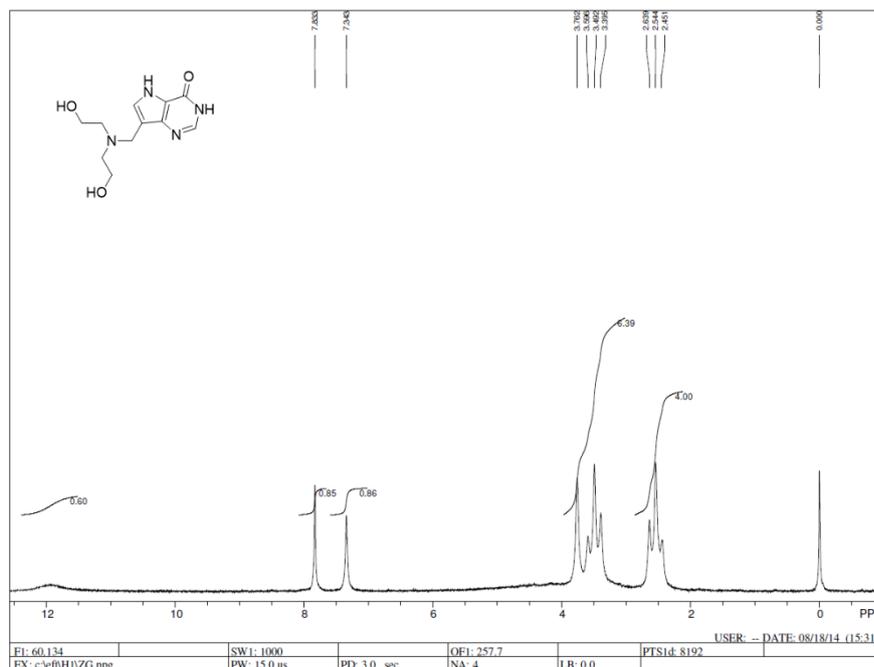


Figura 6: RMN de  $^1\text{H}$  do Immucillin-DI4G.

## 6.2 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^{13}\text{C}$

A figura 7 representa o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do Immucillin-DI4G obtido em 75 MHz e utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente. Os deslocamentos químicos observados são condizentes com a estrutura proposta abaixo e sua forma tautomérica. No espectro é possível observar os sinais referentes a um composto somente (um conjunto de sinais). As atribuições dos sinais foram realizadas utilizando numeração desconexa da nomenclatura do composto.

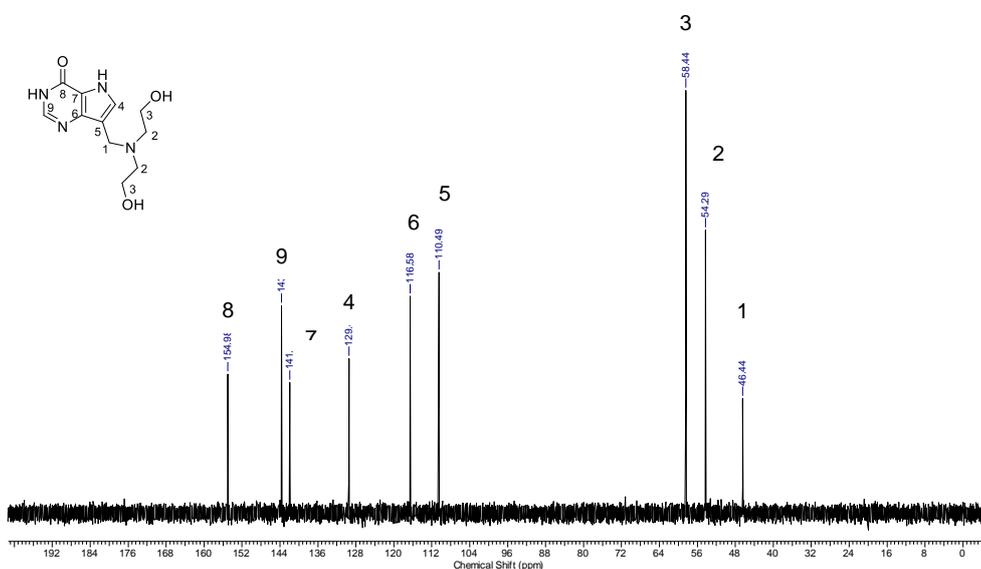


Figura 7: RMN de  $^{13}\text{C}$  do Immucillin-DI4G.

## 6.3 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A figura 8 representa o espectro na região do infravermelho do Immucillin-DI4G. As principais bandas de absorção no espectro referem-se à  $\text{C}=\text{O}$  de amida ( $1662\text{ cm}^{-1}$ ), ligação  $\text{O}-\text{H}$  ( $1011\text{ cm}^{-1}$ ) e ligações  $\text{C}=\text{C}$  ( $901\text{ cm}^{-1}$ ).

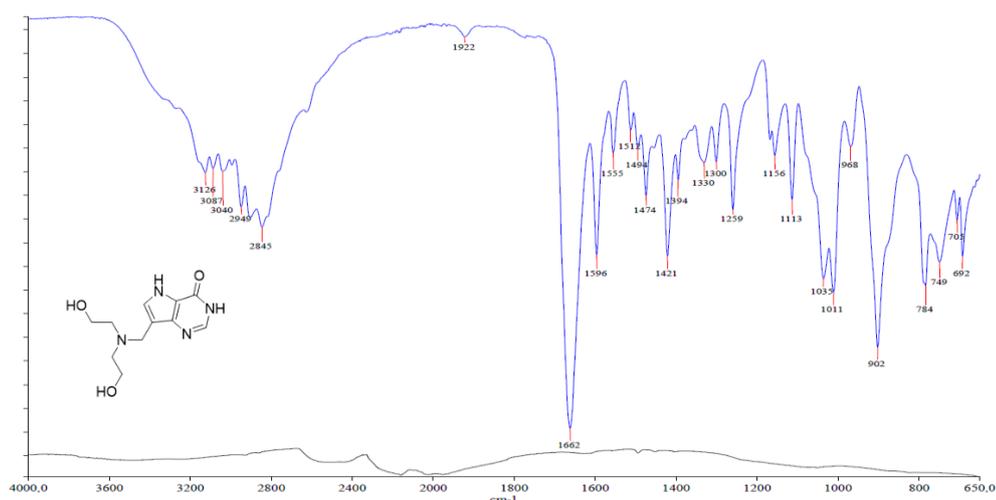


Figura 8: Espectro do infravermelho do Immucillin-DI4G.

#### 6.4 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise do composto em solução utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução (Orbitrap – Thermo Fischer) forneceu o íon de razão massa/carga ( $m/z$ ) 253,1298. Esse valor corresponde ao íon molecular mais um átomo de hidrogênio ( $M+H$ )<sup>+</sup> com  $m/z$  calculada de 253,1295. O valor calculado para a fórmula molecular  $C_{11}H_{16}N_4O_3+H$  foi obtido pelo software Qual Browser versão 2.0.7. Importante mencionar que a diferença observada foi de 1,18 ppm entre o valor experimental e o valor calculado corroborando a composição atômica proposta para a estrutura. Além disso, as fragmentações induzidas por colisões geraram a partir do íon ( $M+H$ )<sup>+</sup> os íons de  $m/z$  106,0863 e 88,0758 que correspondem a amina presente na estrutura e, posteriormente, a perda de uma molécula de  $H_2O$ , respectivamente (Figura 9). Os dados descritos corroboraram a estrutura proposta e a ausência de contaminantes em concentrações apreciáveis uma vez que não foram observados íons com intensidades significativas no intervalo de  $m/z$  50-500.

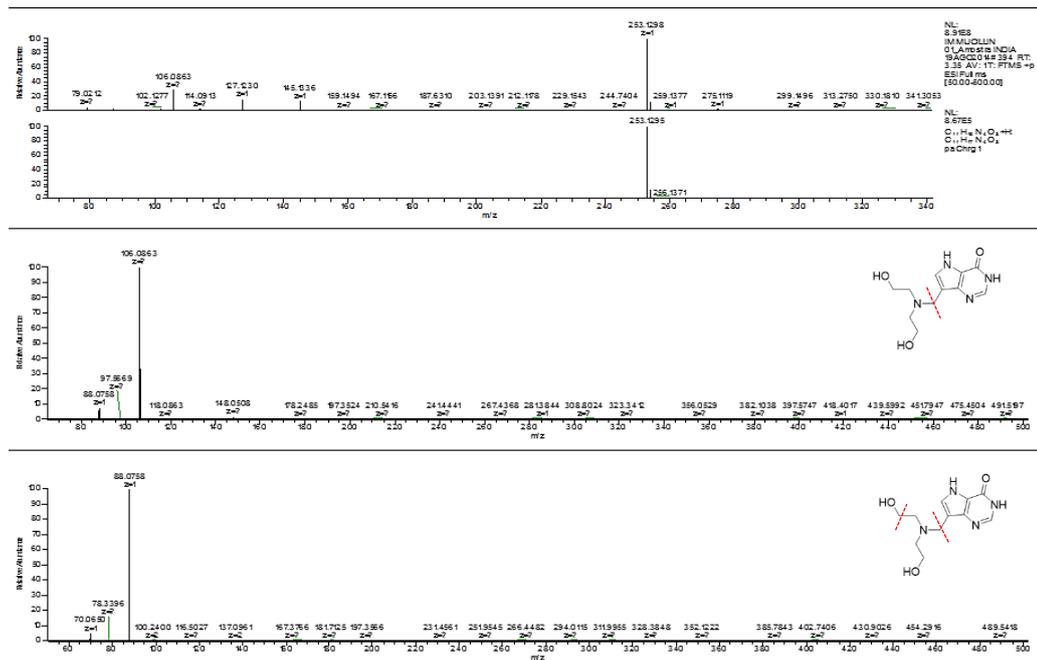


Figura 9: Espectro de massas do Immucillin-DI4G obtido utilizando técnica de ESI (*Electrospray Ionization*).

## 6.5 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO COMPOSTO

A solubilidade do Immucillin-DI4G foi avaliada em água purificada por osmose reversa contendo pH 6,67, em tampão fosfato pH 6,8 e tampão acetato pH 4,1 e pH 2,14, conforme preconizado pela farmacopeia americana (USP)<sup>77</sup>. A tabela 1 apresenta os valores da solubilidade do composto nas diferentes condições. Como esperado, o Immucillin-DI4G, considerado quimicamente como uma base fraca, apresentou-se mais solúvel em pH mais ácido (tampão acetato pH 2,14). De acordo com a classificação farmacopeica, o composto foi considerado pouco solúvel nas condições avaliadas<sup>77</sup>.

Tabela 1: Solubilidade do Immucillin-DI4G em diferentes tampões e pHs

Água pH 6,67			Fosfato pH 6,8			Acetato pH 4,1			Acetato pH 2,14		
Peso (g)	Área	Conc. (µg/ml)	Peso (g)	Área	Conc. (µg/ml)	Peso (g)	Área	Conc. (µg/ml)	Peso (g)	Área	Conc. (µg/ml)
0,058	58,60	40,6	0,101	83,4348	58,38	0,069	73,5993	51,34	0,093	82,0493	57,39
0,058	62,95	43,72	0,103	62,4391	43,35	0,068	73,1749	51,04	0,092	87,9239	61,59
DP	<b>2,21</b>		DP	<b>10,63</b>		DP	<b>0,21</b>		DP	<b>2,97</b>	
Média	<b>42,16</b>		Média	<b>50,87</b>		Média	<b>51,19</b>		Média	<b>59,49</b>	

## 6.6 CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO

A possível toxicidade aparente do Immucillin-DI4G foi avaliada utilizando o ensaio de viabilidade em células Vero (células de rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*)). O composto foi testado nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL e a viabilidade celular foi determinada após 72 h de incubação. Os resultados foram determinados após dois testes independentes. Nenhuma das concentrações avaliadas foram capazes de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC<sub>50</sub>) (Tabela 2). Por conseguinte, o composto não apresentou toxicidade aparente para células de mamíferos. Esse resultado demonstra a possibilidade de que o composto possa ser utilizado em preparações farmacêuticas de uso tópico contendo baixa toxicidade<sup>30; 77</sup>.

Tabela 2: Viabilidade das células da linhagem Vero após 72 h de incubação com Immucillin-DI4G.

Concentração (µg/mL)	Viabilidade média ± SEM (%) <sup>a</sup>
5	92,8 ± 1,6
10	72,4 ± 3,1
20	77,6 ± 2,8

<sup>a</sup> Média ± SEM = média ± erro padrão da média.

## 6.7 ESTABILIDADE DO COMPOSTO

A tabela 3 apresenta os resultados referentes ao teor do Immucillin-DI4G avaliado no intervalo de tempo de 0 a 90 dias nas diferentes temperaturas com seus respectivos desvios padrão. Os dados demonstraram que nas temperaturas de armazenamento de 25 °C e 45 °C houve uma redução maior do teor de Immucillin-DI4G presente nas amostras quando comparadas com a temperatura de 4 °C. Além disso, em todas as temperaturas testadas houve uma redução significativa do teor de composto no período de 90 dias. Tal dado evidencia uma possível falta de estabilidade da molécula e a necessidade de uma formulação que possa reduzir a possível degradação observada.

Tabela 3: Estabilidade do Immucillin-DI4G (pó amorfo) armazenado a 4 °C, 25 °C e 45 °C.

Immucillin-DI4G (4 °C)		Immucillin-DI4G (25 °C)		Immucillin-DI4G (45 °C)	
Tempo (Dias)	Teor ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tempo (Dias)	Teor ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tempo (Dias)	Teor ( $\mu\text{g/mL}$ )
T 0	95,70 $\pm$ 1,26	T 0	95,70 $\pm$ 1,26	T 0	95,70 $\pm$ 1,26
T 15	102,15 $\pm$ 6,56	T 15	82,52 $\pm$ 1,79	T 15	104,80 $\pm$ 8,69
T 30	94,23 $\pm$ 0,28	T 30	101,74 $\pm$ 1,79	T 30	93,41 $\pm$ 1,88
T 60	92,46 $\pm$ 0,70	T 60	92,13 $\pm$ 0,91	T 60	89,89 $\pm$ 1,20
T 90	80,40 $\pm$ 0,54	T 90	21,37 $\pm$ 0,35	T 90	21,37 $\pm$ 1,81

Quando comparados os cromatogramas do composto armazenado nas diferentes temperaturas nos tempos iniciais e finais foi possível observar a diminuição do teor através da redução da intensidade do pico cromatográfico. Os dados obtidos apontam que o composto deve ser preferencialmente armazenado a 4 °C para evitar possível degradação e formação de subprodutos.

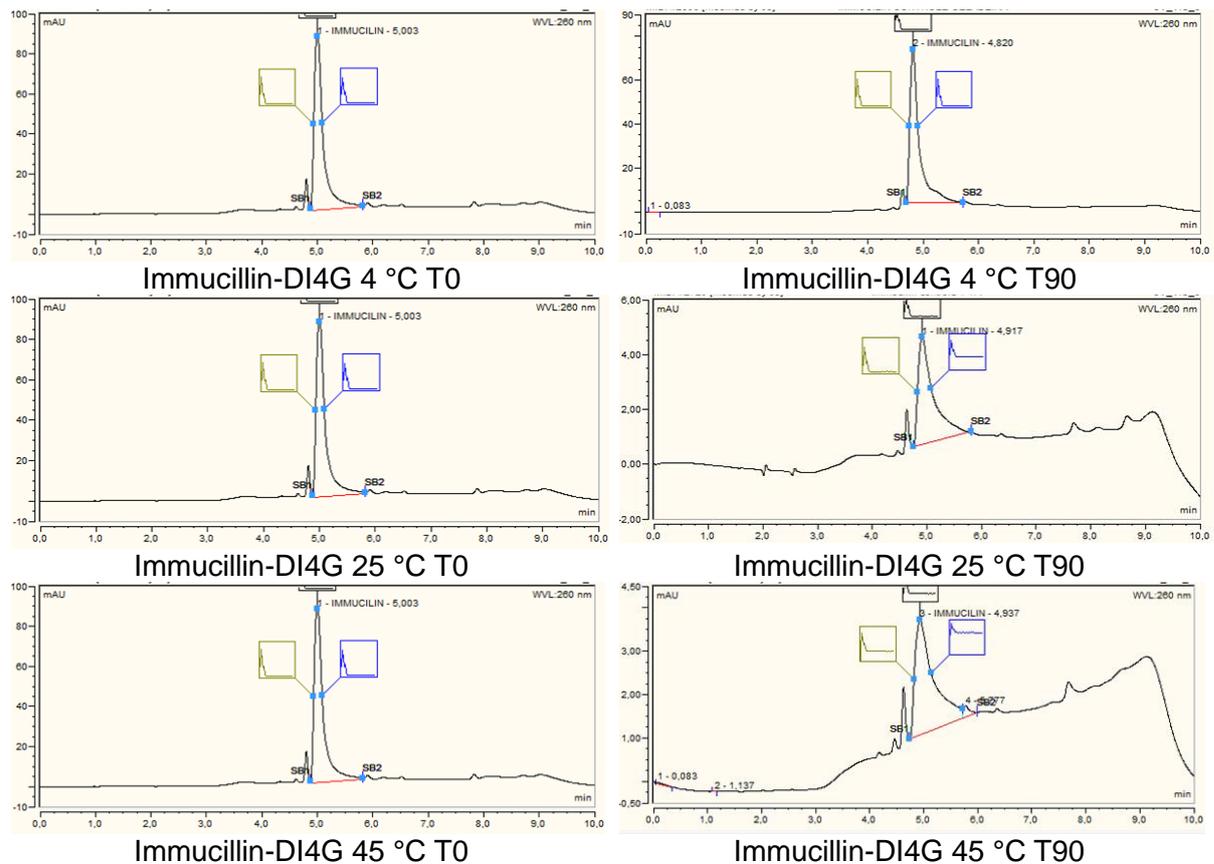


Figura 10: Comparação dos cromatogramas do Immucillin-DI4G armazenados a 4 °C, 25 °C e 45 °C nos tempos iniciais e finais.

Ainda, através dos cromatogramas obtidos nas diferentes temperaturas pode ser observada uma mudança no tempo de retenção do analito (Figura 10). Com o intuito de avaliar se ainda estávamos quantificando a molécula de interesse ou o seu subproduto, a fase móvel contendo o sinal de interesse foi coletada e analisada utilizando a espectrometria de massas. Em todos os tempos de retenção avaliados o espectrômetro de massas de alta resolução forneceu um íon molecular com  $m/z$  condizente com a estrutura química do Immucillin-DI4G (dado não apresentado). Assim, a variação no tempo de retenção do composto pode ter sido devida a diferentes condições do equipamento (CLAE) no momento das análises.

## 6.8 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO IMMUCILLIN-DI4G EM FORMULAÇÕES TÓPICAS ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para avaliação do teor de princípio ativo nas formulações propostas, foi necessário o desenvolvimento e validação de um método capaz de quantificar o Immucillin-DI4G. Os parâmetros de validação avaliados foram especificidade e seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez do método.

### 6.8.1 Especificidade e seletividade

A figura 11 representa o cromatograma do hidrogel controle contendo apenas os excipientes da formulação, sendo representado pelo pico no tempo de retenção ( $T_R$ ) 8,64.

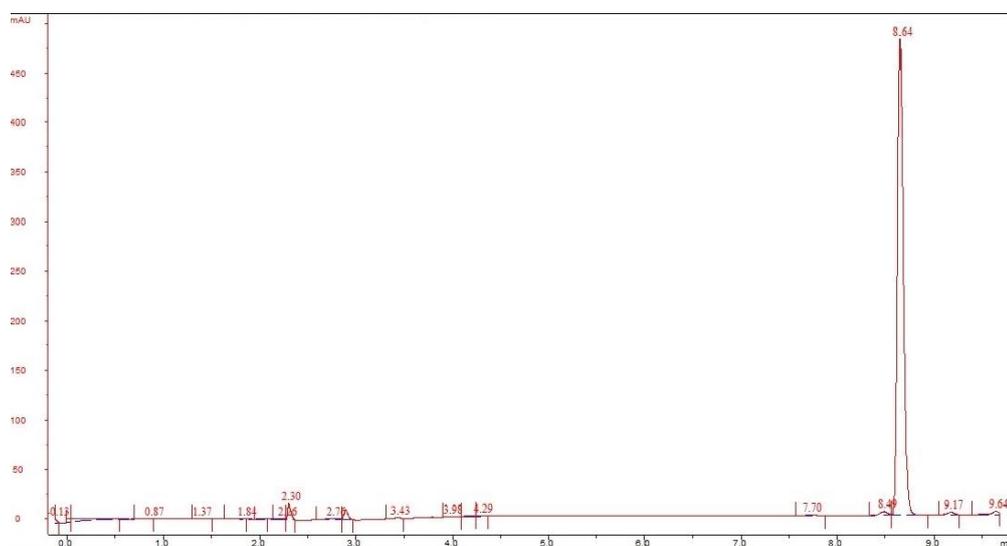


Figura 11: Cromatograma do hidrogel contendo apenas os excipientes da formulação sendo representado pelo pico cromatográfico no tempo de retenção ( $T_R$ ) 8,64 min.

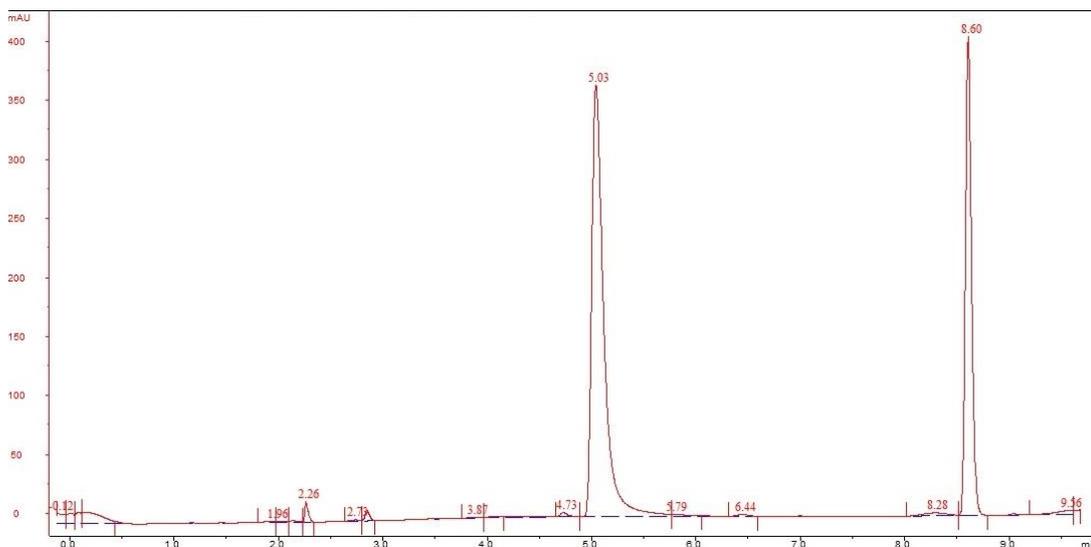


Figura 12: O cromatograma do hidrogel contendo os excipientes (TR = 8,60 min) e Immucilin-DI4G (TR = 5,03 min).

O primeiro cromatograma (Figura 11) resultou em um pico no tempo de retenção 8,64 min referente aos excipientes presentes na formulação. O segundo cromatograma (Figura 12) demonstra dois picos cromatográficos, sendo o de tempo de retenção 5,03 min referente à molécula de interesse e o de tempo de retenção 8,60 min referente aos excipientes. Portanto, as condições experimentais utilizadas no método cromatográfico demonstraram especificidade e seletividade pelo analito em estudo.

#### 6.8.2 Linearidade

Na tabela 4, são apresentadas as concentrações utilizadas (em  $\mu\text{g/mL}$  de Immucilina-DI4G) e as áreas obtidas após integração dos sinais das respectivas concentrações analisadas. A área dos sinais *versus* a concentração do analito foram utilizadas para a confecção da curva de calibração do doseamento e obtenção dos parâmetros de regressão linear.

Tabela 4: Dados analíticos para curva de calibração do doseamento

Concentração (%)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área
15,625%	15,625	8,4216
31,25%	31,25	16,0544
62,5%	62,5	30,2284
100%	100	46,0795

125%	125	56,8343
250%	250	108,8066

A figura 13 representa a curva de calibração do método de doseamento, que foi representada pela equação  $y = 0,4262x + 2,8906$

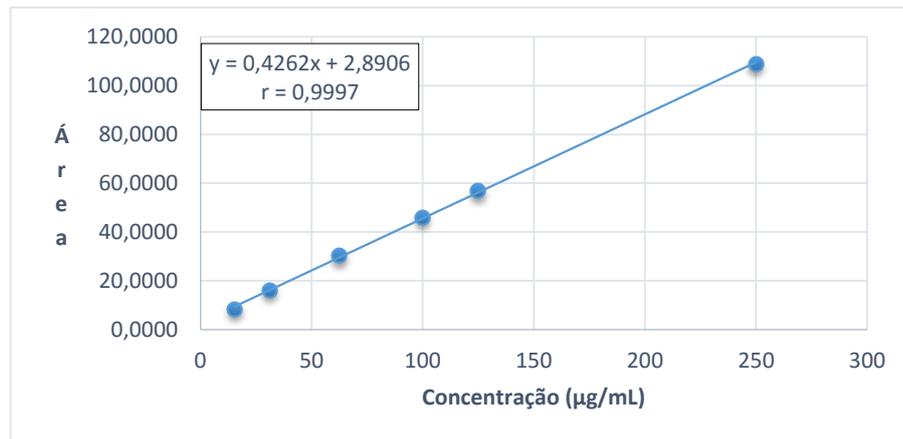


Figura 13: Representação gráfica da regressão linear do método de doseamento para Immucilin-DI4G.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência empregada para determinação da linearidade do método de quantificação de para Immucilina-DI4G foi satisfatória, uma vez que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,9997 para o intervalo da curva de calibração. Importante destacar que o critério mínimo de aceitação estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para métodos analíticos é de 0,9900.

#### 6.8.2 Precisão

A precisão avalia a proximidade de várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. Usualmente é expressa como o desvio-padrão ou desvio-padrão relativo (coeficiente de variação – CV%)<sup>71</sup>. O desvio padrão relativo (DPR) pode ser obtido através da seguinte fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

DPR – Desvio padrão relativo

CMD – Concentração média determinada

As tabelas 5, 6, 7 apresentam os resultados das análises de repetibilidade realizada pelo Analista 2 em 3 pontos da curva de calibração denominados de ponto baixo (31,25 µg/mL), ponto médio (100 µg/mL) e ponto alto (250 µg/mL).

Tabela 5: Doseamento realizado pelo Analista 2 das 5 (cinco) preparações de Immucillin-DI4G na concentração de 31,25 µg/mL. DP = Desvio Padrão, DPR = Desvio Padrão Relativo, E = Exatidão.

<b>Preparações</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Resultado (%)</b>
1	31,01	99,23
2	29,58	94,65
3	29,01	92,83
4	28,79	92,13
5	30,22	96,70
<b>Média</b>	29,72	95,10
<b>DP (µg/mL)</b>	0,91	
<b>DPR (%)</b>	3,06	
<b>E (%)</b>	95,11	

Tabela 6: Dados analíticos da repetibilidade das análises conduzidas com o Analista 2 na concentração de 100 µg/mL.

<b>Preparações</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Resultado (%)</b>
1	97,66	97,66
2	94,64	94,64
3	94,14	94,14
4	100,37	100,37
5	95,75	95,75
<b>Média</b>	96,51	96,51
<b>DP (µg/mL)</b>	2,55	
<b>DPR (%)</b>	2,64	
<b>E (%)</b>	96,51	

Tabela 7: Dados analíticos da repetibilidade das análises conduzidas com o Analista 2 na concentração de 250 µg/mL.

<b>Preparações</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Resultado (%)</b>
1	244,91	97,96

Preparações	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Resultado (%)
2	245,90	98,36
3	244,23	97,69
4	247,01	98,80
5	242,18	96,87
<b>Média</b>	244,84	97,93
<b>DP (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	1,82	
<b>DPR (%)</b>	0,74	
<b>E (%)</b>	97,94	

O método proposto para análise do produto na matriz apresenta repetibilidade, visto que o desvio padrão relativo (DPR) das concentrações variou de 0,74 a 3,06% e a exatidão (E%) variou de 95,11 a 97,94%, quando o critério de aceitação, de acordo com a RE nº 899 da ANVISA, é de  $\leq 5,0\%$  para DPR e entre 95-105% para exatidão.

### 6.8.3 Exatidão

A exatidão avalia o grau de concordância entre os resultados encontrados ou valor estimado do analito de interesse na amostra e o valor real da quantidade do analito na amostra<sup>71</sup>. O ensaio de recuperação é um método utilizado para esta análise, pois compara a quantidade do analito recuperada no processo com a quantidade real presente na amostra.

A tabela 8 mostra os valores de recuperação obtidos a partir da relação entre a concentração declarada e a concentração real obtida para doseamento de Immucillin-DI4G.

Tabela 8: Percentual de recuperação obtida nas diferentes concentrações

Concentração (%)	Concentração Teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)
<b>31,25</b>	31,25	31,01	99,23
<b>31,25</b>	31,25	29,58	94,65
<b>31,25</b>	31,25	29,01	92,83
<b>100</b>	100	96,77	97,66
<b>100</b>	100	94,64	94,64
<b>100</b>	100	94,14	94,14
<b>250</b>	250	244,91	97,96
<b>250</b>	250	245,90	98,36
<b>250</b>	250	244,43	97,69

**Média da recuperação = 96,3%**

**Média do DPR = 2,27%**

A porcentagem média de recuperação de cada nível deverá estar dentro da faixa de  $\pm 5\%$  da média da recuperação e com um intervalo individual de 95,0% a 105,0%. De acordo com estes critérios, o método desenvolvido apresentou exatidão, visto que a média de recuperação foi de 96,3% com valor de DPR obtido de 2,27%<sup>84</sup>.

#### 6.8.4 Robustez

A robustez avalia a sensibilidade do método analítico quanto a variações nos parâmetros de análise. O método é considerado robusto quando o mesmo não sofre alterações devido a estas modificações<sup>71</sup>.

Foram aplicadas ao método de doseamento variáveis de preparo do analito utilizando amostras com tempos de armazenamento variados, além de variáveis nas condições cromatográficas. Os resultados estão apresentados nas tabelas 9 a 14. As concentrações foram expressas em  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabela 9: Análise quanto à avaliação da estabilidade da amostra a temperatura ambiente:

<b>Amostras</b>	<b>Concentração</b>	<b>Resultado (%)</b>
Amostra inicial	101,7	101,7
Amostra 3 dias	99,03	99,03
Amostra 17 dias	89,09	89,09
Amostra 30 dias	89,15	89,15

Tabela 10: Análise quanto a avaliação da estabilidade da amostra a 4 °C:

<b>Amostras</b>	<b>Concentração</b>	<b>Resultado (%)</b>
Amostra inicial	101,7	101,7
Amostra 3 dias	99,82	99,82
Amostra 17 dias	101,10	101,10
Amostra 30 dias	97,37	97,37

Tabela 11: Análise com variação do fluxo de 1,5 para 1,4 mL/min.

<b>Amostras</b>	<b>Concentração</b>	<b>Resultado (%)</b>
Amostra normal	247,81	99,12

<b>Amostras</b>	<b>Concentração</b>	<b>Resultado (%)</b>
Amostra com variação (1,4 mL/min)	269,20	107,68

Tabela 12: Análise com variação do fluxo de 1,5 para 1,6 mL/min.

<b>Amostras</b>	<b>Concentração</b>	<b>Resultado (%)</b>
Amostra normal	247,81	99,12
Amostra com variação (1,6 mL/min)	235,80	94,32

Tabela 13: Análise com alteração no comprimento de onda de 254 nm para 249 nm:

<b>Amostras</b>	<b>Concentração</b>	<b>Resultado (%)</b>
Amostra normal	247,81	99,12
Amostra com a variação do comprimento de onda (249nm)	212,19	84,87

Tabela 14: Análise com alteração do no comprimento de onda de 254 nm para 259 nm:

<b>Amostras</b>	<b>Concentração</b>	<b>Resultado (%)</b>
Amostra normal	247,81	99,12
Amostra com a variação do comprimento de onda (259nm)	274,69	109,87

O composto quando em solução aquosa e armazenada em temperatura ambiente apresentou uma redução de 10% no teor, demonstrando uma possível perda da estabilidade da formulação. Por outro lado, quando as amostras foram armazenadas a uma temperatura de 4 °C não foi observado qualquer perda de teor. O método não demonstrou ser robusto com a variação do comprimento de onda utilizado para a detecção do composto conduzindo a resultados significativamente diferentes entre si. Porém demonstrou robustez não apresentando nenhuma alteração significativa (< 5%) quando a modificação no fluxo da fase móvel foi realizada de 1,5 para 1,6 mL/min. O mesmo resultado não foi obtido quando a modificação o fluxo foi reduzido de 1,5 para 1,4 mL/min. Essa modificação alterou significativamente a quantificação do analito.

## 6.9 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS ORGANOLÉPTICOS, FÍSICO-QUÍMICOS E ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO 1

A tabela 15 apresenta um resumo das análises de aspecto, cor, pH e teor em função do tempo e em diferentes temperaturas. A formulação controle (sem o composto) não apresentou nenhuma não conformidade quanto a aspecto e cor no decorrer dos 90 dias nas três temperaturas. Além disso, as alterações do pH no decorrer dos dias também não demonstraram ser significativas. A formulação contendo o composto, armazenada a 4 °C apresentou a estabilidade maior, sendo estável até 60 dias, já que em 90 dias há uma redução significativa no teor do Immucillin-DI4G.

Tabela 15: resumo das análises de aspecto, cor, pH e teor do teste de estabilidade da formulação controle e com Immucillin-DI4G.

GEL DE POLÍMERO CARBOXIVINÍLICO A 2% - CONTROLE															
Tempo (Dias)	Formulação armazenada a 4 °C					Formulação armazenada a 25 °C					Formulação armazenada a 45 °C				
	T 0	T 15	T 30	T 60	T 90	T 0	T 15	T 30	T 60	T 90	T 0	T 15	T 30	T 60	T 90
Aspecto	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Cor	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
pH	8.56	8.26	8.21	8.23	8.25	8.56	8.19	8.26	8.18	8.26	8.56	8.06	8.17	8.12	8.14
Teor (µg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMMUCILLIN – DI4G A 1,1% EM GEL DE POLÍMERO CARBOXIVINÍLICO A 2% - AMOSTRA															
Tempo (Dias)	Formulação armazenada a 4 °C					Formulação armazenada a 25 °C					Formulação armazenada a 45 °C				
	T 0	T 15	T 30	T 60	T 90	T 0	T 15	T 30	T 60	T 90	T 0	T 15	T 30	T 60	T 90
Aspecto	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	NC	C	NC	NC	NC	NC
Cor	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
pH	8.44	8.28	8.19	8.43	8.41	8.44	8.10	8.24	8.32	8.42	8.44	8.29	8.31	8.18	8.04
Teor (µg/ml)	111,12	110,78	97,21	94,79	62,94	111,12	82,27	114,36	75,66	75,64	111,12	73,62	52,79	22,88	17,96
Desvio Padrão	± 1,61	± 1,07	± 0,41	± 1,39	± 1,11	± 1,61	± 0,41	± 1,69	± 0,30	± 1,58	± 1,61	± 1,61	± 0,01	± 0,51	± 2,63

Legenda: C – Conforme; NC – Não Conforme; I – Incolor; A – Amarelado.

A formulação armazenada a 25 °C apresentou uma estabilidade menor. Em 60 dias passou a ter um aspecto não conforme (turbidez) e apresentar uma redução significativa do teor. A formulação armazenada a 45°C teve seu aspecto alterado (turbidez) e a redução do teor do composto a partir de 15 dias. Chegando a uma redução de 85% do teor em 90 dias. Além disso, foi possível observar através dos cromatogramas das formulações a formação de novos sinais nos que podem ser decorrentes da perda da estabilidade do composto e/ou da formulação com a formação de subprodutos. Entretanto, estudos referentes aos produtos de degradação devem ser realizados para angariar dados que sustentem tal hipótese.

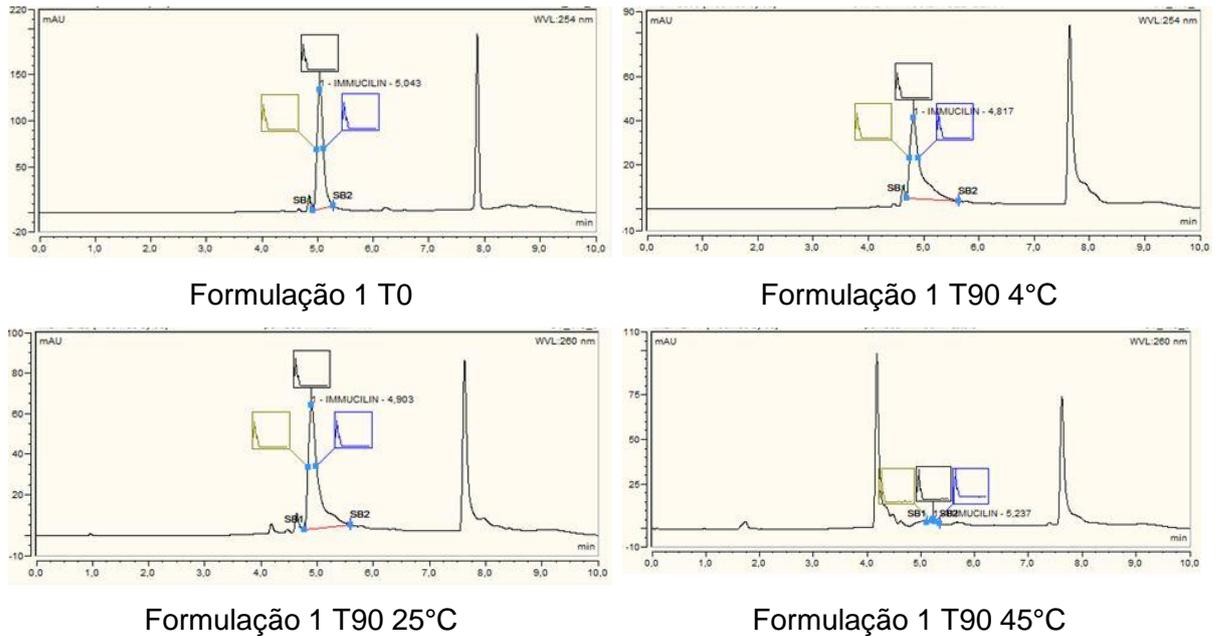


Figura 14: Comparativo dos cromatogramas da formulação-1 com Immucillin-DI4G no tempo inicial e final armazenadas à 4 °C, 25 °C e 45 °C.

## 6.10 COMPORTAMENTO REOLÓGICO DA FORMULAÇÃO 1

A Figura 15 apresenta o reograma da formulação controle (Gel de polímero carboxivinílico a 2%). Foi possível observar o comportamento não linear da viscosidade da formulação, a viscosidade diminui conforme o aumento da velocidade de cisalhamento ou taxa de cisalhamento. Dado este que serve para a classificação da formulação controle como um fluido não-newtoniano, pseudoplástico<sup>67-71</sup>. Através da curva em vermelho, pode ser notado que o fluido apresenta uma dificuldade inicial de deformação, ou seja, conforme ocorre o aumento da força (tensão) o material passa a fluir com maior facilidade, classificando assim o material como um pseudoplástico com valor de cedência.

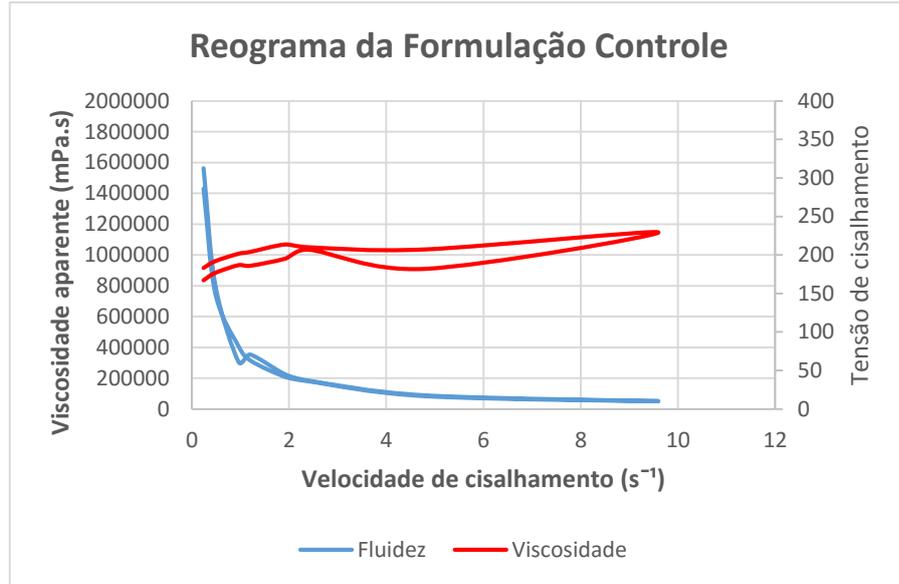


Figura 15: Reograma da Formulação 1 - Controle

A figura 16 apresenta o reograma da formulação contendo o composto de interesse ( Immucillin-DI4G a 1,1% em gel de polímero carboxivinílico a 2%). Esta se comportou de mesma forma que a formulação controle, sendo classificada então como um fluido não-newtoniano de comportamento pseudoplástico com valor de cedência, pelo fato de a formulação necessitar uma força prévia para que ela possa fluir com maior facilidade.

Esta característica do material pseudoplástico é muito desejada em formulações farmacêuticas por tornar mais fácil a aplicação do produto sobre a pele. Uma vez que a viscosidade do material diminui com o aumento da velocidade de cisalhamento, o material passa por um processo de deformação durante a aplicação do produto, ou seja, as partículas se organizam de maneira diferente, fazendo com que o material se torne mais fluido. Porém, após a aplicação do produto, a viscosidade retorna ao estado inicial fazendo com que o material não escorra.

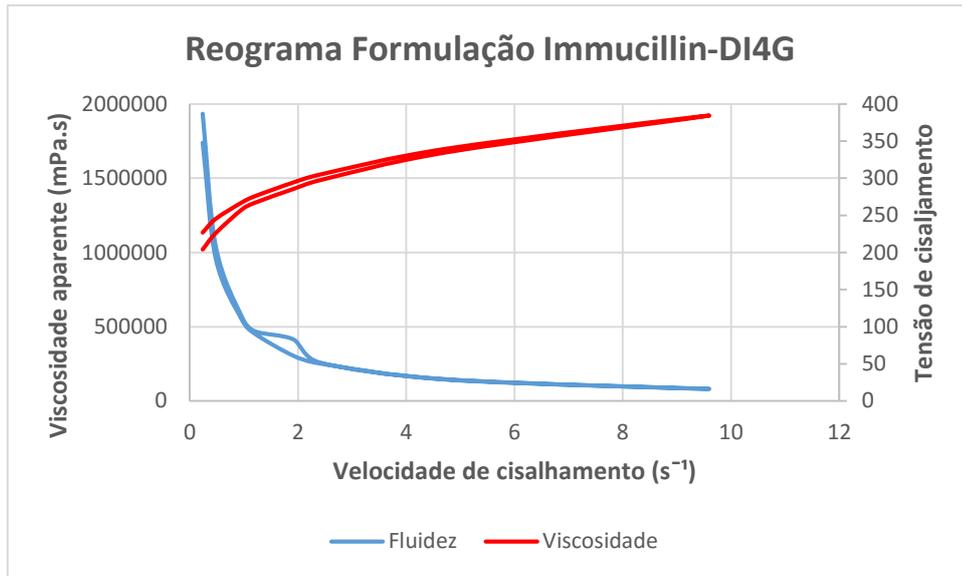


Figura 16: Reograma da Formulação 1 - Immucillin-DI4G

Alterações na viscosidade da formulação podem estar relacionados com a perda da estabilidade da formulação, portanto o comportamento reológico da Formulação 1 (controle e contendo Immucillin-DI4G) também foi avaliado durante 90 dias (tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias respectivamente). Os valores das viscosidades das formulações armazenadas em diferentes condições estão contidos no Apêndice A. A diferença da viscosidade entre os diferentes tempos e condições de armazenamento foram analisados estatisticamente empregando a análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . A representação gráfica das médias das viscosidades e os desvios da média das formulações controle e contendo Immucillin-DI4G estão apresentadas nas Figuras 17 a 22. Convém destacar que os desvios da média são elevados neste tipo de ensaio<sup>61; 69; 70; 71; 78</sup>.

A viscosidade da formulação controle foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos das três temperaturas, nos tempos 0, 30 e 90 dias. A partir da análise dos dados obtidos foi observada variações na viscosidade das formulações controle armazenadas nas três temperaturas testadas (4 °C, 25 °C e 45 °C), porém quando analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA e Tukey as variações apresentaram um valor de ( $p > 0,05$ ), sendo, portanto, não significativas.

A viscosidade da formulação contendo o fármaco de interesse foi realizada através da comparação dos resultados obtidos nas três temperaturas de

armazenamento e nos tempos 0, 30 e 90 dias. Na figura 18 pode ser observado que a viscosidade da formulação contendo Immucillin-DI4G armazenada à 4 °C aumentou (T90) quando comparada com o tempo 0. Por outro lado, a formulação contendo o composto armazenada à 25 °C, teve uma diminuição na viscosidade (Figura 20). Já a formulação armazenada à 45 °C (Figura 22) manteve a viscosidade no decorrer dos 90 dias. Quando as variações foram analisadas pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey, todas apresentaram um valor de ( $p > 0,05$ ), sendo consideradas então não significativas. Logo, todas as formulações, tanto controle ou contendo Immucillin-DI4G, se mantiveram estáveis quanto à viscosidade no decorrer do tempo analisado.

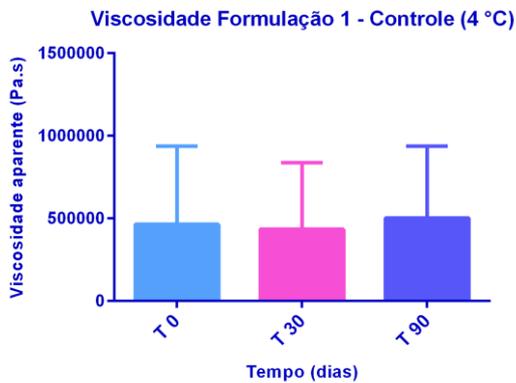


Figura 17: Viscosidade aparente da F1 (Controle) armazenada a 4 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 ( $s^{-1}$ ) nos tempos 0, 30 e 90 dias.

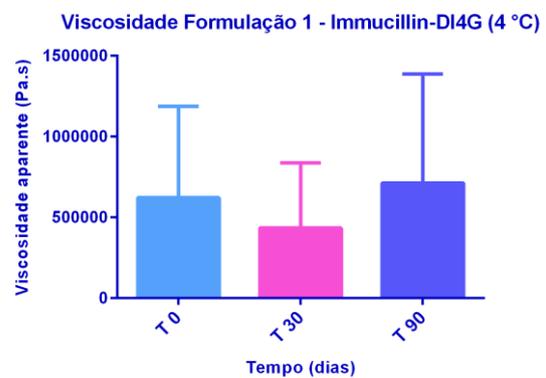


Figura 18: Viscosidade aparente da F1 (Immucillin-DI4G) armazenada a 4 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 ( $s^{-1}$ ) nos tempos 0, 30 e 90 dias.

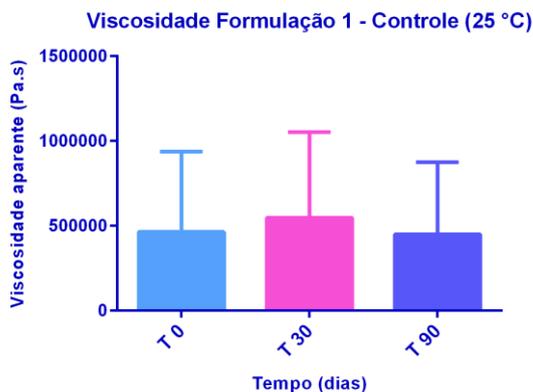


Figura 19: Viscosidade aparente da F1 (Controle) armazenada a 25 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 ( $s^{-1}$ ) nos tempos 0, 30 e 90 dias.

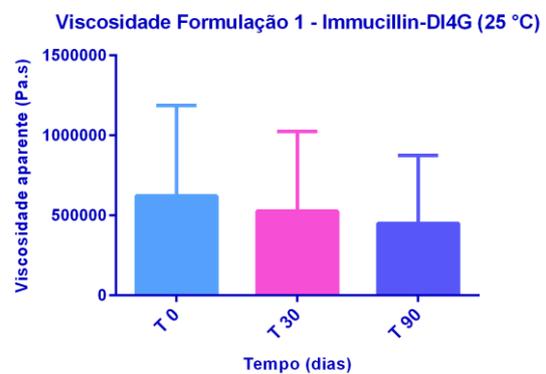


Figura 20: Viscosidade aparente da F1 (Immucillin-DI4G) armazenada a 25 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 ( $s^{-1}$ ) nos tempos 0, 30 e 90 dias.

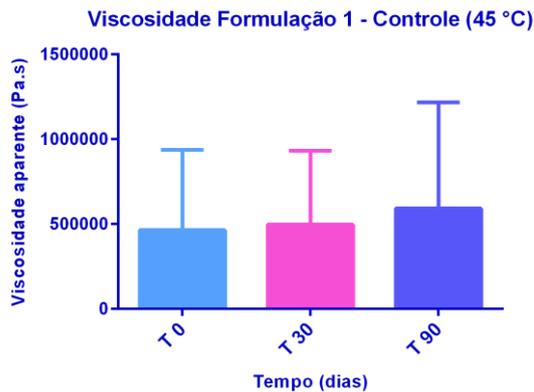


Figura 21: Viscosidade aparente da F1 (Controle) armazenada a 45 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 ( $s^{-1}$ ) nos tempos 0, 30 e 90 dias.

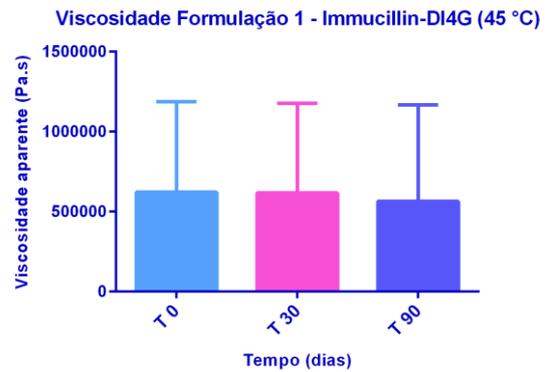


Figura 22: Viscosidade aparente da F1 (Immucillin-DI4G) armazenada a 45 °C, medida com velocidade de cisalhamento de 0,24 ( $s^{-1}$ ) nos tempos 0, 30 e 90 dias.

## 6.11 ESPALHABILIDADE DA FORMULAÇÃO 1

As espalhabilidade das formulações foram avaliadas em paralelo com a viscosidade. A determinação da espalhabilidade é um aspecto importante no desenvolvimento de formulações e pré-formulações, pois serve como um parâmetro de avaliação da estabilidade das mesmas, além de ser um parâmetro relacionado com a dificuldade ou facilidade na aplicação do produto.

As figuras 23, 25 e 27 apresentam o gráfico comparativo da espalhabilidade da formulação controle armazenada a 4 °C, 25 °C e 45 °C. Todas as formulações controle se mantiveram estáveis e sem alterações significativas quando comparados os tempos 0 e 30 dias, apresentando um valor de  $p > 0,05$  através do teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Porém, todas as formulações controle apresentaram uma diminuição da espalhabilidade quando comparado os tempos 0 e 90 dias (inicial e final). Esta diferença foi avaliada estatisticamente através do teste ANOVA seguido do teste de Tukey, e apresentou um valor de  $p < 0,05$ , variação considerada significativa. Os valores obtidos na medida da espalhabilidade de cada formulação estão contidos no Apêndice B.

As formulações contendo Immucillin-DI4G (Figura 24, 26 e 28) se comportaram de forma semelhante à formulação controle. Todas as formulações apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na espalhabilidade quando comparados os tempos

iniciais *versus* finais. Além disso, a formulação armazenada a 45 °C apresentou variações significativas entre os tempos 0 e 30 dias, com valor de  $p < 0,01$ . Esta variação pode ser um indicativo da perda da estabilidade da formulação, corroborando assim com as alterações visuais observadas no decorrer dos 90 dias da formulação armazenada à 45 °C.

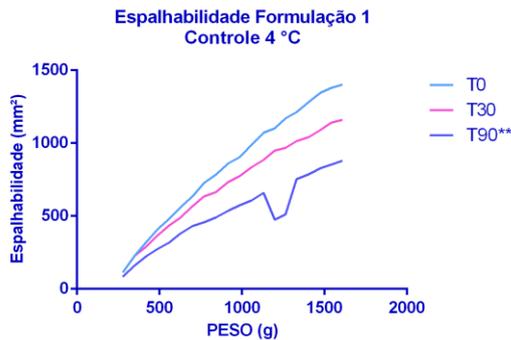


Figura 23: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1(Controle) armazenada à 4 °C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (\*\* $p < 0,01$ )

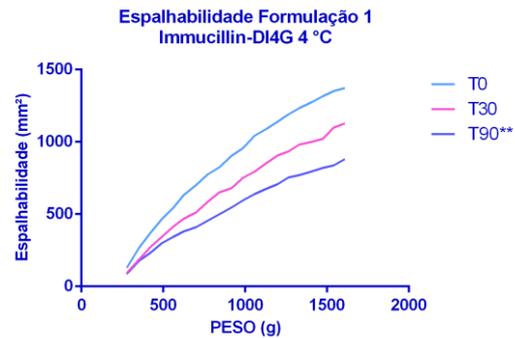


Figura 24: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1(Immucilin-DI4G) armazenada à 4 °C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (\*\* $p < 0,01$ )

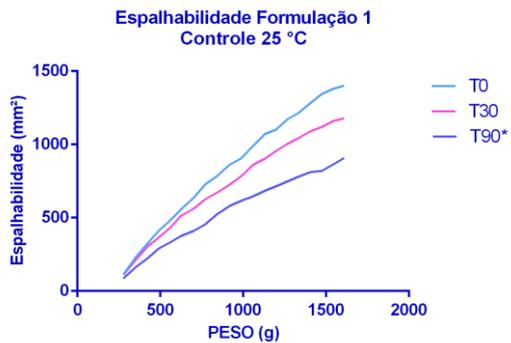


Figura 25: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1(Controle) armazenada à 25 °C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (\* $p < 0,05$ )

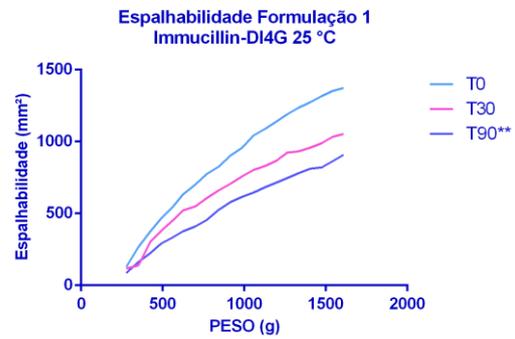


Figura 26: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1(Immucilin-DI4G) armazenada à 25 °C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (\*\* $p < 0,01$ )

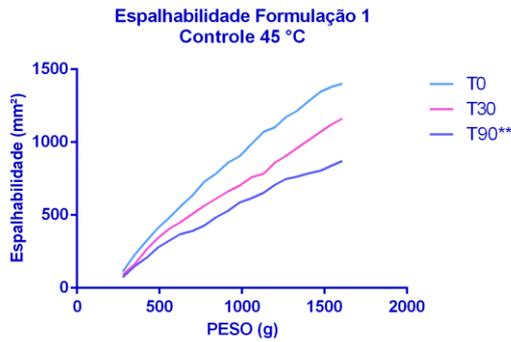


Figura 27: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1 (Controle) armazenada à 45 °C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (\*\*p < 0,01)

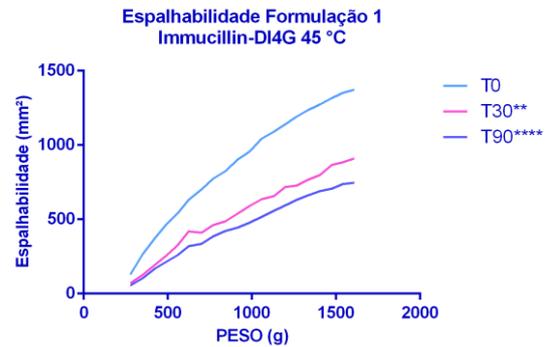


Figura 28: Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa da F1 (Immucillin-DI4G) armazenada à 45 °C nos tempos 0, 30 e 90 dias. (\*\*p < 0,01; \*\*\*\*p < 0,0001)

## 6.12 AVALIAÇÃO CITOTOXICIDADE *IN VITRO* EM CÉLULAS VERO DA FORMULAÇÃO.

A avaliação da citotoxicidade (Tabela 16) foi realizada em triplicada apenas para a formulação controle (A1%), formulações armazenadas à 4 °C (B1%) e 45 °C (C1%) e uma formulação de Immucillin-DI4G a 2,2% em Gel Polímero Carboxivinílico a 2% (D1%).

Tabela 16: Viabilidade das células da linhagem Vero após 72 h de incubação com as formulações.

Formulações	Viabilidade celular (Sobrevivência %)
	Média ± SEM <sup>a</sup>
A 1% - Formulação Controle	97,4 ± 7,4
B 1% - Formulação armazenada a 4 °C	101,5 ± 7,2
C 1% - Formulação armazenada a 45 °C	100,8 ± 11,2
D 1% - Immucillin-DI4G a 2,2% em Gel de Polímero Carboxivinílico a 2%	94,5 ± 8,2

<sup>a</sup> Média ± SEM = média ± erro padrão da média.

Os ensaios realizados a uma concentração máxima de 1% com todas as formulações citadas, demonstraram não afetar a viabilidade celular (Figura 29), sendo então consideradas formulações seguras para o uso tópico.

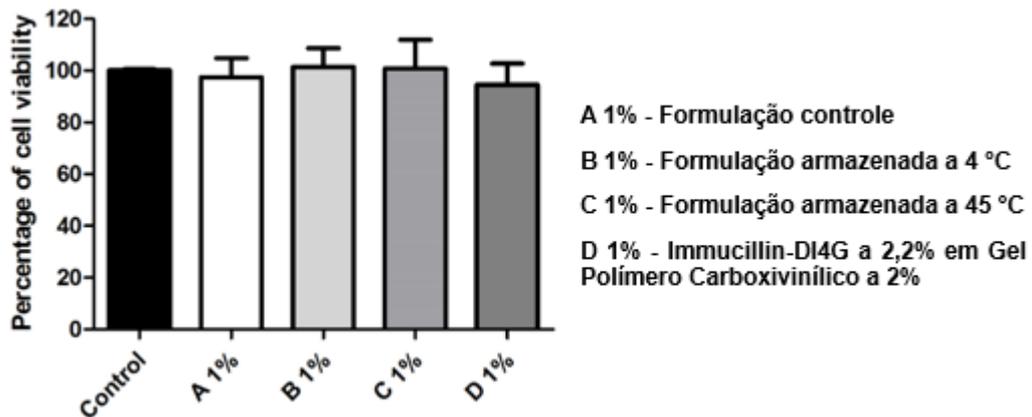


Figura 29: Avaliação citotóxica das formulações em MTT.

### 6.13 ESTABILIDADE PRELIMINAR DE OUTRAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

Com o intuito de melhorar a estabilidade do composto quando inserido na forma farmacêutica hidrogel, outras formulações foram desenvolvidas para a posterior avaliação. A formulação 1 foi manipulada e utilizada como comparativo para as outras formulações. É necessário ressaltar que não foi possível efetuar a correção dos teores no momento da manipulação de cada formulação, portanto os teores nos tempos iniciais de cada formulação foram considerados como 100% para a posterior comparação com os demais dias.

#### 6.13.1 Formulação 1 (Immucillin-DI4G a 1,1% em Gel polímero Carboxivinílico a 2%)

A tabela 17 apresenta os valores referentes ao teor avaliado na formulação 1 nos tempos 0, 15 e 30 dias, armazenadas em diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C e 45 °C).

Tabela 17: Teor de Immucillin-DI4G na Formulação 1 armazenada à 4 °C, 25 °C e 45 °C nos tempos inicial e final (30 dias).

T °C	FORMULAÇÃO 1					
	4 °C		25 °C		45 °C	
Tempo (dias)	T0	T30	T0	T30	T0	T30
Teor (µg/ml)	57,32	55,28	57,32	56,13	57,32	33,79
MÉDIA	58,58	56,44	58,58	56,66	58,58	33,92
DP	57,95	55,86	57,95	56,40	57,95	33,85
DP	0,89	0,82	0,89	0,38	0,89	0,09

Como esperado, a formulação 1 apresentou uma queda significativa de aproximadamente -40% no teor de Immucillin-DI4G quando armazenada em altas temperaturas (45 °C), confirmando assim a necessidade de aprimoramentos na formulação.

#### 6.13.2 Formulação 2 (Immucillin-DI4G a 1,1% em Gel polímero Carboxivinílico a 2% com aditivos)

A tabela 18 apresenta os valores referentes ao teor avaliado na formulação 2 nos tempos 0, 15 e 30 dias, armazenadas em diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C e 45 °C). Dois aditivos foram adicionados nesta formulação com o objetivo de aumentar a estabilidade do composto presente na formulação: metabissulfito de sódio (antioxidante) e EDTA (agente quelante).

Pode-se notar uma melhora na estabilidade do fármaco na formulação armazenada à 45 °C, com uma queda do teor de aproximadamente 5%. Perda menor do teor quando comparada com a formulação 1. Diferente da formulação 1, quando a formulação 2 foi armazenada a 4 °C e 25 °C apresentou uma diminuição maior do teor do que a observada a 45 °C.

Tabela 18: Teor de Immucillin-DI4G na Formulação 2 armazenada à 4 °C, 25 °C e 45 °C nos tempos inicial e final (30 dias).

T °C	FORMULAÇÃO 2					
	4 °C		25 °C		45 °C	
Tempo (dias)	T0	T30	T0	T30	T0	T30
Teor (µg/ml)	72,45	64,67	72,45	64,37	72,45	69,73
	73,32	65,42	73,32	65,06	73,32	68,26
MÉDIA	72,88	65,04	72,88	64,71	72,88	69,00
DP	0,62	0,53	0,62	0,49	0,62	1,04

Através dos cromatogramas da formulação 2 (Figura 30) é possível perceber uma mudança não significativa no tempo de retenção do composto após 30 dias. Foi notado também a presença do pico referente ao excipiente em 7-8 minutos. E na formulação armazenada a 45 °C há a presença de outros picos em 30 dias. Logo, mais estudos desta formulação são necessários para a análise de possíveis produtos de degradação obtidos.

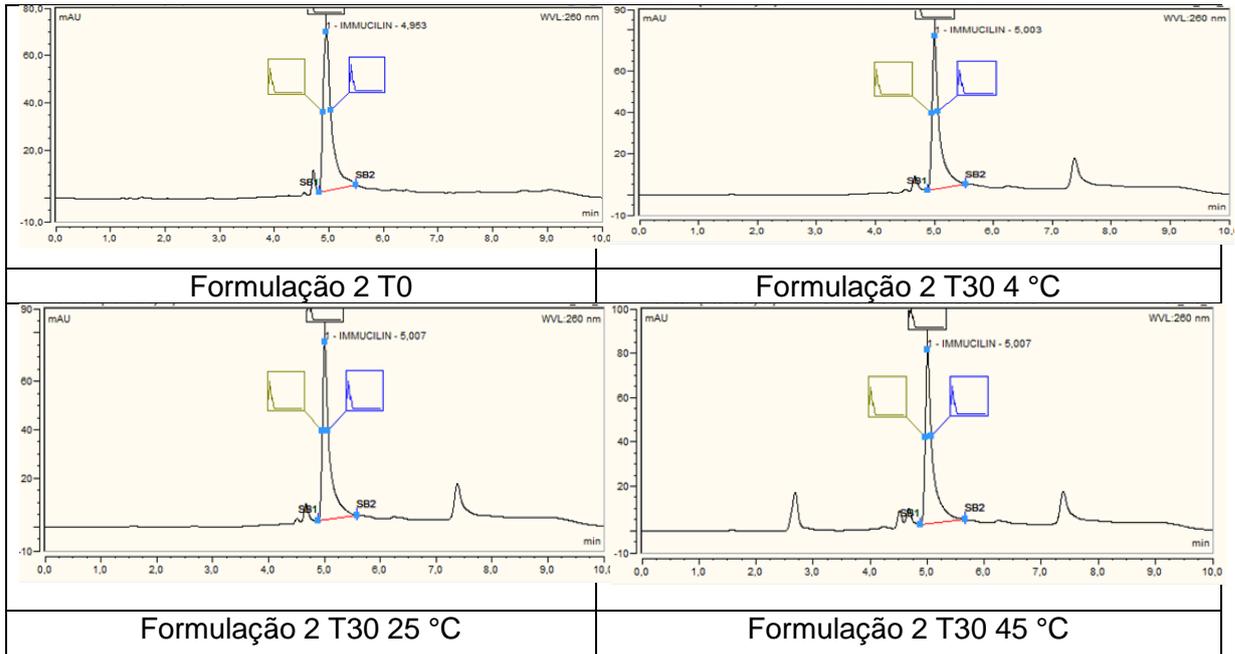


Figura 30: Comparativo dos cromatogramas da formulação-2 com Immucillin-DI4G no tempo inicial e final armazenadas a 4 °C, 25 °C e 45 °C

### 6.13.3 Formulação 3 (Immucillin-DI4G a 1,1% em Creme-Gel)

Esta formulação foi desenvolvida com o intuito de prevenir uma possível hidrólise do composto haja vista que a molécula possui sítios eletrofílicos passíveis de reações com moléculas de água. Convém destacar que não há relatos na literatura descrevendo reações de hidrólise para a molécula em estudo. Assim, a formulação foi planejada e executada com uma menor quantidade de água. Os teores obtidos nas amostras armazenadas nas diferentes temperaturas estão contidos na tabela 19. A formulação armazenada a 45 °C foi a que apresentou maior perda no teor de Immucillin-DI4G, de aproximadamente -15%. As formulações armazenadas a 4 °C e 25 °C se mantiveram estáveis da mesma forma que a formulação 1.

Tabela 19: Teor de Immucillin-DI4G na Formulação 3 armazenada à 4 °C, 25 °C e 45 °C nos tempos inicial e final (30 dias).

T °C	FORMULAÇÃO 3					
	4 °C		25 °C		45 °C	
Tempo (dias)	T0	T30	T0	T30	T0	T30
Teor (µg/ml)	65,62	64,46	65,62	68,16	65,62	53,67
MÉDIA	66,91	67,08	66,91	69,09	66,91	54,13
DP	0,91	1,85	0,91	0,66	0,91	0,32

Houve uma mudança não significativa no tempo de retenção do composto nas formulações armazenadas nas três temperaturas. Os picos cromatográficos entre os tempos de retenção de 7-9 minutos referem-se ao excipiente da formulação (Figura 31). Além disso, foi possível constatar a presença de um sinal novo no cromatograma da formulação armazenada a 45 °C, sendo assim necessário efetuar novos estudos para avaliar os possíveis produtos de degradação desta formulação.

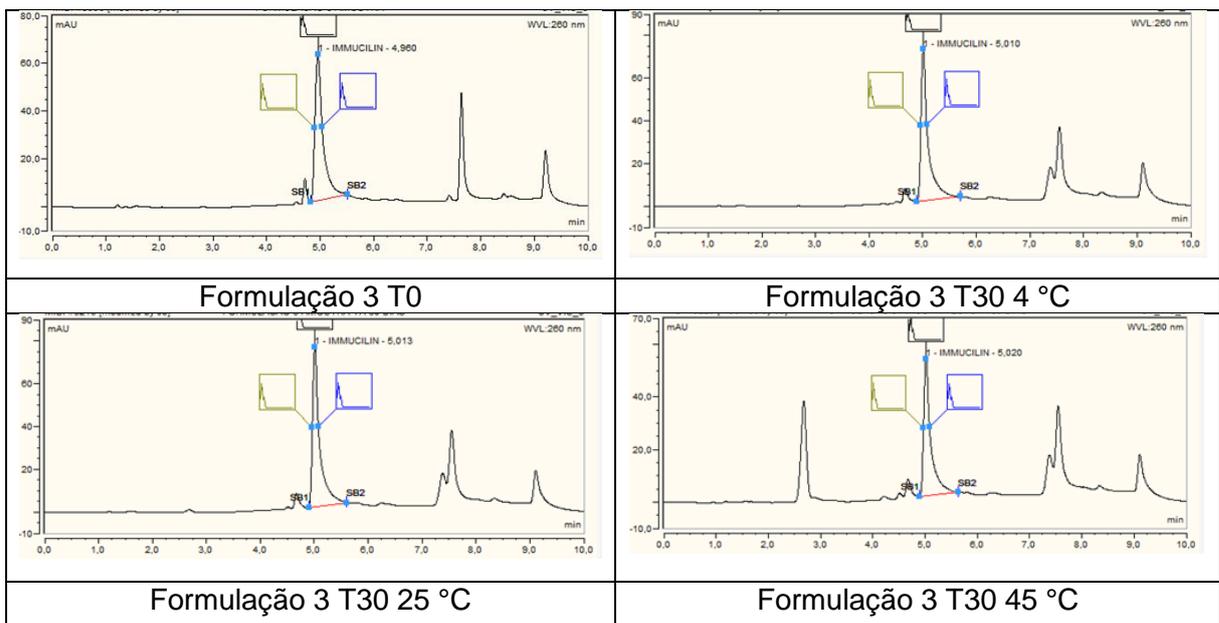


Figura 31: Comparativo dos cromatogramas da formulação-3 com Immucillin-DI4G no tempo inicial e final armazenadas a 4 °C, 25 °C e 45 °C.

#### 6.13.4 Formulação 4 (Immucillin a 1,1% em Gel Polímero Hidroxipropilcelulose a 2%)

As formulações armazenadas a 4 °C e 25 °C se mantiveram estáveis no período de 30 dias (Tabela 20), porém a formulação armazenada a 45 °C apresentou uma queda de aproximadamente 40% no teor quando comparado com o tempo inicial.

Houve ainda alteração no tempo de retenção do fármaco, porém não significativa (Figura 32). Além disso, foi observada a presença dos picos referentes aos excipientes nos tempos de retenção entre 7 e 8 minutos e também a formação de sinais novos no cromatograma das formulações armazenadas a 25 °C e 45 °C que devem ser estudados posteriormente.

Tabela 20: Teor de Immucillin-DI4G na Formulação 4 armazenada à 4 °C, 25 °C e 45 °C nos tempos inicial e final (30 dias).

T °C	FORMULAÇÃO 4					
	4 °C		25 °C		45 °C	
Tempo (dias)	T0	T30	T0	T30	T0	T30
Teor (µg/ml)	84,38	83,74	84,38	84,39	84,38	51,60
MÉDIA	84,76	85,77	84,76	88,04	84,76	52,24
DP	0,27	1,43	0,27	2,58	0,27	0,46

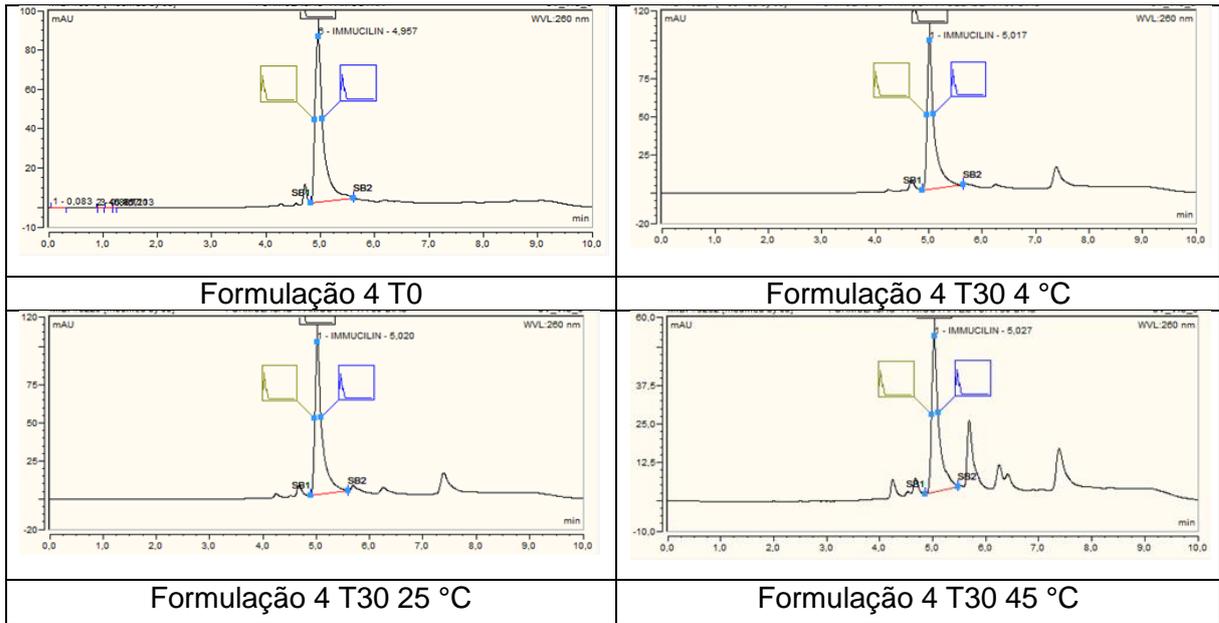


Figura 32: Comparativo dos cromatogramas da formulação-3 com Immucillin-DI4G no tempo inicial e final armazenadas a 4 °C, 25 °C e 45 °C.

## *CONSIDERAÇÕES FINAIS*

---

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados apresentados pode-se afirmar que:

a) A Ressonância Magnética Nuclear, Espectroscopia no Infravermelho e Espectrometria de massas são métodos eficazes para a identificação do Immucillin-DI4G.

b) Apesar de o Immucillin-DI4G apresentar-se mais solúvel em pHs baixos (tampão Acetato pH 2,14) é classificado farmacopeicamente como um composto pouco solúvel.

c) O Immucillin-DI4G (pó amorfo) é estável por até 60 dias quando armazenado a 4 °C e a 25 °C.

d) Novos estudos referentes a possíveis produtos de degradação do pó amorfo observados a 45 °C são necessários.

e) O método de doseamento do Immucillin-DI4G em formulações tópicas apresentou seletividade e especificidade em relação ao composto. O coeficiente de correlação obtido na determinação da linearidade do método foi de 0,9997 estando de acordo com o estabelecido pela ANVISA. O método apresentou um desvio padrão relativo menor que menor que 5% e exatidão dentro do critério de aceitação pela ANVISA, confirmando assim a precisão do método. A média de recuperação obtida (96,3%) e a média do desvio padrão relativo (2,27%) confirmam a exatidão do método. O método apresentou-se robusto quando o fluxo da fase móvel foi modificado de 1,5 para 1,6 mL/min., entretanto não foi robusto quando o fluxo foi alterado de 1,5 para 1,4 mL/min. Além disso não apresentou robustez frente a variação do comprimento de onda utilizado para a detecção do composto.

f) O Immucillin-DI4G não é estável quando em solução aquosa armazenado em temperatura ambiente, apenas quando armazenado a 4 °C.

g) A formulação 1 é considerada estável apenas quando armazenada a 4 °C em até 60 dias. Foi possível observar a formação de outros picos através do CLAE, portanto uma nova análise referente a produtos de degradação da formulação deve ser realizada futuramente.

h) A formulação 1 é considerada um Fluido Não-Newtoniano de comportamento pseudoplástico com valor de cedência.

i) A formulação 1 não apresentou nenhuma variação frente a viscosidade, porém houve mudanças significativas em relação a espalhabilidade da formulação controle e com Immucillin-DI4G quando comparados os tempos iniciais e finais.

j) A formulação 1 não afetou a viabilidade celular quando testada em células VERO, sendo esta formulação considerada não tóxica e segura para o uso tópico.

k) Os aditivos adicionados na formulação 2 auxiliaram na estabilidade da formulação armazenada a 45 °C, porém as formulações armazenadas a 4 °C e 25 °C apresentaram uma queda significativa no teor do fármaco (aproximadamente -10% do teor).

l) A formulação 3 e 4 se mantiveram estáveis quando armazenadas à 4 °C e 25 °C. Porém sofreram uma queda de 18% e 38% no teor do fármaco quando armazenadas à 45 °C.

m) Novos estudos devem ser realizados para avaliar possíveis produtos de degradação das formulações para que as composições das formulações possam ser racionalmente planejadas e a estabilidade da forma farmacêutica aumentada.

## *REFERÊNCIAS*

---

## 8. REFERÊNCIAS

- 1 WHO. Leishmaniasis. 2015. Disponível em
- 2 SAÚDE, M. D.; SAÚDE, S. D. V. E. **MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA 2010.**
- 3 SAÚDE, M. D. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana 2000.**
- 4 P. GIAVEDONI, P. I., I. FUERTES, T. ESTRACH, M. ALSINA GIBERT. Cutaneous Leishmaniasis: 20 Years' Experience in a Spanish Tertiary Care Hospital. **Actas Dermosifiliogr.** , v. 106, 2015.
- 5 ORGANIZATION, W. H. **Control of the leishmaniases 2010.**
- 6 WHO. **INVESTING TO OVERCOME THE GLOBAL IMPACT OF NEGLECTED TROPICAL DISEASES, THIRD WHO REPORT ON NEGLECTED TROPICAL DISEASES 2015 2015.**
- 7 SAÚDE, M. D. **Casos de Leishmaniose tegumentar no Brasil. 2013**
- 8 \_\_\_\_\_. **GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE 2014.**
- 9 \_\_\_\_\_. **MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA 2007.**
- 10 \_\_\_\_\_. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana 2006.**
- 11 PACE, D. Leishmaniasis. **J Infect**, v. 69 Suppl 1, p. S10-8, Nov 2014.
- 12 PREVENTION, C. F. D. C. A. Leishmaniasis. 2015.
- 13 WORKING GROUP ON RESEARCH PRIORITIES FOR DEVELOPMENT OF LEISHMANIASIS, V. et al. Vaccines for the leishmaniases: proposals for a research agenda. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, p. e943, 2011.
- 14 VON STEBUT, E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Exp Dermatol**, v. 16, n. 4, p. 340-6, Apr 2007.
- 15 VALDIR SABBAGA AMATO, HEITOR FRANCO DE ANDRADE JR. ,; DUARTE, M. I. S. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **2003**, Acta Tropica.

- 16 RODRIGUES, F. M. D. Avaliação imunopatológica do sítio de lesão de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, causada por *Leishmania (Viannia) sp*, no Estado do Maranhão, Brasil. 2012.
- 17 HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **J Am Acad Dermatol**, v. 73, n. 6, p. 911-26, Dec 2015.
- 18 SAÚDE, S. D. V. E. **Manual de Recomendações para Diagnóstico , Tratamento e Acompanhamento de Pacientes com a Coinfecção Leishmania - H I V** 2015.
- 19 SAÚDE, M. D. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)** 2014.
- 20 MURRAY, H. W. Leishmaniasis in the United States: treatment in 2012. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 3, p. 434-40, Mar 2012.
- 21 MASMOUDI, A. et al. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **J Dermatol Case Rep**, v. 7, n. 2, p. 31-41, Jun 30 2013.
- 22 HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Mol Biol Int**, v. 2011, p. 571242, 2011.
- 23 FREZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-36, 2009.
- 24 SAÚDE, M. D. **Leishmaniose Visceral Recomendações Clínicas para a Redução da letalidade** 2011.
- 25 PIRES, A. M. S. et al. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: UMA REVISÃO. **Rev. Ciênc. Saúde**, v. 14, 2012.
- 26 KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatol Clin**, v. 33, n. 3, p. 579-93, Jul 2015.
- 27 HENRY W MURRAY, J. D. B., CLIVE R DAVIES, NANCY G SARAIVIA. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, 2005.
- 28 MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 12, p. e912, 2010.

- 29 RIJAL, S. et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clin Infect Dis**, v. 56, n. 11, p. 1530-8, Jun 2013.
- 30 SILVA, R. D. C. D. Avaliação da capacidade do immucillin-H em modular a resposta imune in vitro em indivíduos com leishmaniose cutânea. 2014.
- 31 SANTOS CDA, S. et al. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN $\gamma$ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 6, p. 1533-40, Jun 2013.
- 32 SANTAREM, N. et al. Immune response regulation by leishmania secreted and nonsecreted antigens. **J Biomed Biotechnol**, v. 2007, n. 6, p. 85154, 2007.
- 33 ROCHA, P. N. et al. Down-Regulation of Th1 Type of Response in Early Human American Cutaneous Leishmaniasis. 1999.
- 34 NOVAIS, F. O. et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 7, p. e1003504, 2013.
- 35 RODRIGUES, V. et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2567, Feb 2014.
- 36 KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, 2001.
- 37 HURDAYAL, R.; BROMBACHER, F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. **Immunol Lett**, v. 161, n. 2, p. 179-83, Oct 2014.
- 38 CARVALHO, L. P. et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 5, p. 251-8, May 2007.
- 39 BOGDAN, C.; RIILLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology** 1998.
- 40 FILHO, E. M. D. C. **USO DO IMMUCILLIN DE 4ª GERAÇÃO COMO COADJUVANTE NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.**
- 41 DANTAS, M. L. et al. CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 6, p. 728-34, Nov-Dec 2013.
- 42 GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. **Adv Appl Microbiol**, v. 82, p. 155-84, 2013.

- 43 GOTO, H. **Imunidade inata e imunopatogenia nas leishmanioses experimentais.** 2004.
- 44 DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the Immune Responses of Mice to Infection with *Leishmania braziliensis*. **INFECTION AND IMMUNITY**, 1998.
- 45 DANTAS, M. L. ASPECTOS COMPARATIVOS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM LESÕES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA E DISSEMINADA. 2012.
- 46 GUZMAN-RIVERO, M. et al. The immune response in patients with cutaneous leishmaniasis and the influence of zinc supplementation. **Biomed Pharmacother**, v. 69, p. 56-62, Feb 2015.
- 47 PC, K.; VL, S. Purine nucleoside phosphorylase. Inosine hydrolysis, tight binding of the hypoxanthine intermediate, and third-the-sites reactivity. **Biochemistry**, v. JUL 7, n. 31, 1992.
- 48 BZOWSKAA, A.; KULIKOWSKAA, E.; SHUGAR, D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, 2000.
- 49 BATISTA, E. L., JR. et al. Purine nucleoside phosphorylase activity and expression are upregulated in sites affected by periodontal disease. **J Periodontal Res**, v. 45, n. 5, p. 664-71, Oct 2010.
- 50 BANTIA, S. et al. Purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-1777 Immucillin-H/—a novel potent and orally active immunosuppressive agent. **International Immunopharmacology**, 2001.
- 51 KILPATRICK, J. M. et al. Intravenous and oral pharmacokinetic study of BCX-1777, a novel purine nucleoside phosphorylase transition-state inhibitor. In vivo effects on blood 2'-deoxyguanosine in primates. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 4, p. 541-548, 2003. ISSN 15675769.
- 52 BALAKRISHNAN, K. et al. Phase 2 and pharmacodynamic study of oral forodesine in patients with advanced, fludarabine-treated chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 116, n. 6, p. 886-92, Aug 12 2010.
- 53 BALAKRISHNAN, K. et al. Forodesine, an inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 2392-8, Oct 1 2006.
- 54 ANDRE ARIGONY SOUTO, A. J. D., CANDIDA DEVES, DIÓGENES SANTIAGO SANTOS, ERALDO LUIZ BATISTA JR, LUIZ AUGUSTO BASSO. **Deazapurinas, processo de preparo, composições farmacêuticas compreendendo deazapurinas e seu uso em osteoporose e/ou perda óssea.** Brazil 2014.

- 55 MILES, R. W. et al. One-third-the-sites transition-state inhibitors for purine nucleoside phosphorylase. **Biochemistry**, v. 37, n. 24, p. 8615-21, Jun 16 1998.
- 56 EVANS, G. B. et al. Exploring structure-activity relationships of transition state analogues of human purine nucleoside phosphorylase. **J Med Chem**, v. 46, n. 15, p. 3412-23, Jul 17 2003.
- 57 HO, M. C. et al. Four generations of transition-state analogues for human purine nucleoside phosphorylase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 11, p. 4805-12, Mar 16 2010.
- 58 CLINCH, K. et al. Third-generation immucillins: syntheses and bioactivities of acyclic immucillin inhibitors of human purine nucleoside phosphorylase. **J Med Chem**, v. 52, n. 4, p. 1126-43, Feb 26 2009.
- 59 DE MORAES, M. C. et al. Capillary bioreactors based on human purine nucleoside phosphorylase: a new approach for ligands identification and characterization. **J Chromatogr A**, v. 1232, p. 110-5, Apr 6 2012.
- 60 LOURENÇO, A. R. N. **ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS - DAS RESTRIÇÕES AOS DESAFIOS** -. 2013. Lisboa.
- 61 CORTE, T. W. F. **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE EMULSÕES COSMÉTICAS PARA XEROSE SENIL**. 2006. PUCRS
- 62 BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, 2006.
- 63 ALVES, M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro**. 2006.
- 64 LUSTOSA, A. K. M. F. **aliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (Platonia insignis Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida**. 2012.
- 65 PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A. et al. Anti-Candida activity of a chitosan hydrogel: mechanism of action and cytotoxicity profile. **Gynecol Obstet Invest**, v. 70, n. 4, p. 322-7, 2010.
- 66 SHARQUIE, K. E.; NOAIMI, A. A.; AL-GHAZZI, A. G. Treatment of cutaneous leishmaniasis by topical 25% podophyllin solution (single, blinded, therapeutic, controlled study). **Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery**, v. 19, n. 2, p. 108-113, 2015.

- 67 CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. 2005.
- 68 MALKIN, A. **Rheology fundamentals**. 1994.
- 69 GMBH, R. M. Introduction to Rheology. 2014.
- 70 BRUMMER, R. **Rheology essentials of Cosmetic and food emulsions**. 2005.
- 71 BARNES, H. A. **A HANDBOOK OF ELEMENTARY RHEOLOGY**. 2000.
- 72 SANITÁRIA, A. N. D. V. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 :Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. ANVISA 2003.
- 73 ANVISA. **GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE ESTABILIDADE** 2015.
- 74 \_\_\_\_\_. **GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS** 2003.
- 75 BORELLA, J. C. et al. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, 2010.
- 76 NICOLETTI, N. F. **AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS RECEPTORES B1 E B2 DE CININAS E DOS CANAIS DE CÁLCIO VOLTAGEM DEPENDENTES TIPO-P/Q E – N EM MODELO DE GLIOMA I VITRO E IN VIVO**. 2015.
- 77 EUROPÉIA, F. **USP** 2005.
- 78 BARNES, H. A.; HUTTON, J. E.; S., K. W. F. R. **AN INTRODUCTION TO RHEOLOGY**. 1993.

## APENDICE A – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO REOLÓGICA DA FORMULAÇÃO

### 1

Tabela A1 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento inicial da Formulação 1 (Controle).

VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 CONTROLE T0 (INICIAL)				
V (Rpm)	$\tau$ (Pa) ↑	$\tau$ (Pa) ↓	$\eta$ (mPa.s) ↑	$\eta$ (mPa.s) ↓
0,5	15,3 ± 0,1	13,9 ± 0,2	1562667 ± 5773,5	1429667 ± 15275,3
1	16,0 ± 0,2	14,7 ± 0,1	808933,3 ± 15350,0	752600 ± 0,0
2	16,8 ± 0,1	15,6 ± 0,1	306033,3 ± 228154,2	407866,7 ± 1501,1
2,5	17,0 ± 0,2	15,5 ± 0,6	353600 ± 6579,5	315700 ± 11752,9
4	17,8 ± 0,6	16,3 ± 0,5	225233,3 ± 2550,1	208600 ± 5574,9
5	17,5 ± 0,6	17,2 ± 0,4	184633,3 ± 3611,5	180200 ± 2740,4
10	17,3 ± 0,9	15,2 ± 0,2	89083,3 ± 4885,5	83450 ± 3550,7
20	19,1 ± 3,5	-	51453,3 ± 7071,7	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente ( $p > 0,05$ )

Tabela A2 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 30 dias da Formulação 1 (Controle) armazenada à 4 °C.

VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 CONTROLE (4 °C) – T30 DIAS				
V (Rpm)	$\tau$ (Pa) ↑	$\tau$ (Pa) ↓	$\eta$ (mPa.s) ↑	$\eta$ (mPa.s) ↓
0,5	22,1 ± 0,2	22,1 ± 0,1	2262333,3 ± 17897,9	2255666,7 ± 15821,9
1	25,3 ± 0,2	25,6 ± 0,2	1295000,0 ± 5000,0	1313333,3 ± 2886,8
2	28,2 ± 0,2	18,4 ± 0,1	721866,7 ± 4387,9	728700,0 ± 3928,1
2,5	29,2 ± 0,2	29,7 ± 0,2	600033,3 ± 2050,2	606166,7 ± 2050,2
4	31,6 ± 0,1	31,6 ± 0,1	404000,0 ± 692,8	406133,3 ± 1501,1
5	32,5 ± 0,2	32,8 ± 0,1	334100,0 ± 2137,8	335500,0 ± 2137,8
10	36,6 ± 0,1	36,8 ± 0,1	187566,7 ± 288,7	188066,7 ± 288,7
20	41,2 ± 0,1	-	105666,7 ± 404,1	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente ( $p > 0,05$ )

Tabela A3 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 90 dias da Formulação 1 (Controle) armazenada à 4 °C.

VISCOSIDADE FORMULAÇÃO CONTROLE (4 °C) - T90 DIAS (FINAL)				
V (Rpm)	T (Pa) ↑	T (Pa) ↓	$\eta$ (mPa.s) ↑	$\eta$ (mPa.s) ↓
0,5	20,3 ± 0,1	21,0 ± 0,0	2082000,0 ± 12124,4	2150000,0 ± 0,0
1	24,5 ± 0,1	25,0 ± 0,1	1252333,3 ± 2886,8	1278000,0 ± 3461,1
2	28,0 ± 0,1	28,1 ± 0,1	716766,7 ± 2550,2	718466,7 ± 1443,4
2,5	28,9 ± 0,1	29,0 ± 0,0	592500,0 ± 1212,4	593900,0 ± 0,0
4	31,3 ± 0,1	31,3 ± 0,0	400166,7 ± 750,6	400600,0 ± 0,0
5	32,5 ± 0,1	32,5 ± 0,0	332433,3 ± 635,1	332800,0 ± 0,0
10	36,6 ± 0,0	36,6 ± 0,1	187400,0 ± 0,0	187000,0 ± 346,4
20	41,5 ± 0,1	-	106100,0 ± 173,2	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente ( $p > 0,05$ )

Tabela A4 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 30 dias da Formulação 1 (Controle) armazenada à 25 °C.

VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 CONTROLE (25 °C) - T30 DIAS				
V (Rpm)	$\tau$ (Pa) ↑	$\tau$ (Pa) ↓	$\eta$ (mPa.s) ↑	$\eta$ (mPa.s) ↓
0,5	22,7 ± 0,7	24,7 ± 0,0	2354666,7 ± 20502,0	2529000,0 ± 0,0
1	26,0 ± 0,4	27,2 ± 0,1	1332333,3 ± 20744,5	1377000,0 ± 5000,0
2	29,4 ± 0,1	29,3 ± 0,2	753466,7 ± 1501,1	754300,0 ± 5356,3
2,5	32,1 ± 2,9	30,1 ± 0,1	623266,7 ± 1154,7	623233,3 ± 2367,1

4	32,5 ± 0,1	32,3 ± 0,2	416366,7 ± 1443,4	412966,7 ± 2706,2
5	33,5 ± 0,1	33,2 ± 0,2	342666,7 ± 1154,7	340633,3 ± 1582,2
10	37,6 ± 0,1	37,1 ± 0,2	192333,3 ± 577,4	190066,7 ± 1040,8
20	41,9 ± 0,2	-	107300,0 ± 793,7	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente (p > 0,05)

Tabela A5 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 90 dias da Formulação 1 (Controle) armazenada à 25 °C.

<b>VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 CONTROLE (25 °C) - T90 DIAS (FINAL)</b>				
<b>V (Rpm)</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↑</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↓</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↑</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↓</b>
0,5	19,5 ± 0,2	20,4 ± 0,0	1993333,3 ± 23671,4	2089000,0 ± 0,0
1	23,4 ± 0,1	24,2 ± 0,0	1196333,3 ± 2886,8	1239000,0 ± 0,0
2	26,6 ± 0,1	27,3 ± 0,1	680933,3 ± 2550,2	697966,7 ± 1443,4
2,5	27,7 ± 0,1	28,2 ± 0,0	569300,0 ± 0,0	577500,0 ± 0,0
4	30,0 ± 0,1	30,2 ± 0,1	384400,0 ± 692,8	386933,3 ± 750,65
5	31,0 ± 0,1	31,2 ± 0,1	317066,7 ± 577,4	319766,7 ± 635,1
10	34,8 ± 0,1	35,1 ± 0,1	178266,7 ± 288,7	179533,3 ± 577,4
20	39,7 ± 0,1	-	101566,7 ± 251,7	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente (p > 0,05)

Tabela A6 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 30 dias da Formulação 1 (Controle) armazenada à 45 °C.

<b>VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 CONTROLE (45 °C) – T30 DIAS</b>				
<b>V (Rpm)</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↑</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↓</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↑</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↓</b>
0,5	20,0 ± 0,2	21,4 ± 0,0	2051000,0 ± 15716,2	2191000,0 ± 10000,0
1	24,0 ± 0,2	24,5 ± 0,1	1232000,0 ± 13114,9	1255666,7 ± 2886,8
2	27,3 ± 0,2	27,4 ± 0,1	701400,0 ± 2600,0	701400,0 ± 0,0
2,5	28,2 ± 0,1	28,3 ± 0,1	579533,3 ± 2050,2	580900,0 ± 1212,4
4	30,5 ± 0,1	30,6 ± 0,1	391600,0 ± 0,0	391200,0 ± 692,8
5	31,5 ± 0,1	31,7 ± 0,1	323533,3 ± 1050,4	324233,3 ± 635,1
10	35,5 ± 0,2	35,5 ± 0,1	182033,3 ± 763,8	181866,7 ± 288,7
20	40,4 ± 0,0	-	103300,0 ± 173,2	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente (p > 0,05)

Tabela A7 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 90 dias da Formulação 1 (Controle) armazenada à 45 °C.

<b>VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 CONTROLE (45 °C) – T90 DIAS (FINAL)</b>				
<b>V (Rpm)</b>	<b>T (Pa) ↑</b>	<b>T (Pa) ↓</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↑</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↓</b>
0,5	21,7 ± 0,0	23,0 ± 0,0	2222000,0 ± 0,0	2355000,0 ± 0,0
1	24,5 ± 0,1	25,3 ± 0,1	1255666,7 ± 2886,8	1296666,7 ± 2886,8
2	27,5 ± 0,0	27,8 ± 0,1	704000,0 ± 0,0	711633,3 ± 2550,2
2,5	28,3 ± 0,1	28,5 ± 0,1	580200,0 ± 1212,4	584300,0 ± 1212,4
4	30,4 ± 0,0	30,5 ± 0,0	389100,0 ± 0,0	390400,0 ± 0,0
5	31,4 ± 0,0	31,4 ± 0,1	321500,0 ± 0,0	321833,3 ± 577,4
10	34,9 ± 0,1	34,9 ± 0,1	178833,3 ± 635,1	178800,0 ± 346,4
20	39,5 ± 0,1	-	101066,7 ± 251,7	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente (p > 0,05)

Tabela A8 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento inicial da Formulação 1 – IMMUCILLIN-DI4G.

<b>VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 IMMUCILLIN-DI4G T0 (INICIAL)</b>				
<b>V (Rpm)</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↑</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↓</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↑</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↓</b>

0,5	17,0 ± 0,1	18,9 ± 0,0	1740333,3 ± 17897,9	1935000,0 ± 0,0
1	18,8 ± 0,3	20,4 ± 0,1	960833,3 ± 10672,6	1045666,7 ± 2886,8
2	21,5 ± 0,2	22,3 ± 0,1	550366,7 ± 2550,2	570800,0 ± 0,0
2,5	22,2 ± 0,1	23,0 ± 0,1	454600,0 ± 0,0	471000,0 ± 0,0
4	23,8 ± 0,0	24,5 ± 0,1	304600,0 ± 0,0	414800,0 ± 173205,1
5	24,8 ± 0,1	25,4 ± 0,0	253566,7 ± 577,4	260100,0 ± 0,0
10	28,0 ± 0,1	28,4 ± 0,1	143133,3 ± 288,7	145400,0 ± 0,0
20	32,0 ± 0,2	-	82086,7 ± 144,3	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente (p > 0,05)

Tabela A9 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 30 dias da Formulação 1 – IMMUCILLIN-DI4G armazenada a 4 °C.

<b>VISCOSIDADE FORMULAÇÃO IMMUCILLIN-DI4G (4 °C) – T30 DIAS</b>				
<b>V (Rpm)</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↑</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↓</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↑</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↓</b>
0,5	19,0 ± 0,3	19,4 ± 0,1	1921333,3 ± 52842,5	1982666,7 ± 11547,0
1	20,7 ± 0,1	21,3 ± 0,1	1059333,3 ± 5507,6	1088333,3 ± 2886,8
2	22,9 ± 0,1	23,3 ± 0,1	585333,3 ± 1501,1	598133,3 ± 1501,1
2,5	23,7 ± 0,1	24,1 ± 0,1	485300,0 ± 0,0	492833,3 ± 1154,7
4	25,3 ± 0,1	25,8 ± 0,1	322500,0 ± 0,0	330633,3 ± 750,6
5	26,2 ± 0,1	26,7 ± 0,1	267533,3 ± 577,4	272666,7 ± 635,1
10	29,2 ± 0,1	29,8 ± 0,1	149500,0 ± 500,0	152166,7 ± 28,7
20	33,4 ± 0,1	-	85500,0 ± 260,0	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente (p > 0,05)

Tabela A10 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 90 dias da Formulação 1 – IMMUCILLIN-DI4G armazenada a 4 °C.

<b>VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 IMMUCILLIN-DI4G (4 °C) – T90 DIAS (FINAL)</b>				
<b>V (Rpm)</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↑</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↓</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↑</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↓</b>
0,5	21,2 ± 0,1	21,2 ± 0,0	2170333,3 ± 10504,0	2170000,0 ± 0,0
1	22,6 ± 0,1	22,9 ± 0,0	1158666,7 ± 2886,8	1172000,0 ± 0,0
2	25,1 ± 0,1	24,9 ± 0,1	641666,7 ± 1443,4	636533,3 ± 1501,1
2,5	25,7 ± 0,0	25,8 ± 0,1	526300,0 ± 0,0	527633,3 ± 1154,7
4	27,5 ± 0,0	27,4 ± 0,1	352000,0 ± 0,0	351133,3 ± 750,6
5	28,4 ± 0,1	28,4 ± 0,1	290466,7 ± 577,4	291133,3 ± 577,4
10	31,7 ± 0,1	31,7 ± 0,1	162133,3 ± 288,7	162466,7 ± 577,4
20	35,8 ± 0,1	-	91726,7 ± 150,1	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente (p > 0,05)

Tabela A11 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 30 dias da Formulação 1 – IMMUCILLIN-DI4G armazenada a 25 °C.

<b>VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 IMMUCILLIN-DI4G (25 °C) – T30 DIAS</b>				
<b>V (Rpm)</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↑</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↓</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↑</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↓</b>
0,5	22,7 ± 0,2	23,0 ± 0,1	2341000,0 ± 12124,4	2421666,7 ± 124230,97
1	25,8 ± 0,2	25,3 ± 0,2	1319000,0 ± 8185,4	1296666,7 ± 10408,33
2	27,8 ± 0,1	27,5 ± 0,2	712466,7 ± 1501,1	703100,0 ± 5888,97
2,5	28,7 ± 0,1	28,2 ± 0,2	587066,7 ± 2367,1	577500,0 ± 4100,00
4	30,3 ± 0,2	30,1 ± 0,3	387366,7 ± 1985,8	385666,7 ± 3695,04
5	31,1 ± 0,1	30,9 ± 0,2	318733,3 ± 577,4	316700,0 ± 1571,62
10	34,6 ± 0,3	34,5 ± 0,2	178266,7 ± 288,7	176600,0 ± 1322,88
20	38,9 ± 0,2	-	99580,0 ± 260,0	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente (p > 0,05)

Tabela A12 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 90 dias da Formulação 1 – IMMUCILLIN-DI4G armazenada a 25 °C.

<b>VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 IMMUCILLIN-DI4G (25 °C) – T90 DIAS (FINAL)</b>				
<b>V (Rpm)</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↑</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↓</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↑</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↓</b>

0,5	20,5 ± 0,1	19,6 ± 0,1	2089000,0 ± 0,0	2003333,3 ± 6350,9
1	22,0 ± 0,1	21,2 ± 0,1	1124333,3 ± 2886,8	1086666,7 ± 2886,8
2	24,0 ± 0,0	23,4 ± 0,1	614400,0 ± 0,0	598133,3 ± 1501,1
2,5	24,7 ± 0,0	24,5 ± 0,1	505800,0 ± 0,0	501033,3 ± 1154,7
4	26,5 ± 0,1	26,2 ± 0,0	338766,7 ± 750,6	335300,0 ± 0,0
5	27,2 ± 0,0	27,1 ± 0,0	278500,0 ± 0,0	277500,0 ± 0,0
10	30,4 ± 0,1	30,2 ± 0,0	155433,3 ± 288,7	154766,7 ± 288,7
20	34,3 ± 0,0	-	87800,0 ± 0,0	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente (p > 0,05)

Tabela A13 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 30 dias da Formulação 1 – IMMUCILLIN-DI4G armazenada a 45 °C.

<b>VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 IMMUCILLIN-DI4G (45 °C) – T30 DIAS</b>				
<b>V (Rpm)</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↑</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↓</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↑</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↓</b>
0,5	27,8 ± 0,3	25,0 ± 0,1	2846666,7 ± 27024,7	2560000,0 ± 0,0
1	33,0 ± 0,7	28,0 ± 0,2	1689333,3 ± 35795,7	1434666,7 ± 10408,3
2	37,1 ± 0,1	31,4 ± 0,1	848900,0 ± 174695,9	804666,7 ± 3002,2
2,5	37,5 ± 0,3	32,5 ± 0,2	765900,0 ± 4100,0	665566,7 ± 3521,8
4	39,8 ± 0,4	35,2 ± 0,0	511033,3 ± 6906,0	450500,0 ± 0,0
5	40,6 ± 0,3	36,7 ± 0,2	415733,3 ± 2702,5	375433,3 ± 1582,2
10	44,5 ± 0,5	41,8 ± 0,2	257633,3 ± 27401,5	214166,7 ± 1040,8
20	49,6 ± 0,5	-	126366,7 ± 2362,9	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente (p > 0,05)

Tabela A14 - Valores de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ), viscosidade ( $\eta$ ) e velocidade de cisalhamento em 90 dias da Formulação 1 – IMMUCILLIN-DI4G armazenada a 45 °C.

<b>VISCOSIDADE FORMULAÇÃO 1 IMMUCILLIN-DI4G (45 °C) – T90 DIAS (FINAL)</b>				
<b>V (Rpm)</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↑</b>	<b><math>\tau</math> (Pa) ↓</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↑</b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s) ↓</b>
0,5	29,8 ± 0,0	26,7 ± 0,0	305100,0 ± 0,0	2734000,0 ± 1311,5
1	35,1 ± 0,2	29,9 ± 0,1	1798666,7 ± 7637,6	1532000,0 ± 1501,1
2	39,4 ± 0,1	33,5 ± 0,1	1007333,3 ± 1154,7	856733,3 ± 577,4
2,5	39,2 ± 0,1	37,5 ± 0,2	802066,7 ± 2367,1	480366,7 ± 2650,2
4	41,9 ± 0,1	39,3 ± 0,1	536300,0 ± 1300,0	402733,3 ± 1501,1
5	42,4 ± 0,2	44,8 ± 0,3	434466,7 ± 1582,2	230000,0 ± 3464,1
10	47,0 ± 0,4	44,9 ± 0,3	240036,7 ± 2886,5	229533,3 ± 0,0
20	52,4 ± 0,4	-	134100,0 ± 1135,8	-

↑ = valores de curva ascendente ↓ = valores de curva descendente (p > 0,05)

## APENDICE B – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA ESPALHABILIDADE DA FORMULAÇÃO 1

Tabela B1 - Valores de espalhabilidade (Ei) da Formulação 1 (Controle) armazenada a 4 °C em função do peso adicionado e do tempo

PESO (g)	ESPALHABILIDADE FORMULAÇÃO CONTROLE (4 °C)		
	INICIAL (T0)	T 30	FINAL (T90)
277,14	113,4 ± 15,98	113,2 ± 9,42	84,13 ± 12,25
350,01	229,6 ± 62,47	228,0 ± 40,05	162,10 ± 28,08
424,29	326,7 ± 65,30	294,0 ± 31,96	228,57 ± 49,11
490,70	412,2 ± 86,75	369,9 ± 55,72	275,80 ± 62,49
558,16	481,1 ± 101,27	435,1 ± 65,26	318,06 ± 89,06
624,02	556,9 ± 138,37	487,0 ± 94,17	378,44 ± 100,04
700,33	636,0 ± 151,21	568,1 ± 101,59	431,62 ± 106,74
769,48	727,0 ± 144,75	634,4 ± 129,05	457,26 ± 120,99
842,10	784,0 ± 157,75	663,8 ± 123,14	491,21 ± 148,77
916,81	861,7 ± 190,77	734,3 ± 134,93	537,07 ± 147,93
986,41	904,4 ± 179,95	774,9 ± 142,44	573,90 ± 178,59
1057,46	987,7 ± 215,48	834,3 ± 162,65	606,67 ± 149,51
1130,38	1071,5 ± 204,52	886,1 ± 167,55	659,47 ± 169,55
1198,66	1101,7 ± 227,47	949,5 ± 189,39	476,04 ± 205,20
1264,27	1170,4 ± 221,90	968,4 ± 202,09	512,15 ± 198,42
1331,02	1212,8 ± 251,69	1014,8 ± 209,30	753,40 ± 183,48
1404,83	1282,8 ± 213,91	1042,1 ± 193,01	786,90 ± 199,92
1474,83	1345,4 ± 187,07	1090,4 ± 202,75	827,52 ± 189,42
1540,14	1379,2 ± 215,32	1140,3 ± 219,07	853,10 ± 192,26
1608,30	1401,8 ± 229,46	1160,6 ± 226,87	879,07 ± 195,10

Tabela B2 - Valores de espalhabilidade (Ei) da Formulação 1 (Controle) armazenada a 25 °C em função do peso adicionado e do tempo

PESO (g)	ESPALHABILIDADE FORMULAÇÃO CONTROLE (25 °C)		
	INICIAL (T0)	T 30	FINAL (T90)
277,14	113,4 ± 15,98	110,5 ± 19,71	73,66 ± 11,74
350,01	229,6 ± 62,47	210,5 ± 37,96	136,13 ± 6,01
424,29	326,7 ± 65,30	305,0 ± 50,67	209,99 ± 27,06
490,70	412,2 ± 86,75	365,4 ± 75,60	259,90 ± 36,14
558,16	481,1 ± 101,27	430,2 ± 87,02	306,28 ± 70,09
624,02	556,9 ± 138,37	512,9 ± 89,28	353,32 ± 58,71
700,33	636,0 ± 151,21	561,4 ± 105,90	404,93 ± 62,84
769,48	727,0 ± 144,75	626,2 ± 115,37	435,61 ± 73,81
842,10	784,0 ± 157,75	671,8 ± 126,68	475,25 ± 108,71
916,81	861,7 ± 190,77	725,6 ± 120,85	519,80 ± 91,32
986,41	904,4 ± 179,95	782,2 ± 123,67	569,19 ± 115,52
1057,46	987,7 ± 215,48	860,0 ± 158,50	603,53 ± 98,40
1130,38	1071,5 ± 204,52	903,1 ± 152,25	654,76 ± 92,26
1198,66	1101,7 ± 227,47	957,4 ± 164,83	684,85 ± 84,48
1264,27	1170,4 ± 221,90	1002,6 ± 150,90	723,51 ± 73,32
1331,02	1212,8 ± 251,69	1042,1 ± 185,01	805,93 ± 100,50
1404,83	1282,8 ± 213,91	1091,2 ± 205,26	830,07 ± 68,17
1474,83	1345,4 ± 187,07	1120,8 ± 212,95	856,44 ± 91,10
1540,14	1379,2 ± 215,32	1159,3 ± 195,47	908,38 ± 71,28
1608,30	1401,8 ± 229,46	1178,9 ± 188,20	962,15 ± 54,95

Tabela B3 - Valores de espalhabilidade (Ei) da Formulação 1 (Controle) armazenada a 45 °C em função do peso adicionado e do tempo

PESO (g)	ESPALHABILIDADE FORMULAÇÃO CONTROLE (45 °C)		
	INICIAL (T0)	T 30	FINAL (T90)
277,14	113,4 ± 15,98	92,3 ± 9,97	73,40 ± 4,42
350,01	229,6 ± 62,47	165,4 ± 20,05	150,26 ± 6,23
424,29	326,7 ± 65,30	266,8 ± 70,06	209,46 ± 7,36
490,70	412,2 ± 86,75	343,6 ± 79,33	278,48 ± 8,50
558,16	481,1 ± 101,27	405,6 ± 75,56	324,60 ± 9,18
624,02	556,9 ± 138,37	449,2 ± 95,18	368,56 ± 9,86
700,33	636,0 ± 151,21	509,3 ± 128,84	391,58 ± 10,08
769,48	727,0 ± 144,75	563,0 ± 125,07	427,43 ± 10,54
842,10	784,0 ± 157,75	611,6 ± 110,27	484,41 ± 29,64
916,81	861,7 ± 190,77	664,2 ± 125,20	531,05 ± 35,69
986,41	904,4 ± 179,95	703,2 ± 133,85	586,53 ± 12,35
1057,46	987,7 ± 215,48	759,5 ± 148,70	615,83 ± 37,73
1130,38	1071,5 ± 204,52	783,8 ± 146,35	652,66 ± 13,03
1198,66	1101,7 ± 227,47	859,7 ± 153,51	706,63 ± 23,55
1264,27	1170,4 ± 221,90	904,4 ± 171,95	746,34 ± 13,94
1331,02	1212,8 ± 251,69	958,3 ± 177,17	762,56 ± 14,16
1404,83	1282,8 ± 213,91	1015,3 ± 204,74	787,49 ± 38,12
1474,83	1345,4 ± 187,07	1071,1 ± 192,72	803,97 ± 25,12
1540,14	1379,2 ± 215,32	1120,8 ± 212,95	837,99 ± 39,31
1608,30	1401,8 ± 229,46	1161,4 ± 228,93	872,27 ± 15,07

Tabela B4 - Valores de espalhabilidade (Ei) da Formulação 1 (IMMUCILLIN-DI4G) armazenada a 4 °C em função do peso adicionado e do tempo

PESO (g)	ESPALHABILIDADE FORMULAÇÃO IMMUCILLIN – DI4G (4 °C)		
	INICIAL (T0)	T 30	FINAL (T90)
277,14	129,9 ± 21,34	71,2 ± 13,26	55,34 ± 16,23
350,01	266,0 ± 56,31	126,8 ± 25,28	103,82 ± 0,00
424,29	374,5 ± 26,04	194,0 ± 40,58	169,17 ± 17,73
490,70	466,2 ± 60,36	255,3 ± 38,05	214,11 ± 22,77
558,16	540,3 ± 92,46	325,8 ± 49,34	259,38 ± 21,93
624,02	632,4 ± 91,14	419,3 ± 98,99	319,43 ± 18,13
700,33	701,3 ± 105,14	411,1 ± 69,36	335,59 ± 24,93
769,48	774,1 ± 124,36	461,9 ± 99,26	385,89 ± 19,94
842,10	824,6 ± 139,29	486,9 ± 92,46	421,35 ± 10,54
916,81	904,1 ± 172,23	540,9 ± 107,31	446,21 ± 28,44
986,41	957,4 ± 164,83	590,5 ± 121,49	477,67 ± 11,22
1057,46	1042,9 ± 199,73	635,5 ± 145,82	517,18 ± 11,67
1130,38	1090,8 ± 203,63	656,6 ± 127,97	558,27 ± 12,12
1198,66	1140,0 ± 208,88	717,6 ± 119,45	593,79 ± 21,59
1264,27	1191,2 ± 228,15	726,3 ± 134,46	630,22 ± 12,80
1331,02	1234,3 ± 262,57	765,7 ± 123,32	660,32 ± 22,77
1404,83	1273,9 ± 237,48	799,5 ± 140,94	691,19 ± 35,72
1474,83	1317,4 ± 256,09	866,7 ± 131,06	706,63 ± 23,55
1540,14	1351,9 ± 291,06	884,5 ± 139,71	738,55 ± 36,92
1608,30	1373,5 ± 293,36	911,1 ± 143,91	746,47 ± 28,10

Tabela B5 - Valores de espalhabilidade (Ei) da Formulação 1 (IMMUCILLIN-DI4G) armazenada a 25 °C em função do peso adicionado e do tempo

PESO (g)	ESPALHABILIDADE FORMULAÇÃO IMMUCILLIN – DI4G (25 °C)		
	INICIAL (T0)	T 30	FINAL (T90)
277,14	129,9 ± 21,34	118,3 ± 40,45	86,68 ± 8,24
350,01	266,0 ± 56,31	138,0 ± 37,64	162,10 ± 28,08
424,29	374,5 ± 26,04	302,0 ± 130,07	223,79 ± 41,44
490,70	466,2 ± 60,36	379,7 ± 166,78	290,52 ± 60,06
558,16	540,3 ± 92,46	447,6 ± 203,95	332,38 ± 68,12
624,02	632,4 ± 91,14	521,2 ± 244,74	375,56 ± 54,05
700,33	701,3 ± 105,14	549,9 ± 264,11	410,62 ± 56,58
769,48	774,1 ± 124,36	606,7 ± 283,93	453,86 ± 66,96
842,10	824,6 ± 139,29	659,7 ± 309,87	524,45 ± 42,58
916,81	904,1 ± 172,23	708,3 ± 342,63	580,05 ± 49,85
986,41	957,4 ± 164,83	758,6 ± 377,16	615,96 ± 43,96
1057,46	1042,9 ± 199,73	803,7 ± 419,19	645,92 ± 56,88
1130,38	1090,8 ± 203,63	832,2 ± 394,51	684,06 ± 61,94
1198,66	1140,0 ± 208,88	868,3 ± 418,98	715,20 ± 59,84
1264,27	1191,2 ± 228,15	923,9 ± 456,85	747,12 ± 60,67
1331,02	1234,3 ± 262,57	931,6 ± 450,36	779,44 ± 49,46
1404,83	1273,9 ± 237,48	958,4 ± 456,60	812,28 ± 14,62
1474,83	1317,4 ± 256,09	989,2 ± 489,59	820,85 ± 29,46
1540,14	1351,9 ± 291,06	1032,9 ± 482,73	863,57 ± 15,07
1608,30	1373,5 ± 293,36	1052,8 ± 495,80	907,59 ± 26,69

Tabela B6 - Valores de espalhabilidade (Ei) da Formulação 1 (IMMUCILLIN-DI4G) armazenada a 45 °C em função do peso adicionado e do tempo

PESO (g)	ESPALHABILIDADE FORMULAÇÃO IMMUCILLIN – DI4G (45 °C)		
	INICIAL (T0)	T 30	FINAL (T90)
277,14	129,9 ± 21,34	71,2 ± 13,26	55,34 ± 16,23
350,01	266,0 ± 56,31	126,8 ± 25,28	103,82 ± 0,00
424,29	374,5 ± 26,04	194,0 ± 40,58	169,17 ± 17,73
490,70	466,2 ± 60,36	255,3 ± 38,05	214,11 ± 22,77
558,16	540,3 ± 92,46	325,8 ± 49,34	259,38 ± 21,93
624,02	632,4 ± 91,14	419,3 ± 98,99	319,43 ± 18,13
700,33	701,3 ± 105,14	411,1 ± 69,36	335,59 ± 24,93
769,48	774,1 ± 124,36	461,9 ± 99,26	385,89 ± 19,94
842,10	824,6 ± 139,29	486,9 ± 92,46	421,35 ± 10,54
916,81	904,1 ± 172,23	540,9 ± 107,31	446,21 ± 28,44
986,41	957,4 ± 164,83	590,5 ± 121,49	477,67 ± 11,22
1057,46	1042,9 ± 199,73	635,5 ± 145,82	517,18 ± 11,67
1130,38	1090,8 ± 203,63	656,6 ± 127,97	558,27 ± 12,12
1198,66	1140,0 ± 208,88	717,6 ± 119,45	593,79 ± 21,59
1264,27	1191,2 ± 228,15	726,3 ± 134,46	630,22 ± 12,80
1331,02	1234,3 ± 262,57	765,7 ± 123,32	660,32 ± 22,77
1404,83	1273,9 ± 237,48	799,5 ± 140,94	691,19 ± 35,72
1474,83	1317,4 ± 256,09	866,7 ± 131,06	706,63 ± 23,55
1540,14	1351,9 ± 291,06	884,5 ± 139,71	738,55 ± 36,92
1608,30	1373,5 ± 293,36	911,1 ± 143,91	746,47 ± 28,10