

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANDRÉ LUÍS MORAIS RUELA

**POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE COMO SISTEMAS
PARA LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE NICOTINA**

Alfenas/MG

2012

ANDRÉ LUÍS MORAIS RUELA

**POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE COMO SISTEMAS
PARA LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE NICOTINA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Avaliação Físico-Química e Microbiológica de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Gislaine Ribeiro Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

Alfenas/MG

2012

ANDRÉ LUÍS MORAIS RUELA

**POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE COMO SISTEMAS
PARA LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE NICOTINA**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Avaliação Físico-Química e Microbiológica de Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em 21 de dezembro de 2012.

Prof^a Dr^a Gislaine Ribeiro Pereira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura

Prof. Dr. Fábio Herbst Florenzano

Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Instituição: Universidade de Brasília Assinatura

AGRADECIMENTOS

À orientação da Prof^a Dr^a Gislaine Ribeiro Pereira, por toda atenção, confiança e conhecimento;

Ao Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo por disponibilizar as instalações do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos - LATF, pela colaboração nos estudos de microscopia eletrônica de varredura e por sempre acreditar nos resultados deste trabalho;

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – LATF que acompanharam diretamente as atividades deste trabalho;

Ao mestrando Gabriel de Oliveira Isac Moraes pelo apoio durante a síntese e preparo dos polímeros e na realização dos estudos de espectroscopia de absorção na região do infravermelho;

Ao Laboratório Interdisciplinar de Química (LabIQ)/UNIFAL-MG, onde foram realizados os estudos por espectroscopia de absorção na região do infravermelho;

Às mestrandas Sumaia Araújo Pires e Josiane Souza Pereira Daniel do Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos/IQ/UNIFAL-MG pelo apoio nos estudos de calorimetria diferencial de varredura e termogravimetria;

Às alunas de iniciação científica Aline Gravinez Perissinato e Ana Carolina Zogbi de Lima pela colaboração nos estudos de liberação, permeação e retenção cutânea;

À Prof^a Dr^a Magali Benjamim de Araújo, à mestranda Marilene Lopes Ângelo e a todos os funcionários do Núcleo Controle de Qualidade da UNIFAL-MG por todo suporte e colaboração;

À minha família por toda ajuda e por apoiar as minhas decisões;

À Fernanda Segurasse de Moraes por toda atenção e companheirismo;

Aos amigos José Honório Mendes Costalonga e Suéllen Cristina Rennó Silva pelo incentivo e ajuda nesta etapa;

À CAPES e a UNIFAL-MG pelo apoio financeiro.

“A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

João Guimarães Rosa

RESUMO

É de grande interesse a avaliação de novas tecnologias para aplicação como sistemas de liberação de fármacos. Os polímeros impressos molecularmente (MIPs) são materiais bem estabelecidos no campo analítico como sorventes para extração em fase sólida, entretanto, a aplicação destes materiais como sistemas de liberação de fármacos vem sendo discutida e avaliada recentemente. No presente trabalho, propôs-se o desenvolvimento de sistemas para liberação transdérmica de nicotina usando MIPs como estratégia para controlar a velocidade de liberação do fármaco. Para avaliar os sistemas propostos foram sintetizados copolímeros de ácido metacrílico impressos molecularmente com a nicotina. O MIP foi sintetizado usando nicotina como molécula molde, ácido metacrílico como monômero funcional, etilenoglicol dimetacrilato como agente de ligação cruzada, diclorometano como solvente porogênico e 2,2-azobisisobutironitrila como iniciador radicalar. O sistema de síntese foi mantido por 24 h a 60 °C. Polímeros não impressos (NIP) foram sintetizados usando a mesma metodologia na ausência de nicotina. O material polimérico obtido foi moído e partículas entre 75-106 µm foram coletadas e lavadas para remoção da nicotina. As formulações transdérmicas foram preparadas pela mistura de quantidades predeterminadas de polímero com dispersões de nicotina a 5 % (p/p) em um veículo viscoso. Dois diferentes veículos foram testados, um veículo hidrofílico (propilenoglicol) e outro lipofílico (óleo mineral). A liberação e permeação cutânea dos sistemas de liberação propostos foram avaliadas em célula de difusão vertical. Estudos de liberação foram realizados usando uma membrana de diálise e estudos de permeação cutânea foram realizados usando pele de orelha de porco. O meio receptor utilizado foi tampão fosfato pH 7,4 e a quantificação do fármaco foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em modo fase reversa. Estudos empregando espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial de varredura (CDV) foram realizados para caracterizar interações entre o fármaco e o polímero e indicaram que podem acontecer interações físicas do tipo fármaco/polímero. Conforme os resultados, as formulações contendo MIP preparadas no veículo lipofílico apresentaram uma menor velocidade de liberação da nicotina, provavelmente devido ao mecanismo de reconhecimento molecular estar favorecido neste meio. Estudos também demonstraram que o aumento da concentração de polímero na formulação pode aumentar o controle da velocidade de liberação da nicotina. Estudos de permeação cutânea foram realizados por 48 h e os resultados apresentaram um melhor ajuste ao modelo cinético de Higuchi, sendo que os MIPs apresentaram uma menor velocidade de liberação em relação aos polímeros controle e desvios significativamente inferiores àqueles observados com o NIP. Deste modo, foi possível demonstrar neste trabalho que os MIPs podem apresentar um potencial promissor para aplicação em sistemas para liberação transdérmica de nicotina.

Palavras-chave: Nicotina; MIP; Sistemas de liberação transdérmica.

ABSTRACT

Polymers have been investigated in pharmaceutical technology as safe and efficient drug delivery systems (DDS). Molecular imprinted polymers (MIPs) are well established tool in analytical field; however, the feasibility of these materials has been discussed as DDS. Drug-polymer interactions can be established when these materials are incorporated in pharmaceutical dosages and, consequently, can be expected the modification of drug release profile. The aim of this work was to evaluate nicotine imprinted polymers and its application in transdermal drug delivery. Nicotine imprinted polymers were synthesized using methylene chloride as porogenic solvent, methacrylic acid as functional monomer and ethylenoglycol dymethacrylate as cross-linker. Free radical polymerization reaction was initiated using 2,2-azobisisobutyronitrile (initiator) and heating at 60°C. Non-imprinted polymers (NIPs) were synthesized in the same way without nicotine. The polymeric material was grounded in a mortar and washed with a mixture of methanol: acetic acid (4:1) to remove nicotine. Polymer particles were passed through appropriate meshes and fractions of 75-106 μm were separated for formulations preparation and characterization tests. Transdermal formulations were prepared by mixing polymer particles (MIPs and NIPs) with nicotine dispersions in mineral oil (nonpolar vehicle) or in propylene glycol (polar vehicle) in order to investigate the molecular recognition properties in different media. *In vitro* release and skin permeation studies were performed in vertical diffusion cell. Release studies were carried out using dialysis membrane and permeation studies were carried out with excised porcine ear skin. Receptor phase was isotonic phosphate buffer (pH 7.4) and the quantification was performed by high performance liquid chromatography. Additional studies using infrared spectroscopy (IR), thermogravimetry (TG) and differential scanning calorimetry (DSC) were performed to characterize interactions between drug and polymer particles. According IR, TG and DSC studies, nicotine can be physically adsorbed in polymer particles, suggesting a potential application as DDS. Nicotine release rate in MIPs formulations including nonpolar vehicle was slower than that observed when polar vehicle was employed in the formulations. The drug-polymer interactions can be larger in media with similar polarity to the porogenic solvent. This fact is due to MIPs molecular recognition mechanism. The polymer particle concentration was investigated in the MIPs formulations including nonpolar vehicle. It was demonstrated that the increase of polymer concentration reduces nicotine release rate in the formulations. Permeation profiles were studied for 48 h indicating that significant amounts of nicotine can cross the skin structure according Higuchi kinetic model. Important advantages were demonstrated using MIPs for nicotine transdermal delivery. The release rate using MIPs in transdermal formulations was slower than that using NIPs. Moreover, the standard relative deviations observed in MIPs formulations were lower than that observed in NIPs formulations. In this work it was possible to demonstrate that MIPs can offer controlled release matrices for nicotine transdermal delivery.

Keywords: Nicotine; MIP; Transdermal drug delivery.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	–	Nível de significância
AIBN	–	2,2-azobisisobutironitrila
AMA	–	Ácido metacrílico
C ₁₈	–	Sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilano
CDV	–	Calorimetria diferencial de varredura
CLAE	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>D</i>	–	Coeficiente de difusão
DAD	–	Arranjo de diodos
DPR	–	Desvio padrão relativo
<i>E</i>	–	Exatidão
EDGMA	–	Etilenoglicol dimetacrilato
FDA	–	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>k'</i>	–	Fator de retenção
<i>K</i>	–	Coeficiente de partição
<i>log_{Kow}</i>	–	Logaritmo do coeficiente de partição <i>n</i> -octanol/água
ICH	–	<i>International Conference of Harmonization</i>
IV	–	Infravermelho
LQ	–	Limite de quantificação
MEV	–	Microscopia eletrônica de varredura
MF	–	Monômero funcional
MIP	–	Polímero impresso molecularmente
MISPE	–	Extração em fase sólida empregando polímero impresso molecularmente
MM	–	Molécula molde
N	–	Número de pratos teóricos
NIP	–	Polímero não-impresso molecularmente (polímero controle)
pH	–	Potencial de hidrogênio
<i>pK_a</i>	–	Logaritmo da constante de dissociação ácida
PTFE	–	Politetrafluoretileno
PVA	–	Polímero de álcool polivinílico
<i>r</i>	–	Coeficiente de correlação
<i>R</i>	–	Porcentagem de recuperação
RAM	–	Material de acesso restrito
RAM-MIP	–	Material impresso de acesso restrito
rpm	–	Rotação por minuto
SPE	–	Extração em fase sólida
<i>t lag</i>	–	<i>lag time</i> ou tempo de latência
TG	–	Termogravimetria
USP/NF	–	<i>United States Pharmacopeia/ National Formulary</i>
UV	–	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura da pele humana	16
Figura 2 -	Estrutura dos principais tipos de patches transdérmicos	20
Figura 3 -	Representação da célula de difusão vertical	24
Figura 4 -	Estrutura química e ionização da molécula de nicotina (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ , Peso molecular = 162,23 g.mol ⁻¹ ; CAS no. 54-11-5) .	26
Figura 5 -	Síntese de MIPs	36
Figura 6 -	Estrutura química do ácido metacrílico (a) e do 4-vinil piridina (b)	37
Figura 7 -	Cromatogramas de branco, meio receptor que permaneceu em contato com pele de orelha de porco (A) e, solução padrão de nicotina na concentração de 150,0 µg.mL ⁻¹ , que permaneceu em contato com pele de orelha de porco (B)	61
Figura 8 -	Representação da curva de calibração da nicotina analisada por CLAE	62
Figura 9 -	Estrutura química do EDGMA (A), AMA (B) e possíveis ligações covalentes estabelecidas entre os monômeros (C)	65
Figura 10 -	Interações hipotéticas fármaco-polímero nas cavidades impressas	66
Figura 11 -	Espectros de absorção na região do IV do AMA (A) e da nicotina (B)	67
Figura 12 -	Espectros de absorção na região do IV do MIP sem carregamento (A) e do MIP carregado com nicotina (B)	69
Figura 13 -	Espectros de absorção na região IV do NIP sem carregamento (A) e do NIP carregado com nicotina (B)	69
Figura 14 -	Curvas de aquecimento obtidas por CDV para a nicotina, MIP e mistura binária de MIP e nicotina nas proporções de 1:1 (p/p) ...	72
Figura 15 -	Curvas de aquecimento obtidas por CDV para a nicotina, NIP e mistura binária de NIP e nicotina nas proporções de 1:1 (p/p) ...	72
Figura 16 -	Curvas termogravimétricas obtidas para a nicotina, MIP e mistura binária de MIP e nicotina nas proporções de 1:1 (p/p) ...	73

Figura 17 -	Curvas termogravimétricas obtidas para a nicotina, NIP e mistura binária de NIP e nicotina nas proporções de 1:1 (p/p) ...	73
Figura 18 -	Imagem das partículas de NIP obtida por MEV (Aumento de 100 X)	76
Figura 19 -	Imagem da das partículas de MIP obtida por MEV (Aumento de 100 X)	76
Figura 20 -	Adsorção da nicotina nas matrizes poliméricas (MIP e NIP) em meio solvente de baixa polaridade (diclorometano)	78
Figura 21 -	Perfil de liberação da nicotina a partir de formulações preparadas em veículos de diferentes polaridades. As quantidades liberadas estão expressas em porcentagem (%). A Figura 21(a) apresenta os resultados obtidos para as formulações 1A e 1B preparadas em veículo hidrofílico e a Figura 21(b) apresenta os resultados obtidos para as formulações 2A e 2B preparadas em veículo lipofílico, n=3	80
Figura 22 -	Resultados de liberação da nicotina a partir das formulações 1A, 1B, 2A e 2B ao modelo cinético de Higuchi	82
Figura 23 -	Perfil de liberação da nicotina a partir das formulações 3A (MIP), 3B (NIP), 4A (MIP) e 4B (NIP), n=3. As quantidades liberadas estão expressas em porcentagem (%)	85
Figura 24 -	Perfil de permeação cutânea da nicotina a partir das formulações 2A e 2B (n=3) e das formulações 4A e 4B (n=5). As quantidades liberadas estão expressas porcentagem (%)	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Formulações avaliadas quanto à liberação de nicotina	55
Tabela 2 -	Resultados de adequação do sistema cromatográfico, n=6	60
Tabela 3 -	Resultados obtidos na determinação da precisão do método analítico para determinação da nicotina	62
Tabela 4 -	Resultados obtidos na determinação da exatidão do método analítico para determinação da nicotina	63
Tabela 5 -	Resultados obtidos na determinação da recuperação da nicotina a partir da pele de orelha de porco, n=3	63
Tabela 6 -	Estabilidade da nicotina no meio receptor, n=3	64
Tabela 7 -	Principais bandas de absorção observadas na região do IV identificadas para a nicotina e para o AMA	67
Tabela 8 -	Principais bandas de absorção na região do IV identificadas para os copolímeros sintetizados (MIP e controle) sem carregamento e carregados com nicotina	68
Tabela 9 -	Parâmetros calculados a partir das isotermas de Langmuir e Freundlich para a adsorção de nicotina em matrizes poliméricas (MIP e NIP)	79
Tabela 10 -	Coefficiente de correlação determinado para diferentes modelos cinéticos para as curvas de liberação da nicotina em formulações preparadas em diferentes veículos	81
Tabela 11 -	Fluxo de liberação da nicotina ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1/2}$), a partir de formulações em diferentes veículos, seguindo o modelo de Higuchi	81
Tabela 12 -	Quantidades liberadas de nicotina, a partir de dispersões do fármaco a 5% (p/p) em diferentes veículos e formulações preparadas em diferentes veículos	83
Tabela 13 -	Parâmetros cinéticos da curva de liberação da nicotina, a partir de formulações com diferentes razões polímero/ fármaco, determinados conforme o modelo de Higuchi	85
Tabela 14 -	Parâmetros cinéticos da curva de permeação cutânea da nicotina, seguindo o modelo de Higuchi	87
Tabela 15 -	Quantidade de nicotina retida na estrutura da pele de orelha de porco após 48 horas	89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA	16
2.1.1	Transporte de fármacos através da pele	16
2.1.2	Estrutura dos dispositivos transdérmicos	19
2.1.3	Ensaio de liberação e permeação cutânea <i>in vitro</i> usando a célula de difusão vertical	23
2.2	NICOTINA	26
2.2.1	Características físico-químicas	26
2.2.2	Farmacologia e importância clínica	27
2.2.3	Dispositivos transdérmicos para liberação de nicotina	29
2.2.4	Desenvolvimento de sistemas para liberação de nicotina	30
2.3	POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE	35
2.3.1	Fundamentos teóricos	35
2.3.2	Nicotina como molécula molde	38
2.3.3	MIPs como sistemas de liberação de fármacos	40
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	MATERIAIS	44
4.1.1	Padrões, reagentes e solventes	44
4.1.2	Equipamentos e acessórios	45
4.2	MÉTODOS	46
4.2.1	Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para determinação de nicotina em estudos <i>in vitro</i> de liberação e permeação cutânea	46
4.2.1.1	Desenvolvimento de método analítico por CLAE para determinação de nicotina	46
4.2.1.2	Condições definidas para determinação de nicotina por CLAE	47

4.2.1.3	Validação do método analítico por CLAE para determinação de nicotina	47
4.2.2	Síntese e caracterização das partículas de MIPs	51
4.2.2.1	Síntese do MIP e preparo das partículas poliméricas	51
4.2.2.2	Lavagem das partículas poliméricas	52
4.2.2.3	Caracterização do MIP por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	52
4.2.2.4	Caracterização do MIP por análise térmica	52
4.2.2.5	Caracterização do MIP por microscopia eletrônica de varredura	53
4.2.2.6	Isotermas de adsorção da nicotina	53
4.2.3	Desenvolvimento e avaliação das formulações	54
4.2.3.1	Formulações	54
4.2.3.2	Estudos de liberação <i>in vitro</i> da nicotina	55
4.2.3.3	Estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i> da nicotina	56
4.2.3.4	Avaliação da cinética de liberação e permeação cutânea <i>in vitro</i> da nicotina	57
4.2.3.5	Avaliação da retenção cutânea da nicotina	58
4.2.4	Análise estatística	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DE NICOTINA EM ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA	59
5.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS MIPs	64
5.2.1	Síntese dos polímeros impressos	64
5.2.2	Caracterização do MIP por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	66
5.2.3	Caracterização do MIP por análise térmica	71
5.2.4	Caracterização do MIP por microscopia eletrônica de varredura	75
5.2.5	Isotermas de adsorção da nicotina	77
5.3	DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	80
5.3.1	Estudos de liberação <i>in vitro</i> da nicotina	80
5.3.2	Estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i> da nicotina	86

5.3.3	Avaliação da retenção cutânea da nicotina	89
5.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
6	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação transdérmica consistem em dispositivos aplicados diretamente na pele para liberação do fármaco de modo a alcançar efeitos terapêuticos sistêmicos. Para alcançar a corrente sanguínea, o fármaco deve passar pelo processo de permeação cutânea, o que ocorre como uma interação entre o fármaco, a formulação e a pele. Geralmente, a permeabilidade do fármaco através do estrato córneo da pele é o fator limitante da velocidade de absorção cutânea de fármacos (BARRY, 2001; VALENTA; AUNER, 2004; MAGHABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

Apesar da função de barreira da pele, que representa o maior desafio na prática clínica para o sucesso da terapia transdérmica, a utilização desta rota de administração de fármacos pode apresentar diversas vantagens como:

- Ser uma alternativa segura em relação à via oral para fármacos que apresentam baixa biodisponibilidade devido à absorção irregular no trato gastrointestinal; ao metabolismo hepático de primeira-passagem; ao tempo de meia-vida plasmática curto, com intervalos reduzidos entre doses;
- Ser uma alternativa às injeções hipodérmicas, evitando o uso de uma via invasiva, com administração dolorosa e exposição do paciente a riscos;
- Permitir a liberação controlada e/ou prolongada do fármaco, evitando oscilações nas concentrações plasmáticas e reduzindo a incidência de efeitos indesejáveis associados a picos de concentração;
- Poder aumentar a adesão do paciente ao tratamento pela facilidade de utilização e, se necessário, interromper a administração do fármaco pela simples remoção do dispositivo (BARRY, 2001; PRAUSNITZ; LANGER, 2008).

A nicotina pode ser considerada a molécula modelo da terapia transdérmica, uma vez que possui todas as características favoráveis para atravessar facilmente a estrutura da pele. Dispositivos transdérmicos para liberação de nicotina são

amplamente comercializados como auxiliares na terapia de abandono do fumo, proporcionando absorção sistêmica do fármaco e alívio dos sintomas relacionados à abstinência da nicotina. Em geral, *patches* transdérmicos de nicotina regulam a velocidade de liberação do fármaco por até 24 horas após a aplicação, sendo difícil selecionar materiais compatíveis com a molécula para desenvolver sistemas que consigam reter a nicotina na formulação pelo tempo indicado para o uso (BAKER; KOCHINKE; HUANG, 1990; GORE; CHIEN, 1998; BARRY, 2001; DAVARAN et al, 2005).

Atualmente, buscam-se novas estratégias no desenvolvimento de dispositivos transdérmicos mais eficientes. Diversos avanços foram alcançados na permeação cutânea de fármacos com diferentes tamanhos moleculares e propriedades físico-químicas. Tais avanços foram em grande parte devido ao emprego de promotores físicos e químicos de penetração cutânea. Entretanto, além de estudar a promoção da penetração cutânea, existe muito interesse em estudar tecnologias que também possam permitir maior controle da velocidade da liberação do fármaco a partir de um dispositivo transdérmico (KALIA; GUY, 2001; MOSER et al, 2001; MAGHABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; PRAUSNITZ; LANGER, 2008).

Entre as novas tecnologias a serem exploradas, têm-se discutido o emprego dos polímeros impressos molecularmente (MIPs) como sistemas de liberação controlada de fármacos. A aplicação dos MIPs constitui uma ferramenta bem desenvolvida na área analítica, principalmente no que se refere à separação e quantificação de diferentes substâncias, como fármacos e moléculas bioativas, presentes em matrizes de complexidade variável. Os MIPs são dotados de sítios de maior seletividade e afinidade a uma molécula modelo (geralmente um fármaco), sendo possível que interações fármaco/polímero sejam estabelecidas quando estes materiais são aplicados em sistemas de liberação, permitindo sustentar e/ou modificar a liberação do fármaco a partir da formulação (BYRNE; PARK; PEPPAS, 2002; ALVAREZ-LORENZO; COCHEIRO, 2004; SELLERGREN; ALLENDER, 2005; CUNLIFFE; KIRBY; ALEXANDER, 2005).

Até o presente momento não foi descrito na literatura estudos empregando MIPs em sistemas para liberação transdérmica de nicotina. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar um sistema para liberação transdérmica do tipo matricial contendo MIPs como estratégia para controlar a velocidade de liberação da nicotina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA

2.1.1 Transporte de fármacos através da pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, com uma área superficial de cerca de dois metros quadrados em adultos. É um órgão com múltiplas camadas que tem a função essencial de proteger o corpo do meio externo, sendo uma barreira eficiente para evitar a absorção de moléculas exógenas (GODIN; TOUITOU, 2007).

A estrutura da pele é basicamente formada pela epiderme e derme. A Figura 1 apresenta a estrutura simplificada da pele humana.

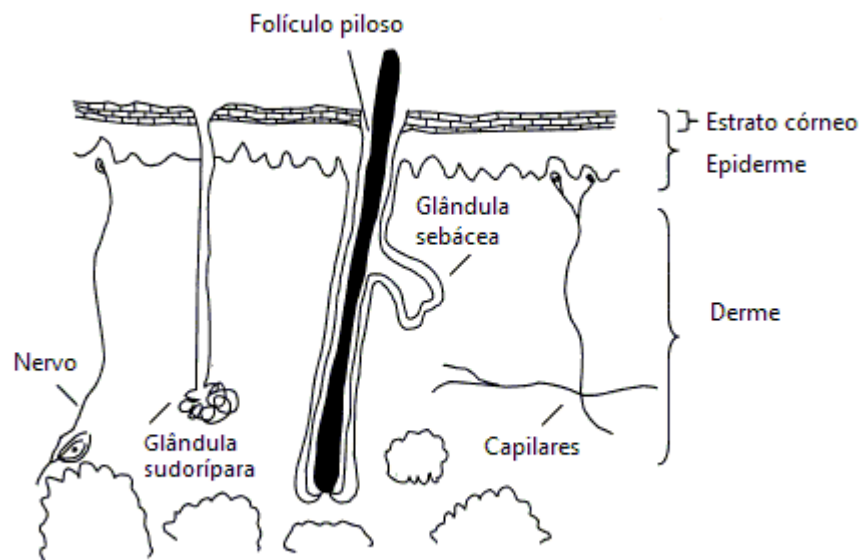


Figura 1 - Estrutura da pele humana.
Fonte: MOSER et al (2001, p. 104).

A derme possui entre 3 e 5 mm de espessura, tendo como composição uma mistura de proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e um gel interfibrilar de glicosaminoglicanas, sais e água. Vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas estão embebidos na derme. Os folículos pilosos e os dutos das glândulas sudoríparas se abrem diretamente para o meio externo da superfície da pele (MOSER et al, 2001; MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; CEVC; VIERL, 2010).

A epiderme não possui vascularização e os nutrientes precisam se difundir da junção dermo-epidérmica para manter sua viabilidade. A epiderme tem uma estrutura de cinco camadas que representam os diferentes estágios de diferenciação celular. A sequência de camadas, de dentro para fora, são o estrato germinativo (camada basal), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo. Excluindo-se a camada córnea, mais externa, tem-se a epiderme denominada viável (MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

As células do estrato córneo são densas, funcionalmente mortas, anucleadas e preenchidas com queratina, sendo denominadas corneócitos. O conteúdo intercelular é composto por uma mistura lipídica de ceramidas, colesterol, ésteres de colesterol, ácidos graxos e uma pequena fração de sulfato de colesterol, que formam diversas bicamadas ao redor dos corneócitos. O arranjo do estrato córneo é análogo a uma parede de “tijolos e cimento”, com os corneócitos representados como os tijolos e os lipídeos intercelulares como o cimento (MOSER et al, 2001; GODIN; TOUITOU, 2007).

Devido às suas características de barreira e impermeabilidade, o estrato córneo torna-se a camada limitante da velocidade de permeação da maior parte das moléculas através da pele. O estrato córneo contém de 15 a 20 camadas de corneócitos e quando seco tem espessura de 10 a 15 μm . Quando hidratado, o estrato córneo incha e a sua espessura pode alcançar até 40 μm , tornando-se mais permeável (BARRY, 2001, MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; CEVC; VIERL, 2010).

Conforme Kalia e Guy (2001), pode-se considerar a liberação e o transporte de um fármaco a partir de uma formulação transdérmica aplicada na superfície da pele como um processo que compreende várias etapas, descritas a seguir: a) dissolução e liberação do fármaco a partir da formulação; b) partição do fármaco para o estrato córneo; c) difusão do fármaco através do estrato córneo,

principalmente pelos lipídeos intercelulares; d) partição do estrato córneo para a epiderme viável aquosa; e) difusão através da epiderme viável para dentro da derme superior e, por fim, f) absorção para a rede capilar local e eventualmente para a circulação sistêmica.

A escolha do fármaco candidato à aplicação transdérmica é baseada em vários fatores, principalmente as propriedades físico-químicas da molécula, suas interações com a membrana e propriedades farmacocinéticas. As propriedades físico-químicas ideais de uma molécula para penetrar no estrato córneo são: baixo peso molecular, em geral, menor que 600 Da, em que o valor de D tende a ser elevado; solubilidade adequada em lipídeos e água, de tal forma que o gradiente de concentração, que direciona a força de difusão, seja elevado; um valor de K alto mas balanceado, pois um valor de K muito grande pode inibir o *clearance* pelos tecidos viáveis, sendo geralmente recomendável um $\log K \sim 2$; baixo ponto de fusão (< 200 °C), correlacionando com boa solubilidade como predito pela teoria da solubilidade ideal (BARRY, 2001; KALIA; GUY, 2001; FARAHMAND; MAIBACH, 2009).

As rotas de permeação cutânea através da pele incluem o transporte pela epiderme e através dos apêndices da pele, principalmente os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas, que formam um caminho alternativo à epiderme intacta. Entretanto, os apêndices da pele representam somente 0,1% da superfície total da pele humana e a contribuição desta rota é considerada pequena. Recentemente, assumiu-se que apesar da rota por meio dos apêndices da pele contribuir pouco para o fluxo da maioria dos fármacos no estado estacionário, esta rota pode ter uma contribuição significativa na permeação de grandes moléculas polares e íons. Em relação ao transporte através da epiderme intacta, duas rotas principais podem ser identificadas: a rota intercelular, por meio dos lipídeos do estrato córneo, e a rota transcelular, através dos corneócitos. Em ambos os casos, o fármaco deve se difundir através dos lipídeos da matriz intercelular, o que é reconhecidamente o maior fator determinante da velocidade do transporte de moléculas através da pele (BARRY, 2001; MOSER et al, 2001).

De acordo com Godin e Touitou (2007), o processo de difusão do fármaco através de uma membrana pode ser descrito matematicamente pela lei da difusão de Fick. Neste caso, assume-se que a difusão passiva é um processo de transferência de massas de solutos individuais, dirigidos por movimentos

moleculares aleatórios e a velocidade do transporte pode ser descrita pela Equação 1:

$$dC/dt = K \times D \times C_0/h \quad (\text{Equação 1}), \text{ em que:}$$

dC/dt é a taxa de transferência por unidade de área de superfície (fluxo), K , é o coeficiente de partição, D , é o coeficiente de difusão, C_0 , é a concentração no compartimento doador, e h , é a espessura da membrana.

A velocidade de permeação de uma molécula no estado estacionário pode então ser medida, de acordo com a Equação 1, como a sua difusão a partir do compartimento doador, atravessando a pele, em direção ao compartimento receptor, e, sendo apresentada como a quantidade de fármaco permeada em função do tempo. Entretanto, enquanto este procedimento resulta em um coeficiente de permeabilidade (Kp , que é um parâmetro composto, $K \times D/h$), uma maior separação da difusão e partição requer a determinação do tempo de latência (t_{lag}), que é obtido pela extrapolação da inclinação do estado estacionário na sua intersecção com o eixo x:

$$t_{lag} = h^2/6 \times D \quad (\text{Equação 2})$$

Conforme a Equação 2, o valor de D pode ser estimado, desde que h seja conhecido (BARRY, 2001; MOSER et al, 2001).

2.1.2 Estrutura dos dispositivos transdérmicos

Os dispositivos transdérmicos ou *patches* podem ser classificados em três categorias principais: a) o dispositivo do tipo fármaco disperso em adesivo, em que o fármaco está incorporado diretamente na camada adesiva, b) o dispositivo matricial ou monolítico, em que o fármaco encontra-se incorporado em uma matriz, geralmente polimérica, e c) os dispositivos com reservatório e membrana reguladora da velocidade de liberação. Apesar destes três tipos de dispositivos apresentarem diferenças na estrutura do sistema de liberação, pode-se afirmar que

necessariamente todos os tipos possuem partes comuns, no caso: uma camada destacável, uma camada posterior, geralmente oclusiva, e uma camada de material adesivo (WALTERS; BRAIN, 2002; WOKOVICH et al, 2006).

A Figura 2 apresenta a estrutura dos principais tipos de *patches* transdérmicos.

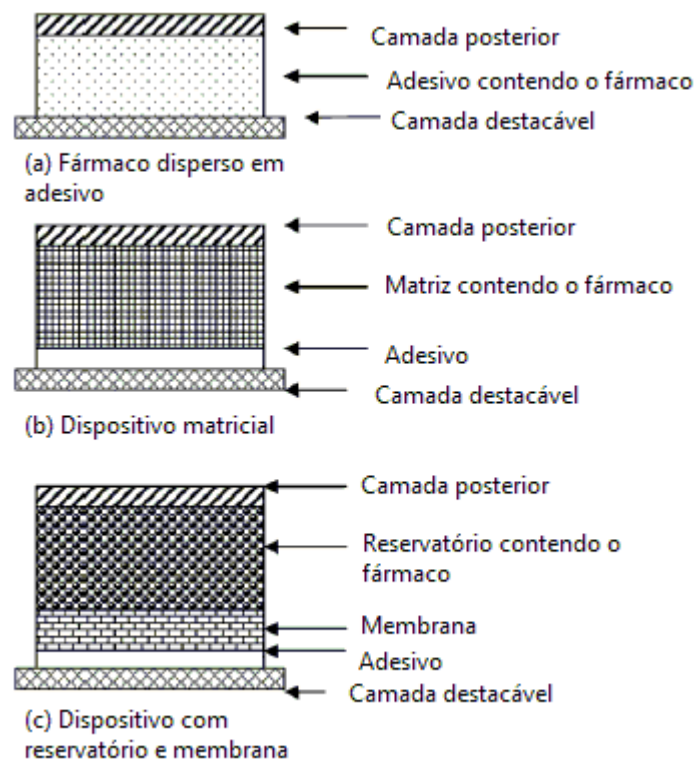


Figura 2 - Estrutura dos principais tipos de *patches* transdérmicos.
Fonte: FARAHMAND; MAIBACH (2009, p. 8).

A camada destacável deve ser impermeável ao fármaco e aos excipientes, sendo removida pelo paciente imediatamente antes do uso do *patch*, expondo a camada de adesivo. Geralmente, utilizam-se no preparo da camada destacável materiais como papel revestido, folhas de papel alumínio e copolímeros de etileno vinil acetato. A camada posterior também deve ser impermeável ao fármaco e a outros componentes da formulação, bem como deve ajustar o dispositivo à pele e dar sustentação ao mesmo. Para *patches* pequenos, usam-se materiais oclusivos

como polietilenos, poliéster e poliuretano, de modo a oferecer resistência à perda de água e permitir maior hidratação do estrato córneo. Entretanto, para *patches* maiores, para uso por tempo prolongado, a transmissão de vapor de água em uma pequena proporção é desejável, sendo empregados filmes menos oclusivos, como cloreto de polivinila. A camada adesiva, por outro lado, deve ser permeável ao fármaco, biocompatível e assegurar a fixação do dispositivo na pele. Adesivos sensíveis à pressão são os mais usados, como adesivos acrílicos, adesivos baseados em siliconas ou poliisobutileno (VENKATRAMAN; GALE, 1998; WALTERS; BRAIN, 2002; WOKOVICH et al, 2006; FARAHMAND; MAIBACH, 2009).

O sistema do tipo reservatório e membrana evita o contato direto do fármaco com a pele. A membrana semipermeável é incorporada no sistema para controlar a velocidade de liberação do fármaco a partir do reservatório. Na maioria dos casos, as membranas são preparadas com copolímeros de etileno vinil acetato, siliconas e polietileno de alta densidade. O controle do fluxo do fármaco depende do tamanho e da tortuosidade dos poros, no caso de membranas microporosas, ou da dissolução e difusão do fármaco em membranas poliméricas densas (WALTERS; BRAIN, 2002; WOKOVICH et al, 2006).

O compartimento reservatório pode conter o fármaco na forma de solução, gel, suspensão ou disperso em uma matriz polimérica. Juntamente ao fármaco, promotores químicos podem ser incorporados, como etanol, propilenoglicol, ácido oléico, azona, dimetilsulfóxido, miristato de isopropila, 2-pirrolidona, *N*-metil-2-pirrolidona e lauril sulfato de sódio. Estes promotores químicos atuam nos lipídeos do estrato córneo bem como nas camadas inferiores da derme de modo a aumentar a permeabilidade do tecido de modo reversível (FARAHMAND; MAIBACH, 2009).

Geralmente, durante o período de liberação, o sistema reservatório pode permitir uma cinética de liberação de ordem zero. Para isso, é necessário que durante o período de utilização desejado, o material do reservatório fique saturado com o fármaco, o que é possível pela formulação de uma suspensão do fármaco (WALTERS; BRAIN, 2002).

Sistemas que incluem reservatórios são principalmente desenvolvidos para aumentar o controle da velocidade de permeação devido ao sistema de liberação, reduzindo a influência da pele neste processo. Na teoria, este tipo de sistema seria vantajoso, pois poderia reduzir a variabilidade farmacocinética interindividual se a liberação do sistema fosse inferior (devido à membrana limitante) à capacidade de

absorção do fármaco através da pele. Porém, na prática, sistemas controlados por membrana podem ter uma contribuição menor no controle do fluxo do fármaco. Isto é explicado porque ocorre partição do fármaco para o adesivo durante o tempo de estocagem, havendo uma liberação maior do fármaco nas primeiras horas de aplicação. Este fenômeno é descrito como efeito *burst* e pode reduzir o *lag time*, caso o *patch* seja projetado para regular a velocidade de permeação. Caso a pele seja a barreira limitante da velocidade de permeação, o que ocorre em alguns casos, o efeito *burst* associado com a difusão do fármaco pela membrana é pouco significativo. Na maioria dos dispositivos utilizados na prática clínica, observa-se que o fluxo do fármaco medido é resultado da combinação dos efeitos da pele e do dispositivo (KALIA; GUY, 2001; FARAHMAND; MAIBACH, 2009).

Nos sistemas matriciais, o fármaco é disperso ou dissolvido uniformemente em uma matriz polimérica natural ou sintética, a partir da qual se difunde para a superfície da pele. Polivinil pirrolidona, poliuretanos, acetato de polivinila, PVA e derivados de celulose estão entre as matrizes poliméricas mais utilizadas. O processo de liberação neste caso depende da solubilização do fármaco na matriz e sua posterior difusão a partir da matriz para a superfície da pele. Sendo assim, muitas variáveis podem influenciar a velocidade de dissolução e difusão do fármaco, tornando-se difícil prever a cinética de liberação durante o desenvolvimento das formulações, o que deve ser avaliado experimentalmente. Para a liberação ocorrer segundo uma cinética de ordem zero, o fármaco deve ser mantido próximo à saturação na fase fluida da matriz, e a sua velocidade de difusão a partir da matriz deve ser maior do que a velocidade de difusão através da pele, de modo semelhante ao que ocorre no sistema do tipo reservatório com membrana (WALTERS; BRAIN, 2002; VALENTA, AUNER, 2004; FARAHMAND; MAIBACH, 2009).

Na maioria dos casos, a liberação do fármaco a partir do dispositivo transdérmico matricial segue uma cinética de Higuchi, representada pela quantidade do fármaco liberado em função da raiz quadrada do tempo (KALIA, GUY, 2001).

2.1.3 Ensaios de liberação e permeação cutânea *in vitro* usando a célula de difusão vertical

Os métodos *in vitro* são de grande importância devido à maior simplicidade dos protocolos em relação às avaliações *in vivo* e também devido ao elevado controle preciso das variáveis experimentais pelo investigador. Em pesquisa e desenvolvimento, as células de difusão são amplamente usadas para avaliar *in vitro* a liberação e permeação cutânea de fármacos a partir de formulações semi-sólidas e no desenvolvimento de sistemas de liberação transdérmica. O maior objetivo destas avaliações reside em compreender as principais alterações na formulação farmacêutica que podem alterar a biodisponibilidade *in vivo* do fármaco (LEWIS et al, 1997; SHAH et al, 2006; GODIN; TOUITOU, 2007; CEVC; VIERL, 2010; HANSON, 2010).

O trabalho pioneiro neste campo foi desenvolvido por T.J. Franz em 1970, o que levou à configuração básica do aparato experimental, constituído de uma célula com dois compartimentos: a) O compartimento doador, para aplicação da formulação, geralmente sobre uma membrana pela qual o fármaco deve permear, e b) um compartimento receptor, em que amostras do fármaco difundido e solubilizado no meio receptor podem ser coletadas em diferentes tempos e analisadas (SHAH et al, 2006; HANSON, 2010).

A célula de difusão vertical é uma modificação da célula original de Franz, utilizada do mesmo modo para avaliação da liberação e permeação cutânea de fármacos a partir de géis, cremes, pomadas e *patches* transdérmicos (HANSON, 2010). A célula de difusão vertical está apresentada na Figura 3.

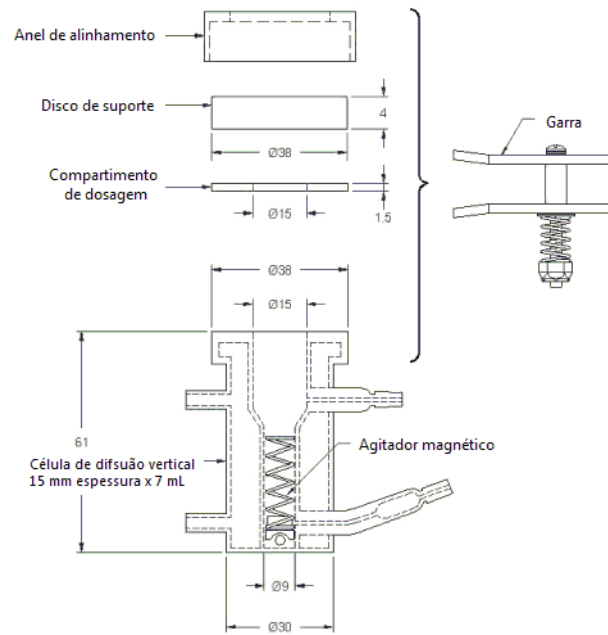


Figura 3 - Representação da célula de difusão vertical.
 Fonte: PHARMACOPEIAL FORUM (2009, p.2).

Nos últimos anos, estudos empregando a célula de difusão passaram a ganhar maior importância. Em 1997, o FDA publicou um guia recomendando a célula de difusão vertical para avaliar alterações pós-registro em formulações tópicas, bem como alterações relacionadas à mudança de escala de produção. Em 2009, a USP/NF propôs por meio do *Pharmacopeial Forum*, o texto de um capítulo (*General Chapter <725> Topical and Transdermal Drug Products: Performance Tests*) a ser avaliado para inclusão nas próximas edições do compêndio, abordando ensaios de liberação de produtos tópicos e transdérmicos usando a célula de difusão vertical.

Para realização dos experimentos em célula de difusão, geralmente o meio receptor é mantido a $32,0 \pm 1,0$ °C (temperatura da superfície da pele) sob agitação magnética constante. É necessário que o meio receptor utilizado no estudo assegure condições *sink*, ou seja, a concentração do fármaco no meio não deve ser maior do que 10 % da sua concentração de saturação. A manutenção de condições *sink* é importante de modo a evitar que a concentração do fármaco no meio receptor influencie artificialmente a velocidade de liberação. Meios aquosos, como soluções tampão, são os mais relevantes neste caso. O uso de aditivos no meio receptor

pode ser necessário para aumentar a solubilidade do fármaco, porém não devem comprometer a integridade da membrana nem alterar as características de permeabilidade do fármaco através da mesma. Para quantificação do fármaco no meio deve se empregar métodos analíticos apropriados a esta finalidade, sendo geralmente usada a cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE (SIEWERT; DRESSMAN; SHAH, 2003; AZARMI; ROA; LOBENBERG, 2007; PHARMACOPEIAL FORUM, 2009).

Estudos para determinar a liberação do fármaco são geralmente realizados utilizando membranas altamente permeáveis, que funcionam como um suporte para a formulação, porém permitindo o contato com o meio receptor. As membranas empregadas, como as constituídas de derivados de celulose, oferecem baixa resistência difusional e não devem interferir na velocidade de liberação do fármaco (SIEWERT; DRESSMAN; SHAH, 2003; AZARMI; ROA; LOBENBERG, 2007; PHARMACOPEIAL FORUM, 2009).

Para avaliar a absorção transdérmica de uma molécula (permeação cutânea) *in vitro*, a pele humana é o modelo mais relevante. Entretanto, a disponibilidade deste tipo de pele é limitada e modelos animais são frequentemente usados. Vários modelos animais de pele são empregados para substituir a pele humana, como peles dissecadas de primatas, porcos, ratos, camundongos, cobaias e cobras (MOSER et al, 2001).

Conforme Godin e Touitou (2007), a pele da orelha suína é particularmente bem apropriada para estudos de permeação, com resultados comparáveis aos estudos utilizando pele humana. Estudos examinando a espessura de várias camadas de pele mostraram que o estrato córneo da pele de orelha de porcos tem espessura de 21-26 μm , o que é semelhante à pele humana. A espessura da epiderme viável da orelha de porcos é de 66-72 μm , bastante similar à humana com cerca de 70 μm . A estrutura folicular também é parecida, com pêlos estendendo-se profundamente na derme. Uma média de 20 pêlos por cm^2 da orelha de porcos é comparável a 14-32 pêlos em humanos. Ainda mais, a anatomia vascular e o arranjo das fibras de colágeno na derme, bem como o conteúdo de glicosíngolípídeos e ceramidas são similares em humanos e porcos domésticos.

2.2 NICOTINA

2.2.1 Características físico-químicas

A nicotina, 3-(1-metil-2-pirrolinidil) piridina, é um alcalóide extraído das folhas do tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). É uma base volátil, disponível no estado líquido, com coloração amarelo pálido, higroscópica, bastante solúvel em água, etanol, clorofórmio e óleos, que se torna acastanhada e adquire o odor de tabaco quando exposta ao ar (BENOWITZ; HUKANNEN; JACOB III, 2009; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011).

De acordo com sua estrutura química, apresentada na Figura 4, a nicotina é uma amina terciária e aromática com caráter anfifílico ($\log K_{ow} = 1,17$) que possui dois grupamentos ionizáveis, uma piridina e um anel pirrolidona, com valores de pK_a de, respectivamente, 3,04 e 7,84. A densidade da nicotina líquida é de $1,010 \text{ g.mL}^{-1}$ a 20°C (NAIR et al, 1997; FARAHMAND; MAIBACH, 2009; P ONGJANYAKUL; SUKSRI, 2010; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011).

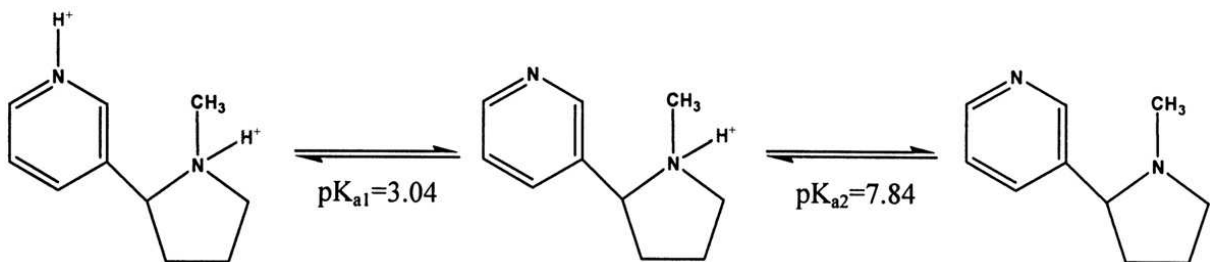


Figura 4 – Estrutura química e ionização da molécula de nicotina ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$, Peso molecular = $162,23 \text{ g.mol}^{-1}$; CAS no. 54-11-5).

Fonte: PONGJANYAKUL, KHUNAWATTANAKUL, PUTTIPIPATKHACHORN (2009, p. 243).

Existem dois enantiômeros da nicotina, o isômero ativo *S*-nicotina, correspondente a forma levógira (-), presente no tabaco, com maior afinidade de ligação pelos receptores colinérgicos nicotínicos, e o isômero *R*-nicotina, forma dextrógira (+), não encontrada na natureza, sendo somente um fraco agonista

destes receptores. Durante o ato de fumar, pode haver alguma racemização da molécula, com exposição do fumante a pequenas quantidades de *R*-nicotina (ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998).

2.2.2 Farmacologia e importância clínica

A nicotina tem considerável importância clínica em virtude de sua toxicidade, presença no tabaco e tendência a produzir dependência nos usuários. O fármaco atua nos receptores colinérgicos nicotínicos que são encontrados no cérebro, gânglios autônomos e junções neuromusculares. A variação na estrutura e função dos receptores nicotínicos ajuda a explicar a diversidade dos efeitos da molécula, relacionados à liberação de vários neurotransmissores como serotonina, acetilcolina, beta endorfina, entre outros. A dependência à nicotina e o seu efeito fisiológico de recompensa são fortemente ligados à liberação de dopamina, porém a liberação de outros neurotransmissores pode contribuir com este efeito (ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998; BENOWITZ; HUKANNEN; JACOB III, 2009).

A nicotina é usada como agente terapêutico em muitas formas farmacêuticas como *patches* transdérmicos, *sprays* nasais, inaladores, comprimidos sublinguais e gomas de mascar, todos indicados como auxiliar na terapia para cessação do tabagismo e diminuição do desejo de fumar. Outras aplicações para esta molécula vêm sendo estudadas, tais como o seu papel na doença de Alzheimer, doença de Parkinson e colite ulcerativa (WILSON et al, 1995; CHENG et al, 2002; WHITE; LEVIN, 2004; BENOWITZ; HUKANNEN; JACOB III, 2009).

Em geral, a absorção da nicotina pode ser rápida na pele e mucosas devido às características da molécula favoráveis à permeação, porém existe uma dependência do pH do tecido e do pH do sistema de liberação. Por exemplo, na forma ionizada, em meios ácidos, a nicotina apresenta menor capacidade de atravessar membranas. Enquanto isso, em pH alcalino, a forma molecular do fármaco é rápida e extensamente absorvida (LEWIS et al, 1997; NAIR et al, 1997; ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998; GORE; CHIEN, 1998; TYNDALE; SELLERS, 2001; OLIVIER; RABOUAN; COUET, 2003; BENOWITZ; HUKANNEN; JACOB III, 2009).

Formulações de *sprays* nasais proporcionam a absorção mais rápida da nicotina, alcançando picos plasmáticos em cerca de 10 minutos após a aplicação. As gomas de mascar, contendo de 2 a 4 mg de nicotina, produzem um perfil plasmático caracterizado por absorção mais lenta, alcançando um pico plasmático em torno de 30 minutos, porém a absorção do fármaco através da mucosa bucal é incompleta e irregular. Na maioria dos estudos clínicos, formulações de gomas de mascar apresentam elevada variabilidade interindividual (NAIR et al 1997; NIAURA et al, 2005; SHIFFMAN et al, 2009).

Os níveis plasmáticos de nicotina em fumantes variam durante o dia na faixa de 10 a 37 ng.mL⁻¹, com picos plasmáticos entre 19 e 50 ng.mL⁻¹. O aumento na concentração de nicotina após o fumo de um cigarro varia de 5 a 30 ng.mL⁻¹, dependendo do modo como o cigarro é fumado. As concentrações alcançadas durante o uso de *sprays* nasais, inaladores, comprimidos sublinguais e gomas de mascar variam de 10 a 15 ng.mL⁻¹. Considera-se que a ligação da nicotina à proteínas plasmáticas é baixa, em torno de 5%, e o volume de distribuição do fármaco é de aproximadamente 2,6 L.kg⁻¹ (BENOWITZ; HUKANNEN; JACOB III, 2009; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011).

Gupta e colaboradores (1993) avaliaram a farmacocinética absoluta da nicotina em voluntários humanos após uma infusão intravenosa contínua de bitartarato de nicotina dihidratado na forma deuterada (0,2 µg.min⁻¹.kg⁻¹). Os autores determinaram que pelo modelo monocompartimental, a meia-vida de eliminação da molécula de nicotina por infusão intravenosa foi de 2,0 horas, com *clearance* de 80,3 L.h⁻¹ (± 29%). A área sobre a curva para a administração de infusão intravenosa determinada até o infinito (AUC_{0-∞}) foi de 299 ng/mL.h⁻¹. Estima-se que somente 5 a 10% deste valor corresponda a contribuição do *clearance* renal do fármaco, sendo o metabolismo da nicotina predominantemente hepático. Cerca de 70 % do fármaco biotransformado é convertido a cotinina por via oxidativa do citocromo P450 isoenzima CYP2A6.

É importante mencionar que a biodisponibilidade oral da nicotina é de cerca de 20 a 35 %, principalmente devido ao alto metabolismo de primeira passagem. Em relação à toxicidade da molécula, a dose letal de nicotina em adultos encontra-se na faixa entre 40 e 60 mg, sendo que concentrações sanguíneas maiores que 5 µg.mL⁻¹ podem ser fatais (BENOWITZ; HUKANNEN; JACOB III, 2009; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011).

2.2.3 Dispositivos transdérmicos para liberação de nicotina

Nos Estados Unidos, o FDA aprovou no início dos anos 90 quatro diferentes dispositivos transdérmicos contendo nicotina em diferentes dosagens (Nicoderm®, Habitrol®, Prostep®, Nicotrol®). Estes dispositivos são produzidos com diferentes materiais e tecnologias, sendo indicados para utilização por 16 a 24 horas, com doses liberadas de 7 a 21 mg em 24 horas. Para liberar uma dose menor de nicotina, os fabricantes realizam a diminuição da área do dispositivo transdérmico sem alterar as características da formulação (GORE; CHIEN, 1998; DEVEAUGH-GEISS et al, 2010).

O tratamento consiste na aplicação diária de um adesivo transdérmico durante 4-8 semanas, a fim de fornecer uma dose ajustada ao nível de dependência. A partir da dose inicial é realizada a redução gradual da dose diária de nicotina a cada 2-4 semanas, utilizando um adesivo transdérmico menor (OLIVIER; RABOUAN; COUET, 2003).

Dos sistemas aprovados, o Nicoderm® (fabricado pela ALZA Corporation e comercializado no Brasil com o nome comercial NiQuitin®) é caracterizado como um dispositivo do tipo reservatório e membrana, sendo esperado um perfil de liberação linear ou ordem zero. Entretanto, ocorre acúmulo de nicotina na camada adesiva durante a estocagem, sendo que durante o início do processo de liberação pode-se esperar uma cinética de Higuchi. O perfil de liberação dos outros três produtos é expresso como cinética de Higuchi, característico da difusão a partir da matriz polimérica (GORE; CHIEN, 1998; DEVEAUGH-GEISS et al, 2010). Entre os dispositivos matriciais, pode-se mencionar o Habitrol® (fabricado pela Novartis Consumer Health Inc e comercializado no Brasil com o nome comercial Nicotinell®), que inclui no conteúdo uma de solução de nicotina e copolímero de ácido metacrílico dispersa em um disco de algodão e viscose, sobre o qual é incluída uma camada de material adesivo (LEWIS et al, 1997)

Apesar dos estudos de liberação demonstrar que os *patches* comerciais apresentam uma cinética de Higuchi, pode-se esperar que durante os estudos de permeação cutânea os dispositivos apresentem uma cinética de ordem zero. Isto é explicado devido ao efeito de barreira da pele, que em alguma extensão regula o

fluxo da nicotina apesar da elevada permeabilidade da molécula (OLIVIER; RABOUAN; COUET, 2003).

Para os *patches* transdérmicos, a liberação inicial da nicotina é lenta, alcançando um *steady-state* após cerca de 4 horas com manutenção de concentrações plasmáticas dentro da faixa terapêutica por até 24 horas (ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998; GORE; CHIEN, 1998; TYNDALE; SELLERS, 2001).

A velocidade de liberação da nicotina e as concentrações plasmáticas alcançadas utilizando dispositivos transdérmicos podem ser muito variáveis entre diferentes fabricantes, com biodisponibilidade variável de 68 a 98% (em relação à quantidade absorvida do total de fármaco liberado). Em geral, existe um *lag time* de aproximadamente 1 hora antes de a nicotina alcançar a corrente sanguínea, e a absorção sistêmica pode continuar após a remoção do dispositivo, o que se deve a quantidade residual de fármaco retido na estrutura da pele. As reações adversas mais citadas relacionadas ao uso transdérmico de nicotina são irritação local, coceira e eritema. Todas estas reações são citadas como brandas ou moderadas e, na maioria dos casos, dependentes da concentração de nicotina no dispositivo transdérmico (GUPTA et al, 1993; WOLF; TUZUN; TUZUN, 1998).

Durante a terapia de reposição de nicotina, os níveis plasmáticos tendem a ser menores do que as concentrações plasmáticas em fumantes. No estado estacionário, as concentrações plasmáticas de nicotina alcançadas usando *patches* variam de 10 a 20 ng.mL⁻¹, conforme a dose de nicotina liberada a partir do dispositivo (BENOWITZ; HUKANNEN; JACOB III, 2009).

2.2.4 Desenvolvimento de sistemas para liberação de nicotina

Na literatura, diversos estudos abordaram o desenvolvimento e a avaliação de sistemas para liberação de nicotina.

Hwang et al (1997) estudaram a utilização de pró-lipossomos como sistemas de liberação transdérmica de nicotina sob condições oclusivas. Os autores prepararam uma solução de nicotina e lecitina em clorofórmio e, em seguida, incorporaram partículas porosas de sorbitol à solução obtida. A mistura foi seca sob vácuo e liofilizada. Estudos de liberação foram realizados pelo método da pá sobre

disco mantendo a formulação em uma membrana de celulose empregada para diálise. Os resultados indicaram uma liberação mais lenta para as formulações de pró-lipossomas em relação ao controle contendo somente nicotina (aplicado diretamente na membrana de diálise). Estudos de permeação através da pele do abdômen de ratos foram realizados em célula de difusão por um período de 8 horas. O fluxo da nicotina controle (fármaco aplicado diretamente na pele) foi inicialmente maior do que aos dos pró-lipossomas, porém a diferença entre os fluxos diminuíram após cerca de 4 horas.

Conaghey et al (1998) avaliaram partículas de resina de troca iônica contendo grupamentos carboxílicos para administração transdérmica de nicotina. As partículas de resina foram carregadas com o fármaco e incorporadas em um gel de ágar 4%. Os ensaios de liberação foram realizados em célula de difusão de Franz com membrana de diálise, enquanto que para os estudos de permeação empregou-se pele humana. A liberação da nicotina a partir das partículas foi dependente da força iônica da solução e caracterizada como um processo de difusão da nicotina a partir da matriz. Os estudos de permeação indicaram dificuldade em liberar a nicotina na superfície da pele devido à dependência de íons para ocorrer a liberação do fármaco, dependente de um mecanismo de troca iônica, resultando em baixos fluxos da nicotina e inviabilizando a aplicação deste tipo de sistema em dispositivos transdérmicos em que ocorre a difusão passiva da molécula. Os autores sugeriram a utilização desta tecnologia combinada à iontoforese.

Davaran et al (2005) propuseram o desenvolvimento de um sistema para liberação transdérmica prolongada da nicotina. O sistema proposto baseava-se em um reservatório de gel de carbopol contendo propilenoglicol, complexos de inclusão β -ciclodextrina-nicotina e uma membrana reguladora da velocidade de liberação constituída de polímero de PVA. Os autores ressaltaram que o PVA foi selecionado devido à capacidade de resistência do polímero à degradação química causada pela nicotina, uma vez que este problema é relatado na literatura como uma limitação para produção de dispositivos transdérmicos contendo o fármaco. Estudos de permeação cutânea usando pele de rato demonstraram que as formulações obtidas permitiram a liberação controlada da nicotina por 48 horas e também exerceram grande efeito na regulação do fluxo de nicotina através da pele em comparação com controles de soluções aquosas de nicotina. A regulação da velocidade nos

dispositivos foi principalmente controlada devido à dissociação da nicotina a partir dos complexos de inclusão com β -ciclodextrinas.

Tirnaksiz e Yuce (2005) elaboraram um dispositivo transdérmico com reservatório de gel de carbopol e uma membrana de polietileno para regular a velocidade de liberação da nicotina. Inicialmente, avaliou-se a permeação da nicotina em célula de difusão através da membrana de polietileno, obtendo-se uma cinética de ordem zero. Em seguida, preparam-se os dispositivos transdérmicos avaliando o efeito da adição de propilenoglicol no reservatório. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que as formulações contendo propilenoglicol no reservatório apresentaram um perfil de liberação mais rápido do que as formulações com reservatório sem propilenoglicol. A liberação do fármaco a partir das formulações foi avaliada por um período de 24 horas.

Singh et al (2006) realizaram um estudo para formulação de um implante cerebral para liberação controlada e prolongada de nicotina para tratamento da doença de Alzheimer. Inicialmente, formulações de micropartículas porosas de polímeros biodegradáveis de ácido láctico e copolímero de ácido láctico e glicólico foram desenvolvidas para incorporação da nicotina. Os estudos de liberação demonstraram um efeito *burst*, com liberação rápida do fármaco em aproximadamente 30 minutos. Deste modo, os autores propuseram a reincorporação das partículas com polímeros aniônicos (pectina e alginato de sódio). Os resultados esperados não foram alcançados no trabalho, pois conforme os resultados dos estudos de liberação, as formulações alcançaram um platô após aproximadamente 2 horas de teste.

Rosenberg e colaboradores (2008) estudaram a liberação da nicotina e da cafeína, selecionadas como moléculas hidrofílicas, a partir de uma matriz polimérica de poli(caprolactona). Estudos de liberação foram realizados em 100 mL de tampão fosfato isotônico a 37°C pelo período de até 25 dias. Conforme os resultados apresentados, a liberação de ambas as moléculas, avaliadas em separado, indicaram um perfil de Higuchi. A liberação da cafeína foi mais lenta, sendo que o total da carga de cafeína foi liberado em 25 dias, enquanto que a carga total de nicotina foi liberada em torno de 9 dias. É importante ressaltar que neste trabalho, apesar da avaliação por longos períodos de tempo, a carga de nicotina liberada no primeiro dia foi superior a 60%, evidenciando um efeito *burst* considerável e

comprometendo a eficiência da aplicação desta tecnologia como sistema para liberação controlada.

Choonara et al (2009) propuseram um sistema para sustentar a liberação da nicotina pelo período de vários dias no tratamento da doença de Parkinson. A formulação foi elaborada como um implante biocompatível para liberação do fármaco no sistema nervoso central. Os autores incorporaram a nicotina aos polímeros hidroxietilcelulose e alginato. Em seguida, realizou-se a compressão dos polímeros em uma matriz de copolímero de ácido láctico e glicólico de modo a prolongar a liberação. Os estudos de liberação, realizados em um sistema montado pelos autores empregando fluido cérebro-espinal como meio, demonstraram uma liberação oscilante da nicotina por até 21 dias.

Pongjanyakul e colaboradores (2009) estudaram a liberação da nicotina a partir de complexos com silicatos de alumínio e magnésio, analisados como carreadores para o fármaco em sistemas de liberação. A nicotina foi adsorvida com sucesso nas partículas de silicato em diferentes valores de pH, sendo este comportamento devidamente caracterizado. O perfil de liberação das partículas carregadas foi avaliado em água e tampão fosfato pH 6,0 usando o aparato 2 da USP a 50 rpm. Os resultados indicaram que a maior porção de nicotina adsorvida nas partículas de silicato foi rapidamente liberada devido a um efeito *burst* na liberação. No meio de liberação pH 6,0 aproximadamente 70% da carga de nicotina foi liberada nos primeiros minutos, enquanto 90% do total de fármaco foi liberado em 6 horas. Deste modo, os autores puderam demonstrar que a adsorção da nicotina nas partículas poderia aumentar a estabilidade da molécula, porém os resultados indicaram que as partículas não apresentavam grande potencial intrínseco para controlar a liberação da nicotina, sugerindo deste modo que o material poderia ser aplicado em sistemas de liberação como um reservatório para o fármaco ou como carreador da nicotina.

Pongjanyakul e Suksri (2009) avaliaram a inclusão dos complexos de nicotina e silicatos de alumínio e magnésio em filmes do polímero aniônico alginato de sódio para liberação bucal de nicotina. Para isso, foram preparadas dispersões de nicotina, partículas de silicatos de alumínio e magnésio e alginato de sódio. O alginato de sódio é um polímero extraído de algas e devido às suas características de não-toxicidade foi usado como formador de filmes. Também foram preparadas dispersões controle sem a inclusão das partículas de silicatos. As dispersões foram

preparadas em diferentes valores de pH (5, 7 e 10, respectivamente), em que a nicotina encontrava-se em diferentes formas ionizadas. Conforme os resultados, em pH 5 a nicotina encontra-se predominantemente ionizada na forma monoprótica, podendo ser adsorvida em maior extensão nas partículas de silicato devido à interações eletrostáticas. Assim, as partículas incorporadas nos filmes de alginato interagiram com a nicotina formando microreservatórios para o fármaco. Estudos de liberação e permeação foram realizados em célula de difusão, sendo que a velocidade de liberação a partir dos filmes contendo as partículas de silicato foi menor do que a preparação controle, com liberação controlada pelo mecanismo de difusão a partir da matriz, demonstrando grande potencial para a aplicação do sistema de liberação proposto.

Wu et al (2010) estudaram formulações transdérmicas contendo uma membrana com nanotubos de carbono funcionalizados com grupamentos aniônicos para liberação controlada de nicotina. A liberação do fármaco ocorreu a partir de um reservatório contendo um gel de hidroxietilcelulose a 2% e foi regulada pela membrana com nanotubos de carbono. Neste caso, os autores realizaram estudos em uma célula de difusão acoplada a eletrodos que aplicavam pequenas correntes elétricas na membrana. Quando nenhuma corrente foi aplicada (0 mV), a liberação ocorreu lentamente devido ao estabelecimento de um fluxo eletroosmótico da nicotina através da membrana. Em seguida, correntes elétricas foram aplicadas (-600 mV), sendo estabelecido um fluxo eletroforético do fármaco e permitindo a modulação da velocidade de liberação.

Suksaeree et al (2011) propuseram o desenvolvimento e caracterização de *patches* transdérmicos de nicotina preparados com uma matriz polimérica de látex de borracha, extraída da planta *Hevea brasiliensis*. O látex de borracha foi misturado com solução aquosa de nicotina, hidroxipropil metilcelulose (15%) e dibutilftalato (10%). A mistura foi vertida sobre a camada posterior e colocada em estufa a 70 °C por 4 horas. Adicionou-se por fim uma camada de adesivo (solução de éster poliacrílico a 80%). A concentração final de nicotina nos filmes preparados foi de 2,5 mg.cm⁻². Os autores também investigaram cinco diferentes tipos de camadas posteriores, com diferentes propriedades oclusivas. Para isso, utilizou-se a célula de difusão para realizar estudos de liberação, com o dispositivo em contato direto com o meio receptor. Estudos de permeação cutânea foram realizados no mesmo aparato utilizando pele de porcos. Os resultados encontrados demonstraram que os

patches desenvolvidos sustentaram a liberação da nicotina por até 24 horas, com liberação seguindo uma cinética de primeira ordem e permeação conforme uma cinética de zero ordem. Também demonstraram que os filmes com maior caráter oclusivo, quando usados como camada posterior, permitiram a liberação de maior quantidade de nicotina, devido à maior hidratação do dispositivo e da pele.

2.3 POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE

2.3.1 Fundamentos teóricos

A impressão molecular é uma tecnologia capaz de produzir polímeros dotados de sítios seletivos de reconhecimento, estereoquimicamente moldados a partir de uma molécula molde (MM), por exemplo, um fármaco ou uma molécula de interesse analítico (WHITCOMBE; VULFSON, 2001).

A síntese dos MIPs ocorre após a formação de um complexo entre os monômeros funcionais (MFs) e a MM em um solvente orgânico, denominado porogênico, na ausência de água. É esperado que as terminações ligantes dos MFs se posicionem em pontos complementares àqueles provenientes da MM, formando complexos. Em seguida, adiciona-se ao meio reacional o agente de ligação cruzada e o iniciador radicalar. O iniciador radicalar, induzido por radiação UV ou calor, é decomposto em radicais livres, que iniciam e propagam a reação de polimerização entre os MFs e o agente de ligação cruzada. Após o final da reação, a MM pode ser completamente removida dos polímeros em ciclos de lavagem com solventes apropriados. Deste modo, o material preparado é constituído por redes poliméricas macroscópicas não-lineares (copolímeros de monômero funcional e agente de ligação cruzada) com elevado número de ligações cruzadas, o que confere ao MIP as propriedades de insolubilidade, rigidez e alta estabilidade mecânica para um sítio de ligação impresso. Os sítios de ligação ou cavidades impressas são dotados de capacidade de reconhecimento molecular, podendo interagir com seletividade e afinidade à MM mesmo na presença de uma série de análogos estruturais (WHITCOMBE; VULFSON, 2001; CORMACK, ELORZA, 2004).

A síntese dos MIPs está esquematizada na Figura 5.

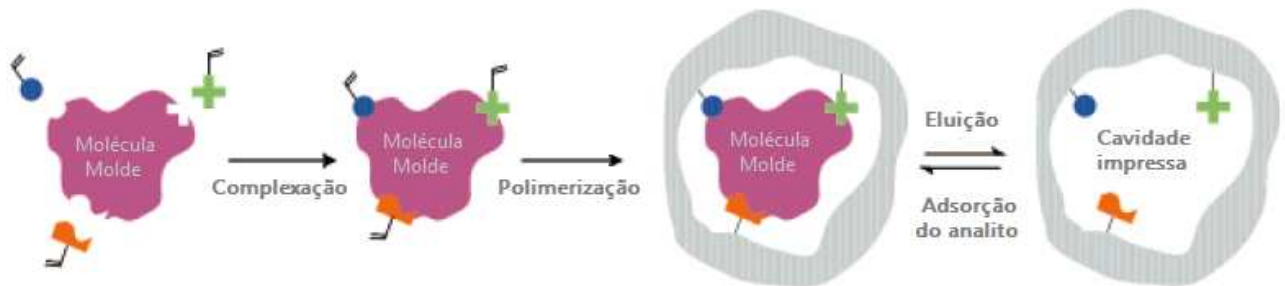


Figura 5 – Síntese de MIPs.
Fonte: WHITCOMBE; VULFSON (2001, p. 467).

É recomendável a remoção do oxigênio antes do início da reação de polimerização. O oxigênio retarda a reação de polimerização devido à formação de radicais livres secundários e pode prejudicar a reprodutibilidade lote-a-lote das polimerizações. Para remover o oxigênio dissolvido, pode ser utilizado ultrasonificação da mistura reacional ou purga com um gás inerte, como nitrogênio ou argônio (CORMACK; ELORZA, 2004).

A seleção dos MFs é baseada na natureza do analito. Assim sendo, analitos que possuem grupos básicos interagem mais facilmente com monômeros que contenham grupos ácidos, como o ácido metacrílico. Em contrapartida, monômeros com caráter básico, como o 4-vinilpiridina, interagem preferencialmente com analitos ácidos. Ainda, como a interação analito-monômero é governada por um processo de equilíbrio, quantidades superiores do monômero em relação ao analito (geralmente 4:1) devem ser empregadas com intuito de deslocar o equilíbrio, para formar maior quantidade de “complexos analitos-monômeros” (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

As estruturas químicas dos MFs, ácido metacrílico e 4-vinil piridina, estão apresentadas na Figura 6.

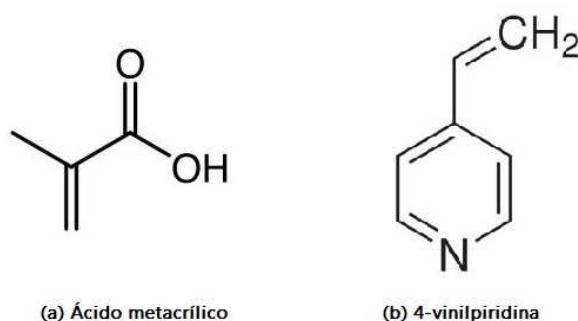


Figura 6 – Estrutura química do ácido metacrílico (a) e do 4-vinil piridina (b).

Entre as estratégias de síntese, pode-se citar a síntese por polimerização em *bulk*, realizado com menores volumes de solvente porogênico. Ao final do processo, uma massa polimérica monolítica é obtida. O monólito então é devidamente moído e peneirado até um tamanho de partícula padronizado com morfologia irregular. Esta estratégia é bastante empregada em química analítica, para obtenção de sorventes impressos para extração em fase sólida, denominados como MISPE (ANDERSSON, 2000; CHAPUIS et al, 2004; SHI et al, 2006).

Outra estratégia também descrita com freqüência é a síntese de polímeros por precipitação, realizada com maiores volumes de solvente. Nessa síntese, as partículas poliméricas são prontamente formadas durante a etapa de síntese, possuindo formato esférico e tamanho micrométrico de maior uniformidade. Na maioria das vezes, as partículas obtidas são usadas para fins analíticos, como fase estacionária para colunas cromatográficas de CLAE (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005; NAKAMURA et al, 2005).

Com relação às interações MM/polímero, aparece com maior a freqüência na literatura, estudos utilizando MIPs preparados por métodos não-covalentes, em que o analito pode ser facilmente removido da matriz polimérica pelo rompimento de ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, pareamento iônico e interações hidrofóbicas. A re-ligação do analito no polímero pode ser realizada da mesma maneira por interações não-covalentes. Entre as vantagens deste procedimento cita-se a versatilidade da técnica, o que torna possível a síntese de MIPs para uma grande variedade de moléculas. Entretanto, em geral, os sítios obtidos nesse tipo de síntese são heterogêneos, apresentando uma variação na afinidade e seletividade

do analito pelo polímero (UMPLEBY II et al, 2004; CUNLIFFE; KIRBY; ALEXANDER, 2005).

A síntese por métodos covalentes é descrita com menor frequência na literatura. Para remover a MM do polímero é necessário clivar ligações covalentes por meio de reações de hidrólise. A força das ligações covalentes nesse caso depende dos reagentes monoméricos empregados (CUNLIFFE; KIRBY; ALEXANDER, 2005).

2.3.2 Nicotina como molécula molde

Na literatura, a nicotina foi empregada em diversos estudos como MM na síntese de MIPs. Estes polímeros foram utilizados para diferentes aplicações na área analítica, conforme descrito a seguir:

Tan et al (2001) empregaram MIPs para construção de sensores para determinação de nicotina em plasma e urina humana. O polímero foi sintetizado pelo método *bulk* com 10 mL de diclorometano (solvente porogênico), 4,0 mmol de ácido metacrílico (MF), 20,0 mmol de EDGMA (agente de ligação cruzada), 1,0 mmol de nicotina (MM) e 0,31 mmol de AIBN (iniciador radicalar). O sistema foi montado a 65°C e mantido por 24 horas. O monólito foi moído e partículas menores que 25 µm foram coletadas e lavadas com metanol, ácido acético, clorofórmio e etanol. O MIP foi usado para recobrir a superfície de um eletrodo de prata, sendo que um NIP foi preparado da mesma maneira como sensor referência. A resposta do sensor impresso molecularmente foi maior para a nicotina do que para análogos estruturais (cotinina e miosmina) e superior à resposta do sensor referência. O sensor mostrou-se apropriado para determinação de nicotina com seletividade e sensibilidade em fluidos biológicos. O limite de detecção estabelecido foi de $2,5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$.

Sambe et al (2006) prepararam partículas de MIP entre 3 a 4 µm pela técnica de precipitação. O material foi usado como fase estacionária para CLAE, realizando a separação enantiosseletiva da nicotina e extração da molécula a partir do tabaco. O polímero foi sintetizado em 128 mL de uma mistura de acetonitrila:tolueno (3:1) como solvente porogênico, 6,0 mmol de ácido metacrílico ou ácido 2-trifluorometilacrílico (MF), 28,8 mmol de divinilbenzeno (agente de ligação cruzada), 1,5

mmol de S-nicotina (MM) e 1,9 mmol de AIBN (iniciador radicalar). O sistema foi montado a 60°C com agitação de 16 rpm e mantido por até 48 horas. As partículas impressas apresentaram resultados satisfatórios, permitindo a separação enantiosseletiva da S-nicotina.

Yang et al (2007) desenvolveram uma metodologia para determinação de nicotina em cabelo, com preparo de amostra por MISPE e análise por CLAE. A metodologia foi aplicada para determinar a exposição de humanos à fumaça do tabaco. O polímero foi sintetizado usando 5,6 mL de diclorometano (solvente porogênico), 4,0 mmol de ácido metacrílico (MF), 20,0 mmol de EDGMA (agente de ligação cruzada), 1,0 mmol de nicotina (MM) e 0,24 mmol de AIBN (iniciador radicalar). O sistema foi montado a 60°C e mantido por 24 horas. O monólito foi moído e partículas entre 25-36 µm foram coletadas e lavadas com metanol e ácido acético. Utilizando a mesma metodologia, os autores sintetizaram o NIP, porém na ausência de nicotina. Cartuchos de MISPE foram preparados com 200 mg de material (MIP ou NIP) e a metodologia de preparo de amostras foi otimizada. Conforme os resultados, o MIP apresentou maior capacidade de adsorção da nicotina em relação ao NIP, além de capacidade de reconhecimento seletivo à nicotina na presença de cotinina. Além disso, os autores demonstraram que os cromatogramas obtidos empregando MISPE apresentaram menor interferência de componentes da matriz do que utilizando técnicas de extração líquido-líquido ou SPE com fase octadecilsilano.

Figueiredo et al (2009) propuseram uma metodologia para determinação espectrofotométrica de nicotina na urina de fumantes usando MISPE *on-line*. A síntese do polímero foi realizada conforme o trabalho de Tan et al (2001) apresentado anteriormente nesta seção. O método apresentou resultados satisfatórios, com seletividade e sensibilidade à nicotina. Os autores ainda realizaram um estudo comparativo com metodologia empregando CLAE, mostrando outras vantagens do sistema espectrofotométrico proposto, como facilidade de preparo das amostras e custo reduzido.

Wu e colaboradores (2009) realizaram a determinação amperométrica da nicotina em plasma de suínos utilizando um eletrodo de dióxido de titânio modificado com MIPs. A impressão molecular foi realizada diretamente no colóide de dióxido de titânio presente na superfície do eletrodo. Utilizando o mesmo procedimento, preparou-se um eletrodo não impresso que exibiu uma sensibilidade menor que o

eletrodo impresso. A razão da sensibilidade entre os eletrodos impresso e não impresso foi de 1,24. Ainda mais, o eletrodo impresso apresentou seletividade razoável, permitindo a distinção entre nicotina e cotinina.

2.3.3 MIPs como sistemas de liberação de fármacos

Polímeros de origem natural ou sintética têm notável importância na indústria farmacêutica no encapsulamento de fármacos e formação de filmes, protegendo quimicamente a molécula durante a sua passagem pelo trato gastrintestinal até o momento da liberação, e como matrizes para liberação do fármaco em diversos tipos de sistemas de liberação controlada (SUEDEE et al, 2010).

Os polímeros em geral podem ser aplicados de diferentes formas em formulações transdérmicas, sendo de grande interesse o desenvolvimento e avaliação de sistemas poliméricos inovadores. Recentemente, pode-se relatar grande interesse em avaliar os MIPs como estratégia para a liberação controlada de fármacos. Devido às propriedades apresentadas por estes polímeros, dotados de sítios de maior seletividade e afinidade a uma molécula modelo, presente durante a etapa de síntese do polímero, surgiu o interesse em avaliar as interações do tipo fármaco/polímero impresso em sistemas de liberação, de modo a delinear sistemas para liberação controlada e sistema para liberação enantiosseletiva de fármacos (ALVAREZ-LORENZO; COCHEIRO, 2004; VALENTA; AUNER, 2004; SELLERGREN; ALLENDER, 2005; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

É importante ressaltar que os monômeros frequentemente empregados para síntese de MIPs são utilizados em produtos alimentícios e na indústria farmacêutica para produção de formulações de uso oral, apresentando biocompatibilidade e não-toxicidade. Podem-se citar como exemplos os copolímeros de ácido metacrílico, denominados comercialmente como Eudragit®, e os polímeros de etilenoglicol, ambos produzidos com monômeros e comumente empregados na síntese de MIPs e que são aplicados em uma larga variedade de formulações para uso oral e tópico (JANTARAT et al,2008).

Apesar da aplicação de polímeros impressos em formulações farmacêuticas ser um tema ainda pouco explorado na literatura, alguns trabalhos apresentaram

resultados interessantes ao avaliar MIPs como sistemas de liberação de fármacos, conforme mencionados a seguir.

Entre os trabalhos pioneiros que fizeram avaliações prévias a respeito da viabilidade da aplicação da tecnologia dos MIPs em sistemas de liberação, pode-se remeter ao trabalho desenvolvido por Allender e colaboradores (2000). Os pesquisadores propuseram sistemas de liberação transdérmica do tipo fármaco em adesivo para o agente anti-hipertensivo propranolol. O propranolol e o MIP foram incorporados diretamente em um adesivo apolar e estudos de liberação foram realizados em célula de difusão de Franz. Os resultados do estudo de liberação dos MIPs, NIPs e controle do fármaco em adesivo (sem a matriz polimérica) sugeriram que o uso dos MIPs apresentou resultados promissores no controle da velocidade de liberação do fármaco, sendo que as quantidades liberadas foram menores que ao controle e aos sistemas empregando NIPs.

Bodhibukkana e colaboradores (2006) incorporaram partículas de MIP seletivas para propranolol em uma membrana porosa de celulose. Os autores evidenciaram a possibilidade de utilização da membrana celulósica com partículas impressas para liberação enantiosseletiva do S-propranolol, o enantiômero de maior interesse farmacêutico. De modo semelhante, Jantarat e colaboradores (2008) avaliaram o efeito associado a diferentes tamanhos e formas de partículas de MIP (grânulos, microesferas e nanopartículas) na otimização da liberação seletiva do enantiômero S-propranolol. Os autores demonstraram que a área superficial das partículas caracteriza um efeito importante nas características de liberação a partir das partículas poliméricas. Por fim, Suedee e colaboradores (2008) prepararam sistemas de liberação transdérmica seletivos para liberação de S-propranolol. Para isso, o MIP foi incorporado em membranas de celulose e uma mistura racêmica do fármaco foi mantida no sistema reservatório do tipo gel. Os dispositivos foram avaliados *in vitro* (liberação e permeação cutânea) e *in vivo* (perfil plasmático farmacocinético em ratos). Os estudos demonstraram resultados promissores com liberação enantiosseletiva predominante de S-propranolol.

Puoci et al (2009) propuseram a síntese de partículas de MIP usando paracetamol como MM e realizaram uma modificação superficial da superfície das partículas poliméricas. Para isso, o MIP foi sintetizado usando ácido metacrílico como MF, divinilbenzeno como agente de ligação cruzada, AIBN como iniciador radicalar e glicidilmetacrilato com função de comonômero. O sistema foi mantido em

agitação a 60 °C por 24 horas e, por fim, as partículas foram lavadas e secas. NIPs foram preparados da mesma forma. As partículas, em seguida, foram tratadas com ácido perclórico em um procedimento para abertura de anéis epóxido na estrutura do comonômero, o que formou o material impresso de acesso restrito, denominado RAM-MIP. O RAM-MIP é indicado para utilização em meios aquosos complexos, como fluidos biológicos, uma vez que a superfície modificada como RAM previne a adsorção inespecífica de proteínas e lipídeos na superfície polimérica, o que causa um efeito obstrutivo e reduz a propriedade de reconhecimento molecular do material. As partículas foram então expostas a uma solução de albumina sérica bovina, demonstrando que o material RAM-MIP adsorve menor quantidade de albumina (em torno de 5%), enquanto que as partículas de MIP adsorveram em torno de 60% do material protéico. Adicionalmente, a capacidade de *swelling* das partículas foi avaliada, sendo que o RAM-MIP, de maior caráter hidrofílico, absorveu aproximadamente 40% de água, enquanto o MIP absorveu somente cerca de 7%. Estudos de liberação foram realizados utilizando o aparato I da USP a 50 rpm em meio ácido clorídrico 0,1N por 2 horas e depois com ajuste de pH para 6,8 até o final do estudo. As partículas de RAM-MIP liberaram cerca de 60% da carga de paracetamol em 5 horas, enquanto o RAM-NIP liberou aproximadamente 90% do seu conteúdo neste mesmo tempo. Somente em 25 horas de estudo, o RAM-MIP liberou a quantidade total de fármaco carregado, demonstrando o efeito da impressão molecular nas características de liberação das partículas poliméricas.

Suedee et al (2010) propuseram um sistema de liberação enantiosseletiva de S-omeprazol em uma formulação contendo a mistura racêmica. Partículas de MIPs foram sintetizadas para realizar a liberação enantiosseletiva e incorporadas em um sistema de liberação sensível ao pH do meio. Para avaliar a liberação, estudos de liberação foram realizados com aparato I da USP a 50 rpm, com temperatura de 37°C. Três diferentes valores de pH do meio foram avaliados (1,2; 6,8 e 8,0). Os sistemas de liberação elaborados não liberaram o omeprazol em meio ácido, protegendo a molécula de um meio onde há instabilidade química para o fármaco, sendo que em meio alcalino (pH 6,8) iniciou-se a liberação. O material impresso proporcionou liberação de maior quantidade de S-omeprazol, enquanto que não se observou diferença significativa na liberação dos enantiômeros usando o NIP. Em pH 8,0, a velocidade de liberação aumentou, e a liberação enantiosseletiva foi mantida.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ O objetivo do trabalho foi desenvolver e caracterizar formulações empregando MIPs como matriz polimérica para a administração transdérmica de nicotina. Foi avaliada, por meio de estudos de liberação e permeação cutânea *in vitro*, a possibilidade das matrizes poliméricas impressas molecularmente fornecerem uma liberação controlada do fármaco, e, conseqüentemente, a possibilidade de aplicação desta tecnologia como sistemas de liberação de fármacos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE com detecção UV para análise de nicotina em estudos *in vitro*;
- ✓ Sintetizar e caracterizar partículas de MIP;
- ✓ Desenvolver formulações contendo MIPs para liberação transdérmica de nicotina;
- ✓ Avaliar a liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* da nicotina a partir das formulações desenvolvidas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Padrões, reagentes e solventes

- Acetonitrila grau HPLC JT Baker®
- Acido acético P.A. Vetec®
- Ácido metacrílico 99% Sigma-Aldrich®
- Ácido (orto) fosfórico 85% P.A. Vetec®
- Água ultra pura
- AIBN 98% Sigma-Aldrich®
- Brometo de potássio espectroscópico Vetec®
- Cloreto de potássio P.A. Vetec®
- Cloreto de sódio P.A. Vetec®
- Cotinina Sigma-Aldrich®
- Diclorometano grau HPLC JT Baker®
- EDGMA 98% Sigma-Aldrich®
- Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. Vetec®
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A. Vetec®
- Fosfato de sódio dibásico anidro P.A. Vetec®
- Hidróxido de sódio (lentilhas) P.A. Vetec®
- Metanol grau HPLC JT Baker®
- (-)-Nicotina $\geq 99,0\%$ (CG) base líquida Sigma-Aldrich®
- Nitrogênio 99,999% White Martins®
- Óleo mineral (vaselina líquida) Vetec®
- Propilenoglicol Vetec®
- Soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 Vetec®

4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético com chapa de aquecimento Marconi® modelo MA-085
- Agitador de tubos Marconi® modelo MA162
- Analisador termogravimétrico Exstar® TG/DTA 7000 series
- Banho ultrassom Unique®
- Balança analítica Kern® modelo 410
- Balança analítica Sartorius® modelo CP225D
- Balança semi-analítica Marte® modelo AL500C
- Bomba de vácuo Primatec®
- Calorímetro diferencial de varredura Mettler Toledo® modelo DSC 1 Stare System
- Centrífuga CELM® modelo LS-3 plus
- Célula de difusão vertical Hanson Research® com volume de 7,0 mL e área de difusão de 1,77 cm²
- Coluna cromatográfica C₁₈ Acqua (150,0 x 4,6 d.i.) mm 125 Å 5 µm Phenomenex®
- Pré-coluna C₁₈ Acqua (4,0 x 3,0 mm) Phenomenex®
- Espectrofotômetro duplo-feixe UV-visível Shimadzu® modelo UV-1601PC
- Espectrofotômetro infravermelho por transformada de Fourier Shimadzu® modelo Prestige-21
- Estufa de secagem e esterilização com circulação de ar Solab Científica®
- Filtro de seringa Millex® com membrana PTFE modificada para filtração de solventes aquosos e orgânicos 0,45 µm 13 mm não-estéril
- Homogeneizador de tecidos tipo TURRAX modelo MA102
- Medidor de pH Tecnopon® modelo mPA-210 MS
- Membrana porosa tubular de celulose regenerada Spectra/Por® com poros de 12-14 kDa
- Membrana para filtração de solventes aquosos e orgânicos Millipore® em PTFE modificado 0,45 µm
- Microscópio eletrônico de varredura Jeol LV-JSM 6360
- Papel de filtro quantitativo faixa azul Vetec® 11 cm

- Pipetador automático Kacil® de volume ajustável 100 - 1000 µL
- Pipetador automático Kacil® de volume ajustável 40 - 200 µL
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu® modelo 10 VP, com módulo de injeção automática, forno para coluna e sistema controlador. O equipamento foi acoplado com detector UV modelo SPD-10AVP e detector DAD modelo SPD-M10AVP
- Sistema Micropore® para filtração de solventes da fase móvel
- Sistema Micropore® para purificação de água por osmose reversa
- Tamises Bertel Metalúrgica® com abertura de malha de 200 e 150 *mesh* (respectivamente, 75 e 106 µm)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para determinação de nicotina em estudos *in vitro* de liberação e permeação cutânea

4.2.1.1 Desenvolvimento de método analítico por CLAE para determinação de nicotina

O método analítico para determinação da nicotina foi desenvolvida por CLAE em modo fase reversa empregando os detectores UV e DAD. Os parâmetros do método analítico (composição e vazão de fase móvel, seleção da coluna cromatográfica e do comprimento de onda para detecção) foram padronizados conforme avaliação da separação de interferentes da matriz (pele de orelha de porco) e cálculo dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico (tempo de retenção, k' , N e assimetria dos picos cromatográficos), determinados de acordo com a USP 35-NF 30 (2012).

4.2.1.2 Condições definidas para determinação de nicotina por CLAE

As condições definidas para determinação da nicotina foram coluna cromatográfica C₁₈ Acqua (150.0 x 4.6 d.i.) mm com partículas de 5 µm e 125 Å Phenomenex® utilizando pré-coluna C18 Acqua (4.0 x 3.0 mm) Phenomenex®, fase móvel tampão fosfato de potássio 10 mM contendo 0,2% de trietilamina e acetonitrila nas proporções de 81:19 (v/v). O pH da fase móvel foi ajustado para 6,9 com ácido fosfórico 85%. A vazão de fase móvel foi de 1,0 mL.min⁻¹, o volume de injeção de 50 µL, a temperatura do forno de 25°C e a detecção UV a 260 nm.

4.2.1.3 Validação do método analítico por CLAE para determinação de nicotina

O método analítico, nas condições descritas anteriormente no item 4.2.1, foi validado conforme o guia do ICH (2005) quanto aos parâmetros seletividade, linearidade, intervalo, limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão (intra e inter dias), recuperação e estabilidade da nicotina no meio receptor. Nos estudos de validação analítica, as soluções foram diluídas no meio receptor tampão fosfato pH 7,4.

✓ Preparo do meio receptor

O meio receptor tampão fosfato pH 7,4 utilizado nos estudos de liberação foi preparado pela diluição de 1,732 g de fosfato de sódio dibásico e 1,0 g of fosfato de potássio monobásico em 1000 mL de água ultra pura. O meio receptor isotônico foi utilizado nos estudos de permeação cutânea. Para isso, foram incluídos 8,0 g de cloreto de sódio e 0,2 g de cloreto de potássio para cada litro de tampão fosfato pH 7,4. Em todos os casos, o pH do meio receptor foi ajustado para 7,4 com ácido fosfórico 85% e filtrado em membrana de PTFE modificado 0,45 µm.

✓ Seletividade

Para avaliação da seletividade, soluções padrão de nicotina na concentração de $150,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, preparadas no meio receptor e soluções padrão de nicotina na mesma concentração que permaneceram em contato com pele de orelha de porco utilizada nos estudos de permeação cutânea foram injetadas no sistema cromatográfico. A pureza cromatográfica dos picos referentes à nicotina foi determinada por meio de varreduras espectrais na região do UV (200-370 nm) usando detector de DAD, sendo possível estabelecer o índice de similaridade espectral. As soluções diluentes foram analisadas na ausência de nicotina de modo a avaliar a eluição de possíveis interferentes no tempo de retenção da nicotina. A separação da nicotina e da cotinina também foi avaliada por meio da injeção de uma solução de nicotina e cotinina (principal metabólito da nicotina) preparadas no meio receptor, sendo calculada a resolução entre os picos.

✓ Linearidade e intervalo

A linearidade do método foi avaliada para demonstrar a relação de proporcionalidade entre a concentração das soluções padrão de nicotina e a área dos picos. Para isso, preparou-se solução padrão estoque de nicotina em metanol na concentração de $10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e diluições sucessivas foram realizadas no meio receptor de modo a obter soluções padrão nas concentrações de 0,5, 5, 10, 50, 100, 200 e $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo possível a determinação do coeficiente de correlação (r) e da equação de reta $y = ax + b$, em que a corresponde ao coeficiente angular (inclinação) e b representa o coeficiente linear (intercepto).

✓ Precisão e exatidão intra e inter dias

A precisão do método analítico foi determinada usando seis réplicas de soluções padrão de nicotina na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ preparada no meio receptor. As análises foram realizadas em três dias consecutivos.

A precisão intra e inter dias foi estabelecida como a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio e expressa matematicamente pelo desvio padrão relativo (*DPR*), apresentado na equação 1:

$$DPR = (\text{Desvio padrão} / \text{Média}) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

A exatidão do método analítico foi determinada usando três réplicas de soluções padrão de nicotina nas concentrações de 0,5, 50 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ preparadas no meio receptor. As análises foram realizadas em três dias consecutivos.

A exatidão intra e inter dias, apresentada como erro relativo (*E*), foi calculada pela equação 2, apresentada a seguir:

$$E = \frac{(\text{Concentração encontrada} - \text{Concentração teórica}) \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad (\text{Equação 2})$$

✓ LQ

A concentração de 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi estabelecida como o LQ da metodologia analítica, sendo o valor do LQ determinado experimentalmente quanto à precisão e exatidão.

✓ Recuperação da nicotina a partir de amostras de pele contaminadas

Para determinar a recuperação da nicotina a partir da pele de orelha de porco foi desenvolvida uma método para extração do fármaco a partir da estrutura da pele. O procedimento extrativo foi desenvolvido com objetivo de determinar a retenção cutânea do fármaco após os estudos de permeação. Deste modo, preparam-se amostras de fragmentos de pele de orelha de porco (1,8 cm^2) contaminados com quantidades conhecidas de nicotina de modo a estabelecer a recuperação do procedimento extrativo. Para isso, utilizou-se uma solução padrão de nicotina preparada em acetona (concentração de 1,0 mg.mL^{-1}). Três níveis de concentrações (0,1; 0,3 e 0,6 mg.cm^{-2}) foram preparados em triplicata. Alíquotas de solução padrão de nicotina foram aplicadas na superfície dos fragmentos de pele e os mesmos foram deixados em repouso por 1 hora de modo a garantir a penetração do fármaco

e a volatilização do solvente. As amostras contaminadas com quantidades conhecidas de nicotina foram transferidas para tubos de polietileno com tampa. Em seguida, realizou-se a adição de 10 mL de meio receptor (solução extratora) e 1 mL de acetonitrila para precipitação de proteínas. A mistura foi levada para homogeneizador de tecidos e triturada por 5 minutos e depois foi centrifugada a 3400 rpm durante 15 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi coletada, filtrada em filtro de seringa com membrana de PTFE modificada 0,45 µm e injetada no sistema cromatográfico. A porcentagem de recuperação (*R*) foi calculada conforme a Equação 3, apresentada a seguir:

$$R = \frac{\text{Concentração encontrada} \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad (\text{Equação 3})$$

Soluções branco de homogeneizado de pele foram preparados conforme o mesmo procedimento, porém na ausência de nicotina, de modo a avaliar a eluição de possíveis picos interferentes no mesmo tempo de retenção da nicotina.

✓ Estabilidade da nicotina no meio receptor

A estabilidade da nicotina no meio receptor foi determinada mantendo soluções padrão de nicotina na concentração de 50,0 µg.mL⁻¹ a temperatura ambiente. Análises foram realizadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas para quantificação do fármaco. Os ensaios foram realizados em triplicata. O valor inicial foi estabelecido como 100,0% e a variabilidade a partir do resultado inicial foi calculada a partir das determinações nos tempos seguintes.

4.2.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE MIPs

4.2.2.1 Síntese do MIP e preparo das partículas poliméricas

A metodologia de síntese do MIP foi adaptada do trabalho desenvolvido por Yang e colaboradores (2007). Para isso, foi montado um sistema de síntese e adicionados 6 mL de diclorometano (solvente porogênico), 1,0 mmol de nicotina (MM) e 4,0 mmol de AMA. A solução foi degaseificada em banho de ultrassom por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 20,0 mmol de EDGMA (agente de ligação cruzada) e 0,24 mmol de AIBN (iniciador radicalar). A solução obtida foi homogeneizada e colocada em banho de ultrassom por 10 minutos para garantir a solubilização da AIBN. Para remoção de oxigênio, a mistura foi purgada com nitrogênio por 5 minutos e depois o sistema de síntese foi vedado. O sistema de síntese foi mantido em banho aquecido a 60°C por 24 horas de modo a ocorrer a reação de polimerização. Após este tempo, uma massa sólida e monolítica de polímero foi obtida e depois pulverizada com auxílio de almofariz e pistilo. Para padronização do tamanho de partícula, o material pulverizado foi passado por tamises com abertura de malha de 75 e 106 µm. A fração de partículas entre 75-106 µm foi coletada para preparo das formulações e estudos de caracterização. Um polímero controle não-impresso (NIP) foi sintetizado e preparado conforme descrito para o polímero impresso, porém, na ausência de nicotina.

4.2.2.2 Lavagem das partículas poliméricas

A etapa de lavagem para remoção da nicotina foi realizada inicialmente dispersando as partículas poliméricas sintetizadas em 100 mL de solução de metanol: ácido acético 9:1 (v/v). A dispersão foi colocada em banho ultrassom por 60 minutos e, em seguida, mantida sob agitação magnética por 24 horas. Após este tempo, a dispersão de partículas foi filtrada sob vácuo, sendo as partículas poliméricas coletadas em papel de filtro. Prosseguiu-se a lavagem do material com a

passagem de 100 mL de metanol: ácido acético (9:1), 200 mL de metanol e 1000 mL de água ultrapura. O procedimento de lavagem foi repetido até o sinal analítico das soluções de lavagem, monitoradas em espectrofotômetro a 260 nm, ser igual a zero.

As partículas lavadas foram secas em estufa a 50°C até peso constante e estocadas a temperatura ambiente até o momento do uso. O mesmo procedimento de lavagem foi realizado para o NIP.

4.2.2.3 Caracterização do MIP por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

Foram realizadas varreduras espectrais utilizando espectroscopia na região do infravermelho (IV) com transformada de Fourier (4000-400 cm^{-1}). As amostras foram preparadas em pastilhas de brometo de potássio. Foram realizadas varreduras da nicotina e dos polímeros sem carregamento (MIP e NIP). Amostras do polímero carregado (MIP e NIP) com o fármaco também foram avaliadas. Para realizar o carregamento das partículas poliméricas com o fármaco foi preparada uma solução de nicotina em diclorometano na concentração de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Uma alíquota de 10 mL da solução de nicotina (equivalente a 100 mg de fármaco) foi misturada com 400 mg de polímero (MIP e NIP) e após 24h realizou-se a filtração da mistura em papel de filtro. O material coletado foi seco em estufa a 60°C por 8 horas e analisado como polímero carregado com nicotina.

4.2.2.4 Caracterização do MIP por análise térmica

Foram realizadas análises térmicas das amostras: nicotina, MIP, NIP e misturas binárias MIP:nicotina e NIP:nicotina (1:1) empregando calorimetria diferencial de varredura (CDV) e termogravimetria (TG).

O equipamento para CDV foi calibrado com padrão de índio (ponto de fusão de 156,63 °C, entalpia – 28,45 J/g). Cerca de 2,0 mg ($\pm 0,1$ mg) de amostra foi acondicionada em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados e analisadas no

intervalo de temperatura de 25 a 500 °C, a uma razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e em atmosfera dinâmica com fluxo de nitrogênio constante de 50 mL.min⁻¹.

A análise termogravimétrica foi realizada com cerca de 3,0 mg das amostras pesadas em cadinhos de platina. A análise foi realizada em atmosfera dinâmica com fluxo de nitrogênio, no intervalo de temperatura de 30 a 600 °C com razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹.

4.2.2.5 Caracterização do MIP por microscopia eletrônica de varredura

As imagens foram obtidas com microscópio eletrônico de varredura operando na energia de 15 kV. As amostras foram previamente metalizadas com uma camada de 10 nm de ouro antes das análises.

4.2.2.6 Isoterma de adsorção da nicotina

A isoterma de adsorção da nicotina nos polímeros foi avaliada. Para isso, foram pesados exatamente 40,0 mg de polímero (MIP e NIP) e, em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução contendo diferentes concentrações de nicotina (10, 50, 100, 150 e 300 µg.mL⁻¹) diluída em diclorometano. Após 48 horas a temperatura ambiente, a solução foi filtrada em filtro de seringa de PTFE modificado 0,45 µm para separação das partículas poliméricas. A concentração de nicotina livre em solução foi determinada por CLAE conforme descrito no item 4.2.1.2. A quantidade de nicotina adsorvida foi determinada pela diferença de concentração na solução inicial e na solução após o equilíbrio. O ensaio foi realizado em duplicata.

A partir dos resultados, o ajuste dos dados foi testado nos modelos de isotermas de adsorção de Langmuir e modelo de Freundlich. As equações correspondentes a estes modelos estão apresentadas a seguir:

- modelo de isoterma de adsorção de Langmuir;

$$Q_e = \frac{KMC_e}{1 + KC_e}$$

- modelo de isoterma de adsorção de Freundlich;

$$Q_e = KMC_e^\beta$$

em que, Q_e é a quantidade de fármaco adsorvida por grama de adsorvente (mg.g^{-1}), M é a capacidade de adsorção máxima (mg.g^{-1}), C_e é a concentração do fármaco em equilíbrio com o adsorvente, K é o parâmetro relacionado à afinidade entre adsorvido e adsorvente, β é um parâmetro empírico relacionado a heterogeneidade da superfície adsorvente.

O melhor ajuste para caracterizar a adsorção do fármaco no polímero foi determinado pelo r ajustado para cada modelo.

4.2.3 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

4.2.3.1 Formulações

Diferentes formulações foram preparadas a partir de misturas de quantidades conhecidas de polímero impresso (MIP) ou controle (NIP) e uma alíquota de dispersão de nicotina a 5% (p/v) em veículo viscoso. Foram avaliados dois veículos: um hidrofílico (propilenoglicol) e um lipofílico (óleo mineral). A dispersão foi agitada em agitador de tubos imediatamente antes do preparo das formulações de modo a garantir sua homogeneidade. A preparação foi moldada em papel alumínio (com área de $1,77 \text{ cm}^2$) para posterior aplicação na célula de difusão, onde foram realizados os estudos de liberação e permeação cutânea. As formulações permaneceram em repouso por 72 horas a 4°C antes dos ensaios de liberação e permeação. As formulações avaliadas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Formulações avaliadas quanto à liberação de nicotina.

Formulação	Veículo	Quantidade de MIP (mg)	Quantidade de NIP (mg)	Volume da dispersão de nicotina (mL)*	Razão polímero: fármaco na preparação
1A	Propilenoglicol	50,0	-	0,1	10:1
1B	Propilenoglicol	-	50,0	0,1	10:1
2A	Óleo mineral	50,0	-	0,1	10:1
2B	Óleo mineral	-	50,0	0,1	10:1
3A	Óleo mineral	80,0	-	0,1	16:1
3B	Óleo mineral	-	80,0	0,1	16:1
4A	Óleo mineral	80,0	-	0,2	8:1
4B	Óleo mineral	-	80,0	0,2	8:1

* Cada 0,1 mL de dispersão de nicotina contém 5,0 mg do fármaco.

Adicionalmente, foram preparadas dispersões de nicotina a 5% (p/v) em óleo mineral e em propilenoglicol na ausência dos polímeros, para avaliar uma possível influência destes veículos na liberação do fármaco.

4.2.3.2 Estudos de liberação *in vitro* da nicotina

Os estudos de liberação foram realizados em célula de difusão vertical utilizando uma membrana de diálise constituída de celulose regenerada como suporte. As membranas foram previamente lavadas com água destilada. As células foram preenchidas com o meio receptor, previamente degaseificado sob vácuo em banho ultrassom por 60 minutos, que foi mantido sob agitação magnética a 100 rpm e na temperatura de 32 °C. Foram coletadas amostras de 1,0 mL do meio receptor nos intervalos de 0,5, 3, 6, 9, 12, 24 e 32 horas com imediata reposição do meio aquecido a 32 °C. A quantificação da nicotina no meio receptor foi realizada por CLAE conforme o item 4.2.1.2.

4.2.3.3 Estudos de permeação cutânea *in vitro* da nicotina

Os estudos de permeação cutânea *in vitro* foram realizados utilizando pele da orelha de porcos. As orelhas foram obtidas em abatedouro local logo após o abate dos animais. A pele, sem lesões superficiais, foi higienizada com água potável e imediatamente dissecada com auxílio de material cirúrgico para separação da cartilagem. Vasos sanguíneos, nervos e tecido adiposo também foram removidos. A pele preparada foi mantida congelada até a sua utilização nos estudos de permeação cutânea. Previamente ao início dos estudos de permeação cutânea foi realizado o descongelamento das peles dissecadas a temperatura ambiente. Fragmentos de pele foram cortados em tamanho compatível para cobrir a área de difusão efetiva do compartimento doador da célula de difusão vertical. A formulação foi aplicada sobre a camada córnea e a derme ficou em contato com o meio receptor. As células foram previamente preenchidas com o meio receptor degaseificado, que foi mantido sob agitação magnética a 600 rpm e na temperatura de 32 °C. Foram coletadas amostras de 1,0 mL do meio receptor nos intervalos de 0,5, 3, 6, 9, 12, 24, 28, 32 e 48 horas com imediata reposição do meio aquecido a 32°C. A quantificação da nicotina no meio receptor foi realizada por CLAE conforme o item 4.2.1.2.

4.2.3.4 Avaliação da cinética de liberação e permeação cutânea *in vitro* da nicotina

Os dados obtidos dos estudos de liberação e permeação cutânea foram plotados graficamente como quantidade cumulativa permeada por área de difusão ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) em função do tempo (horas), e diferentes modelos cinéticos foram aplicados:

- modelo de ordem zero (concentração *versus* tempo);

$$Q_t = Q_0 + K_0 t$$

- pseudo-primeira ordem ou Higuchi (concentração *versus* raiz quadrada do tempo);

$$Q_t/Q_0 = K_H t^{1/2}$$

- primeira ordem (logaritmo da concentração *versus* tempo);

$$\log Q_t = \log Q_0 + K_1 t$$

em que, Q_t é a quantidade liberada (μg) no tempo t (horas), Q_0 é a quantidade inicial de nicotina no compartimento doador (μg), K_0 é a constante de ordem zero ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$), K_H é a constante de pseudo-primeira ordem ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1/2}$), K_1 é a constante de primeira ordem ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$).

O melhor ajuste para caracterizar a cinética de liberação e permeação foi determinado pelo r ajustado para cada modelo. Após estabelecer o modelo cinético com maior ajuste, determinou-se o fluxo de liberação e/ou permeação do fármaco, definido como a inclinação da reta no modelo selecionado.

Os resultados em todos os tempos dos estudos de liberação e permeação cutânea foram considerados durante as avaliações cinéticas.

4.2.3.5 Avaliação da retenção cutânea da nicotina

Após os estudos de permeação cutânea (48 horas), a pele foi retirada da célula de difusão vertical e lavada com água destilada para que resíduos superficiais da formulação fossem removidos. A área da pele em contato com a área de difusão efetiva da célula de difusão e com a formulação foi recortada, picotada e transferida para tubos de polietileno, onde se adicionou 10 mL da solução extratora e 1 mL de acetonitrila para precipitação de proteínas. A mistura foi levada para homogeneizador de tecidos, triturada por 5 minutos e depois foi centrifugada a 3400 rpm durante 15 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi coletada, filtrada em filtro

de seringa de PTFE modificado 0,45 μm e analisada por CLAE para determinação da quantidade de nicotina retida na pele.

4.2.4 Análise estatística

Os resultados encontrados foram avaliados estatisticamente pelo teste t de Student para comparação de valores médios de duas amostras independentes. O nível de significância utilizado foi de $\alpha=5\%$. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DE NICOTINA EM ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA

A determinação da nicotina foi realizada por CLAE em modo fase reversa devido à necessidade de separação de interferentes, sobretudo os provenientes da pele de orelha de porco utilizada nos estudos de permeação cutânea. Entretanto, conforme descrito na literatura, a análise da nicotina por CLAE pode apresentar alguns problemas analíticos devido às características físico-químicas do fármaco (CARLISLE; CHICOINE; WYGANT, 1992; TAMBWEKAR; KAKARIYA; GARG, 2003). Frequentemente é relatada a interação da molécula de caráter alcalino com grupamentos silanóis residuais das partículas de sílica, causando problemas de retenção secundária e levando ao aparecimento de picos com caudas. Ainda mais, a nicotina pode apresentar dificuldades em interagir com colunas de fase reversa devido às suas características hidrofílicas. Neste caso, muitas vezes observa-se um baixo valor de k' nos cromatogramas, insuficiente para assegurar separações cromatográficas eficientes (MCCALLEY, 1999).

Para o desenvolvimento do método analítico, analisaram-se as duas principais estratégias frequentemente descritas na literatura para separações cromatográficas de nicotina em modo fase reversa: o pareamento iônico e o uso de aminas competitivas (CARLISLE; CHICOINE; WYGANT, 1992). Na estratégia do pareamento iônico, testou-se lauril sulfato de sódio como pareador iônico. Neste caso, a molécula de lauril sulfato de sódio, um surfactante aniônico, foi testada em uma fase móvel com pH ácido (pH 3,0). Neste valor de pH, a molécula de nicotina está predominantemente na forma diprótica, e pode formar um par iônico com o ânion lauril sulfato, aumentando a capacidade de interação do analito com a coluna de fase reversa. Apesar da possibilidade de aplicação desta estratégia na determinação da nicotina, algumas desvantagens foram consideradas como o tempo para estabilização da coluna cromatográfica (em torno de 2 horas) e o custo elevado do reagente pareador iônico com grau de pureza cromatográfico. Devido a estes

motivos, a adição de aminas competitivas na fase móvel foi considerada uma alternativa analítica mais prática e simples para determinação da nicotina por CLAE. As condições estabelecidas usando aminas competitivas foram estabelecidas como metodologia definida e foram descritas anteriormente no item 4.2.1.2.

Nas condições definidas, as aminas competitivas foram utilizadas para reduzir a interação entre os grupamentos amina ionizáveis da molécula de nicotina e os grupos silanóis residuais da fase estacionária C₁₈. É de se esperar que a interação entre os silanóis residuais e as aminas da fase móvel, no caso a trietilamina, leve a uma diminuição da cauda nos picos da nicotina devido a um mecanismo de competição, que reduz a interação dos silanóis residuais com as aminas da molécula de nicotina (TAMBWEKAR; KAKARIYA; GARG, 2003). Nesta mesma condição, também se selecionou um valor de pH de 6,9 de modo a diminuir a ionização dos grupamentos amina favorecendo a retenção da nicotina na fase estacionária.

Após a padronização dos parâmetros da metodologia analítica, prosseguiu-se com os estudos de validação analítica. A validação analítica pode ser definida como um conjunto de ensaios para demonstrar que a metodologia analítica é apropriada à sua finalidade (ICH, 2005). Os resultados dos ensaios de validação para o método analítico aplicado neste trabalho estão apresentados a seguir.

Conforme o ICH (2005), a apresentação dos resultados de adequação do sistema é parte integrante dos ensaios de validação. Os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados de adequação do sistema cromatográfico, n=6.

Parâmetro	Resultados encontrados
Fator de retenção	2,4
Fator assimetria	1,3
Número de pratos teóricos	3249
Tempo de retenção (minutos)	4,3

De acordo com o estudo de seletividade, picos de interferentes não foram detectados no mesmo tempo de retenção da nicotina nas amostras de branco de meio receptor ou homogeneizado de pele de orelha de porco. Na Figura 7 estão

apresentados os cromatogramas de solução padrão de nicotina contaminada com pele de orelha de porco na concentração de $150,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o seu respectivo branco.

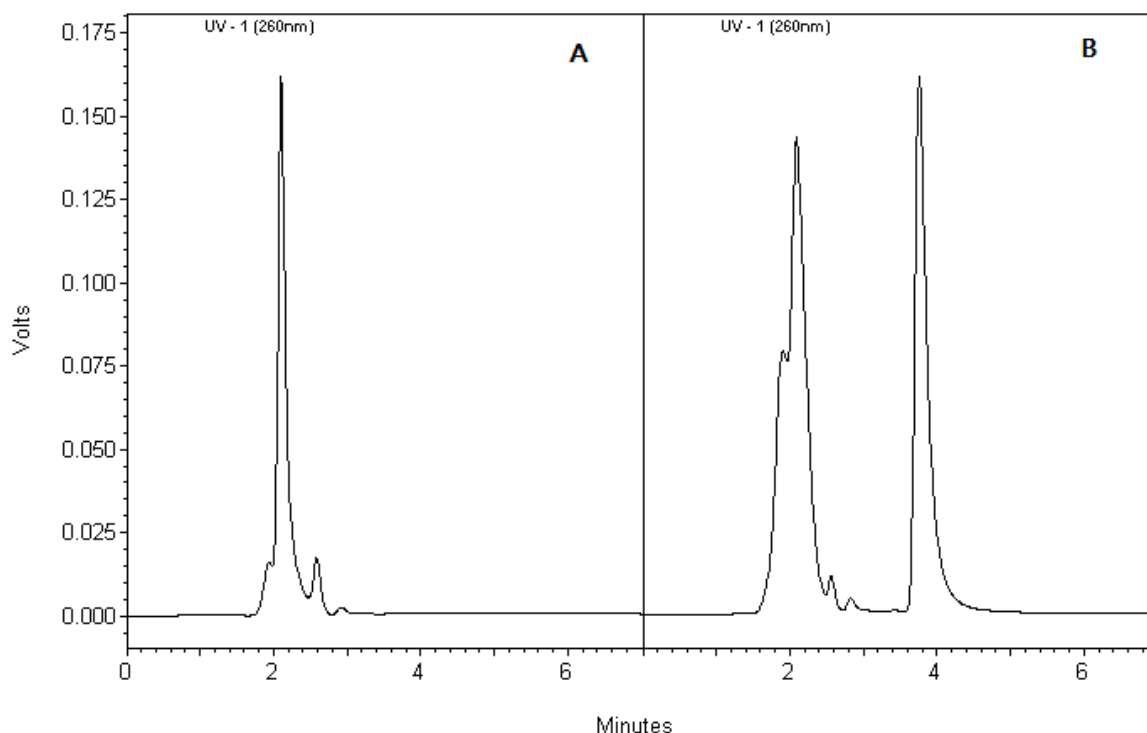


Figura 7 – Cromatogramas de branco, meio receptor que permaneceu em contato com pele de orelha de porco (A) e, solução padrão de nicotina na concentração de $150,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que permaneceu em contato com pele de orelha de porco (B).

A pureza cromatográfica do pico de nicotina foi determinada pelo índice de similaridade espectral. O índice de similaridade foi estabelecido comparando solução padrão de nicotina em meio receptor com solução de nicotina em homogeneizado de pele de orelha de porco. O resultado indicou um índice de similaridade de 100,0 % e foi considerado satisfatório. A pureza cromatográfica é um indicativo de que não ocorre a eluição de interferentes no mesmo tempo de retenção do pico principal.

A separação cromatográfica da nicotina e o seu maior metabólito, a cotinina, também pode ser realizada pela metodologia empregada. A resolução alcançada entre os picos foi de 2,5 e o k' referente ao pico de cotinina foi de 1,9.

O método apresentou-se linear no intervalo de concentrações de 0,5 a $300,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O LQ foi estabelecido como a menor concentração da curva analítica, ou seja, $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentando DPR de 2,7% e erro relativo (E) de 0,5. O intervalo

foi selecionado para facilitar a quantificação das amostras nos estudos de liberação e permeação cutânea *in vitro* permitindo a determinação de pequenas concentrações nos tempos iniciais dos estudos bem como concentrações crescentes nos tempos posteriores. A equação de reta e o r obtidos foram de, respectivamente, $y = 47854,33x + 11000,88$ e $0,999769$. A curva de calibração está apresentada na Figura 8.

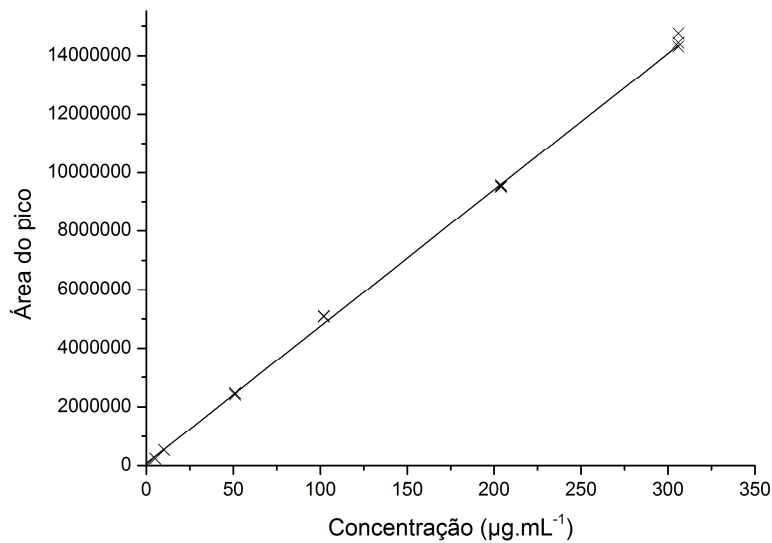


Figura 8 – Representação da curva de calibração da nicotina analisada por CLAE.

Os resultados de exatidão e precisão do método analítico estão apresentados na Tabela 3. Os resultados foram considerados satisfatórios conforme a finalidade dos estudos.

Tabela 3 – Resultados obtidos na determinação da precisão do método analítico para determinação da nicotina.

Concentração nominal (µg.mL ⁻¹)	Precisão (DPR, n=6)	
	Intra dia	Inter dia
51,0	1,6	2,2

DPR, coeficiente de variação (%).

Tabela 4 – Resultados obtidos na determinação da exatidão do método analítico para determinação da nicotina.

Concentração nominal ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão (E , $n=3$)	
	Intra dia	Inter dia
0,5	1,6	1,0
51,0	0,5	1,9
306,0	0,1	0,2

E , erro relativo (%).

A recuperação de quantidades conhecidas de nicotina a partir da pele total de orelha de porco está apresentada na Tabela 5, demonstrando que a técnica de preparo de amostras permite a recuperação praticamente total do fármaco a partir da estrutura da pele.

Tabela 5 – Resultados obtidos na determinação da recuperação da nicotina a partir da pele de orelha de porco, $n=3$.

Concentração nominal (mg.cm^{-2})	Recuperação (E , $n=3$) \pm DP
0,1	95,6 \pm 1,8
0,3	97,7 \pm 0,2
0,6	97,3 \pm 0,1

DP, desvio padrão; E , porcentagem de recuperação (%).

A determinação da estabilidade é um estudo importante para demonstrar que não ocorrem degradações químicas da molécula durante os ensaios *in vitro*. Pode-se considerar que de acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, a nicotina permaneceu estável no meio receptor por até 96 horas. Geralmente se aceita que resultados entre 98 e 102% são indicativos de que não ocorrem alterações significativas relacionadas à degradação química do fármaco em estudos de liberação (USP, 2012).

Tabela 6 - Estabilidade da nicotina no meio receptor, n=3.

	Início	24h	48h	72h	96h
Média (%)	100,00	100,65	100,58	101,55	101,56
DPR	1,69	1,68	1,76	1,48	1,47

DPR, coeficiente de variação (%).

5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS MIPs

5.2.1 Síntese dos polímeros impressos

Os materiais poliméricos sintetizados neste trabalho (MIP e polímero controle) foram planejados experimentalmente como copolímeros de AMA e EDGMA, podendo também ser denominados como poli(AMA-co-EDGMA). O AMA, denominado então como MF, fornece à estrutura polimérica a função química ionizável ácido carboxílico, sendo de importância fundamental para que o material polimérico impresso possa interagir com a MM e apresentar a propriedade de reconhecimento molecular. Deste modo, a Figura 9 ilustra as moléculas de AMA e EDGMA e a provável ligação covalente entre o MF e o agente de ligação cruzada que pode ocorrer durante a reação de polimerização. As ligações covalentes provavelmente ocorrem entre os grupamentos vinílicos do agente de ligação cruzada (EDGMA) e o grupo vinílico da molécula de AMA. Também é possível observar na Figura 9, a ligação entre duas moléculas de EDGMA. É importante ressaltar que cada molécula de EDGMA possui dois grupamentos vinílicos, podendo deste modo estabelecer quatro ligações químicas, neste caso com moléculas de AMA ou outras moléculas do próprio EDGMA, de modo que o polímero sintetizado usando este agente de ligação cruzada tenha uma estrutura não-linear. Devido à maior proporção de EDGMA em relação ao AMA (4:1) é provável que sejam estabelecidas muitas ligações cruzadas entre os grupos vinílicos de diferentes moléculas de EDGMA, formando deste modo uma estrutura polimérica rígida, denominada monólito (TUNC et al, 2006; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

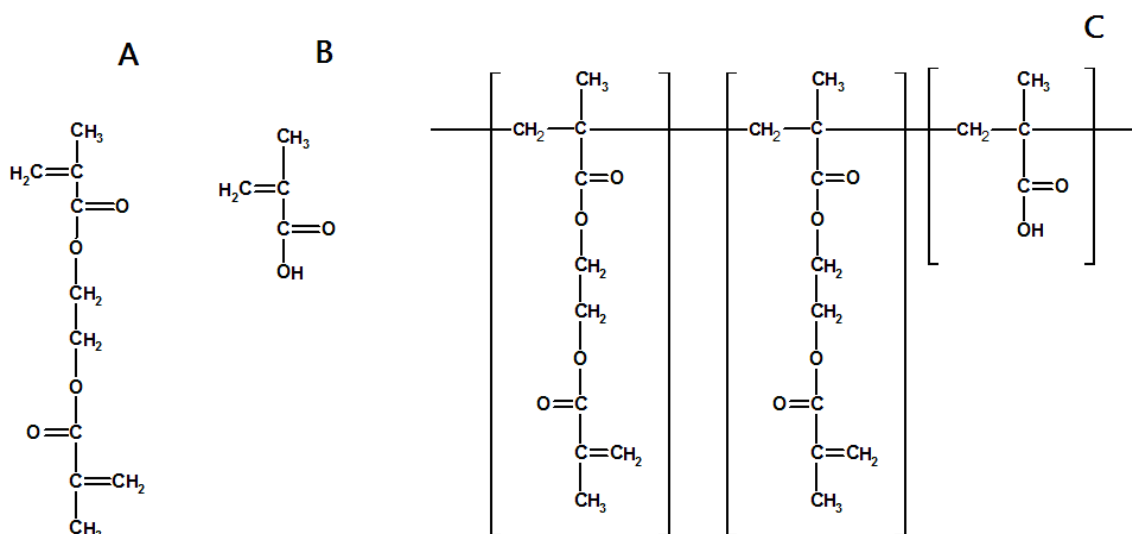


Figura 9 – Estrutura química do EDGMA (A), AMA (B) e possíveis ligações covalentes estabelecidas entre os monômeros (C).

Após a síntese dos polímeros, pode ser esperado que o MIP apresente cavidades impressas que possibilitem ao mesmo a capacidade de reconhecimento molecular. As cavidades impressas podem ser definidas como sítios em que as interações do tipo fármaco-polímero são favorecidas devido a um efeito estérico (ou conformacional) do sítio impresso associadas às interações entre os grupos funcionais do polímero e a molécula de fármaco (PIGNATELLO; FERRO; PUGLISI, 2002; ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2004).

A seleção do AMA neste caso foi baseada sobretudo no grupamento ácido carboxílico presente na estrutura deste MF, o que deve favorecer interações fármaco-polímero (YANG, et al, 2007). Segundo Figueiredo e colaboradores (2009), em valores de pH neutros, em torno de 7,0, o grupamento pirrolidona da estrutura da nicotina ($pK_a = 7,84$) está protonado, enquanto que os grupos carboxílicos do polímero estão ionizados (o MF possui um pK_a de 4,66). Desta forma, a interação entre a nicotina e o polímero poderia ser associada a interações eletrostáticas do nitrogênio do grupo pirrolidona com o grupo carboxílico do MF.

A Figura 10 apresenta interações hipotéticas deste tipo que podem ocorrer entre as cavidades impressas do MIP sintetizado e a nicotina. É importante ressaltar que o polímero controle possui a mesma composição química dos MIPs, o que inclui

os grupos funcionais na sua estrutura polimérica. Entretanto, devido à ausência da nicotina durante a reação de polimerização, é esperada uma menor capacidade de reconhecimento molecular no polímero controle devido à ausência das cavidades impressas (CORMACK; ELORZA, 2004; TUNC et al, 2006; FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA, 2008).

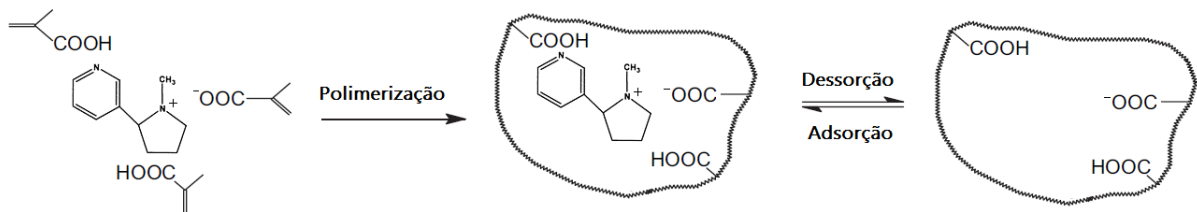


Figura 10 – Interações hipotéticas fármaco-polímero nas cavidades impressas.

5.2.2 Caracterização do MIP por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

Os estudos de espectroscopia de absorção na região do IV são importantes para caracterizar uma estrutura molecular, estudar a composição de materiais poliméricos e também caracterizar possíveis interações do tipo fármaco-polímero (RUFINO; MONTEIRO, 2003).

Para caracterizar quimicamente a estrutura do MF e da MM foram realizadas varreduras espectrais da nicotina (MM) e do AMA (MF) na região do IV. Na Figura 11 estão apresentados os espectros de absorção na região do IR da nicotina e do AMA. Os resultados foram apresentados de 2000-400 cm^{-1} para facilitar a visualização das bandas mais importantes para caracterização de ambas as moléculas.

A Tabela 7 apresenta as principais bandas visualizadas nos estudos de espectroscopia de absorção na região do IV para a nicotina e para o AMA,

permitindo a identificação de algumas bandas de absorção características destas moléculas.

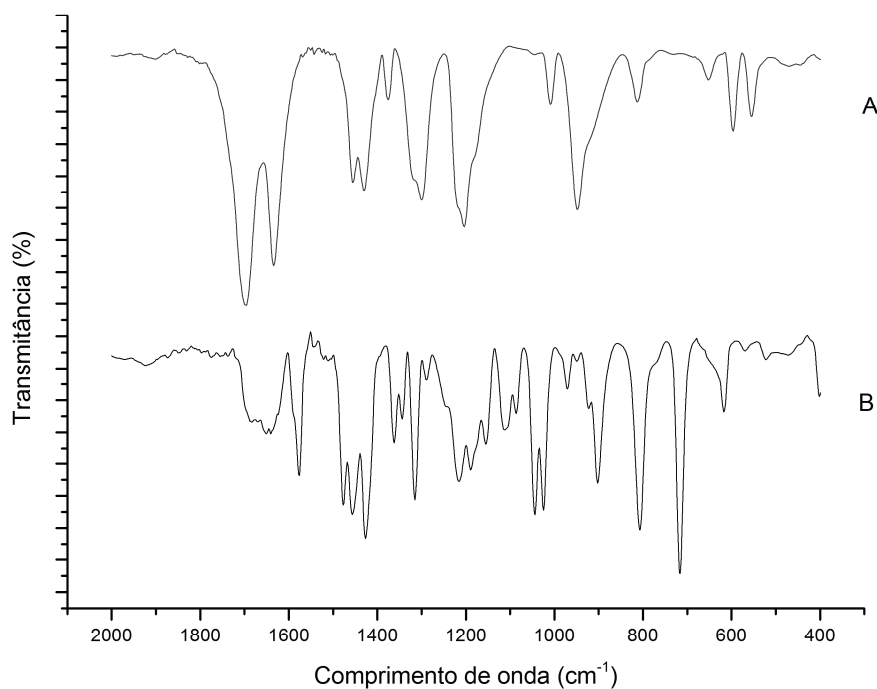


Figura 11 – Espectros de absorção na região do IV do AMA (A) e da nicotina (B).

Tabela 7 – Principais bandas de absorção observadas na região do IV identificadas para a nicotina e para o AMA.

Bandas da nicotina	Número de onda (cm⁻¹)
Estiramento aromático C=C	1688
Estiramento aromático C=N	1576
Vibração do C-H piridínico dos grupos CH ₂	1427-1477
Estiramento fora do plano da ligação C-H do anel piridínico monossustituído	718
Bandas do AMA	Número de onda (cm⁻¹)
Estiramento da banda carbonílica (-COO)	1695
Estiramento assimétrico da banda carbonílica (ν _{ass} -COO)	1634
Vibrações dos grupos CH ₂	1460 e 1477
Estiramento da banda carbonílica (-COO)	1204

Conforme os resultados apresentados na Tabela 7 observaram-se os estiramentos referentes ao grupo funcional ácido carboxílico na molécula de AMA, permitindo a identificação deste grupo funcional na estrutura química do monômero. Também foi possível observar na varredura espectral da nicotina que a banda em 718 cm^{-1} apresentou a maior intensidade de absorção registrada no espectro, sendo corresponde ao estiramento fora do plano da ligação C-H do anel piridínico monossustituído.

Os espectros de absorção do MIP sem carregamento com nicotina e do MIP carregado com o fármaco estão apresentados na Figura 12. De modo análogo, os resultados obtidos para o polímero controle (NIP) estão apresentados na Figura 13. Os resultados foram apresentados de $2000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ para facilitar a visualização das bandas de maior interesse para caracterização dos polímeros.

A Tabela 8 apresenta as principais bandas visualizadas nos estudos de espectroscopia de absorção na região do IV para ambos os copolímeros (MIP e controle).

Tabela 8 – Principais bandas de absorção na região do IV identificadas para os copolímeros sintetizados (MIP e controle) sem carregamento e carregados com nicotina.

Bandas dos copolímeros (MIP e controle)	Número de onda (cm^{-1})
Estiramento da banda carbonílica (-COO)	1722
Estiramento assimétrico da banda carbonílica (ν_{ass} -COO)	1636
Vibração dos grupos CH_2	1477 e 1460
Estiramento da banda carbonílica (-COO)	1150
Estiramento fora do plano da ligação C-H do anel piridínico monossustituído (característico da molécula de nicotina)	714

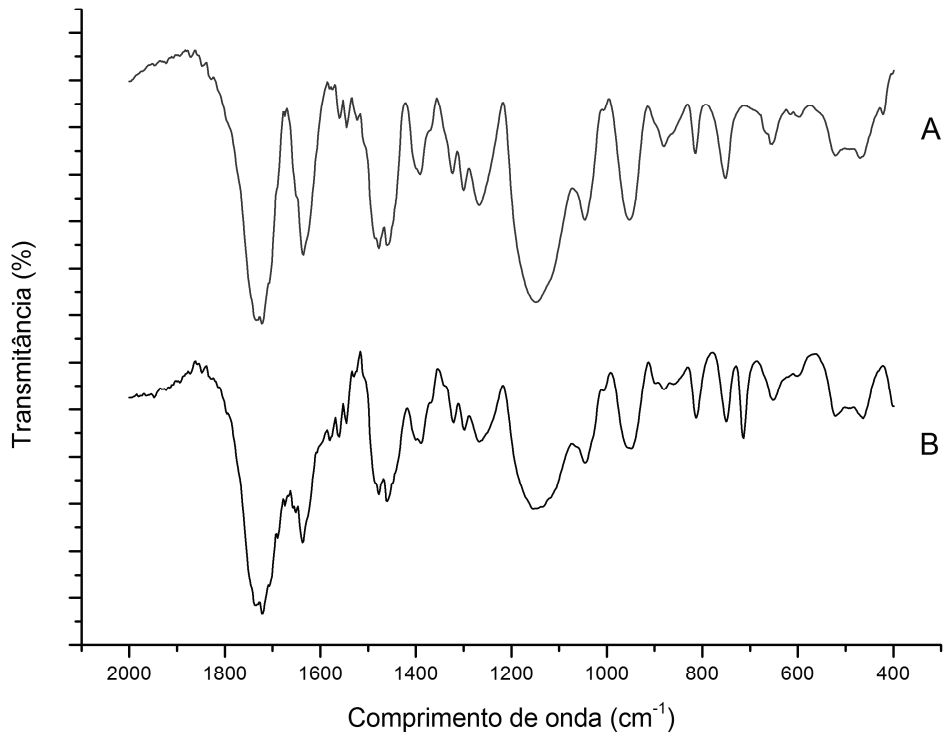


Figura 12 – Espectros de absorção na região do IV do MIP sem carregamento (A) e do MIP carregado com nicotina (B).

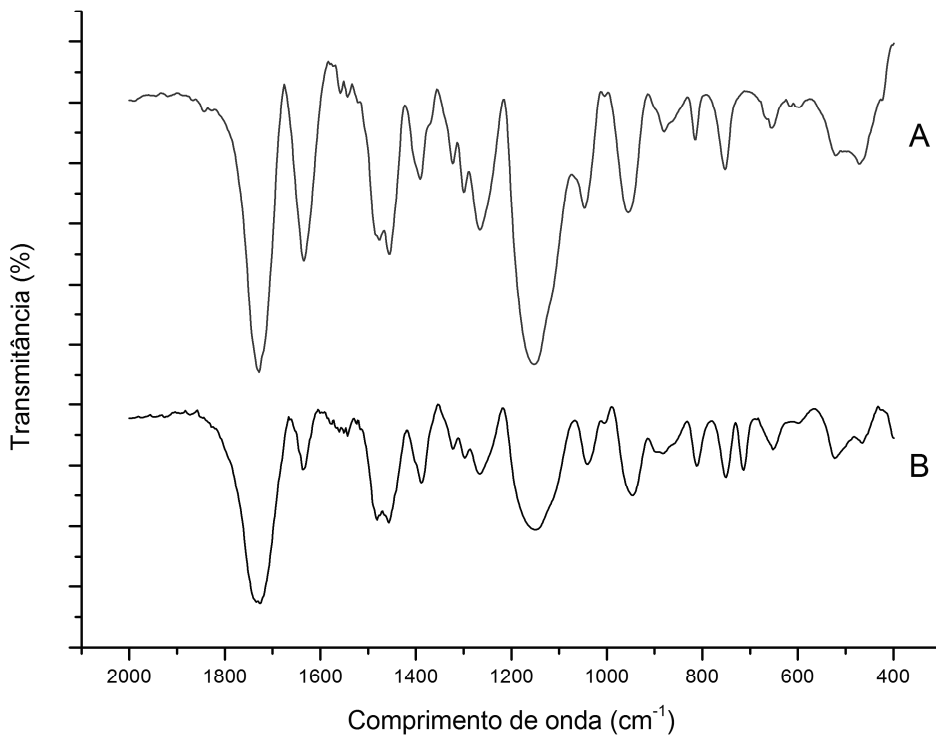


Figura 13 – Espectros de absorção na região IV do NIP sem carregamento (A) e do NIP carregado com nicotina (B).

Conforme os resultados apresentados nas Figuras 12 e 13 e na Tabela 8, pode-se visualizar que os polímeros sintetizados apresentam estiramentos característicos do grupo funcional ácido carboxílico, o que é provavelmente o principal fator determinante das interações entre fármaco e polímero nas cavidades impressas do polímero. Também foi possível demonstrar a presença de uma banda em 714 cm^{-1} , presente somente no espectro dos polímeros carregados com nicotina. A banda em 714 cm^{-1} foi associada ao estiramento fora do plano da ligação C-H do anel piridínico monossustituído da molécula de nicotina, levando à suposição que o fármaco pode ser adsorvido fisicamente na matriz polimérica. Uma vez que os resultados não foram diferentes para o MIP e para o polímero controle, pode-se supor que ambas as matrizes poliméricas podem apresentar interações com a nicotina. Ainda mais, é de grande importância observar a mudança na forma e intensidade das bandas relacionadas ao grupamento carbonila, sobretudo, a diminuição da intensidade do estiramento em 1636 cm^{-1} . A modificação destas bandas pode sugerir o estabelecimento de ligações de hidrogênio entre os grupamentos carboxílicos dos polímeros com os grupamentos amina da molécula de nicotina, principalmente o nitrogênio do grupo pirrolidona, levando ao estabelecimento de interações físicas entre o fármaco e o polímero, conforme a hipótese apresentada anteriormente no item 5.2.1.

Estes resultados foram considerados um ponto de partida importante para o estudo dos MIPs como sistemas para liberação transdérmica de nicotina, uma vez que os polímeros podem interagir em alguma extensão com o fármaco, sendo esperada a modificação das características de liberação da nicotina. Neste caso, as interações fármaco-polímero provavelmente ocorrem a partir da adsorção física da nicotina na matriz polimérica, em que ligações reversíveis entre fármaco e o polímero podem ser estabelecidas. A natureza destas ligações provavelmente se deve a interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações de van der Waals (JENQUIN; MCGINITY, 1994; PIGNATELLO; FERRO; PUGLISI, 2002; UMBLEBY II et al, 2004; CUNLIFFE; KIRBY; ALEXANDER, 2005).

5.2.3 Caracterização do MIP por análise térmica

As técnicas de análise térmica consistem em um grupo de técnicas de grande interesse na área farmacêutica, permitindo a caracterização do comportamento térmico de fármacos e insumos farmacêuticos e a obtenção de informações importantes para o desenvolvimento de novos produtos (BAZZO; SILVA, 2005). A aplicação de técnicas de análise térmica, sobretudo CDV e TG, tem importância na caracterização da compatibilidade entre fármaco e excipientes, permitindo a caracterização de interações químicas e físicas entre os componentes da formulação e tornando-se um indicativo da estabilidade de um produto nas etapas de pré-formulação (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

A Figura 14 apresenta as curvas de aquecimento obtidas por CDV para a nicotina, MIP e mistura binária de MIP e nicotina nas proporções de 1:1 (p/p). As curvas de aquecimento obtidas para o polímero controle (NIP) e para a mistura binária NIP e nicotina nas proporções de 1:1 (p/p) estão apresentadas na Figura 15.

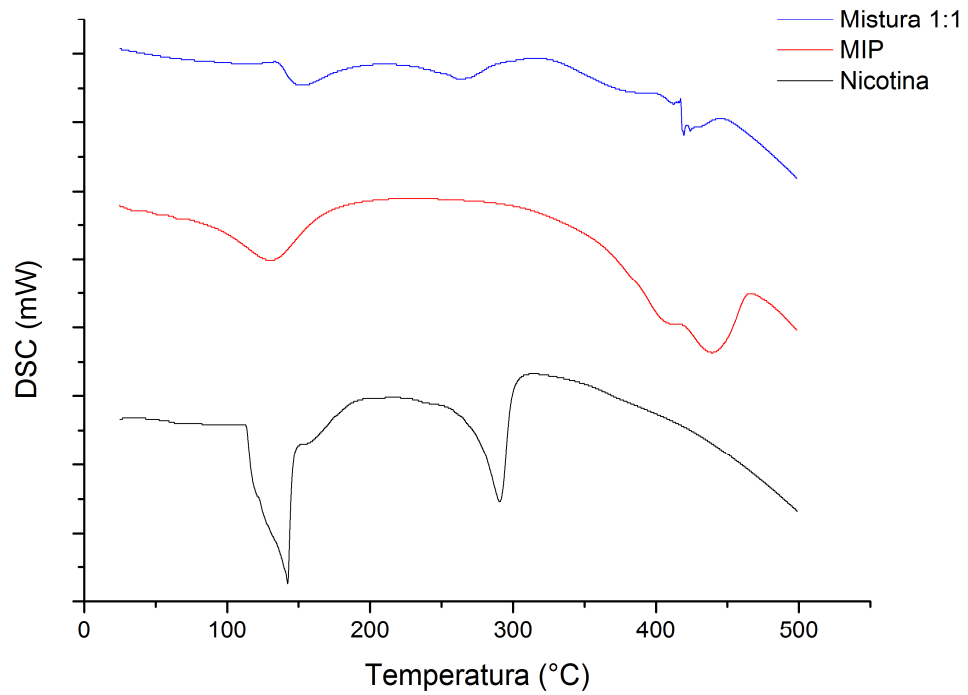


Figura 14 – Curvas de aquecimento obtidas por CDV para a nicotina, MIP e mistura binária de MIP e nicotina (MIP carregado) nas proporções de 1:1 (p/p).

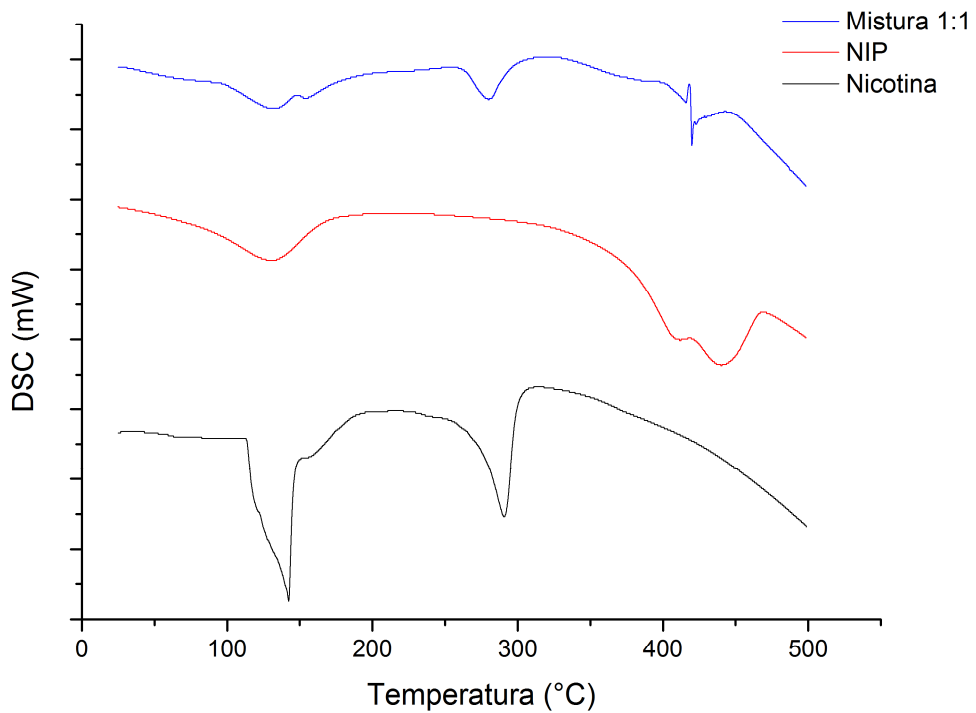


Figura 15 – Curvas de aquecimento obtidas por CDV para a nicotina, NIP e mistura binária de NIP e nicotina nas proporções de 1:1 (p/p).

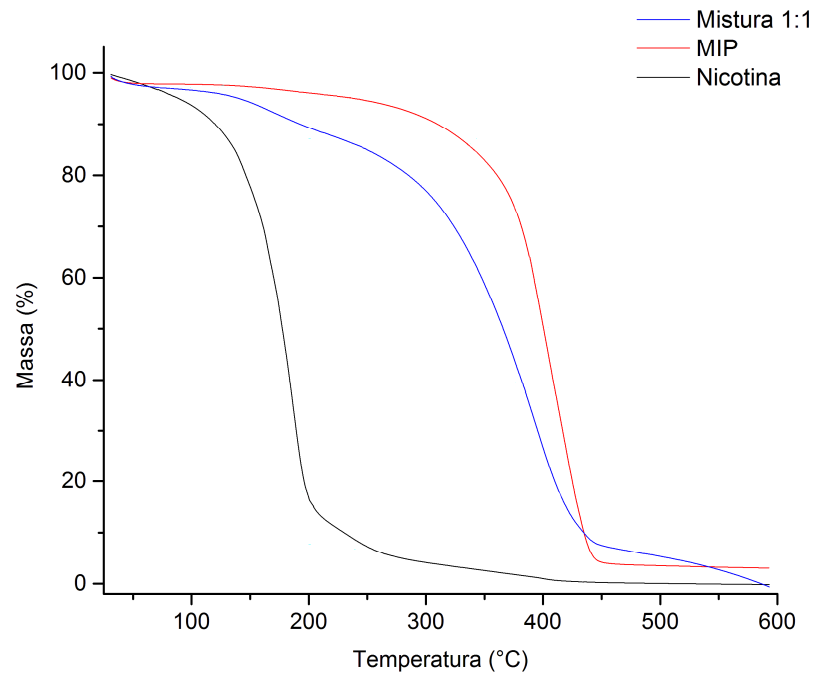


Figura 16 – Curvas termogravimétricas obtidas para a nicotina, MIP e mistura binária de MIP e nicotina nas proporções de 1:1 (p/p).

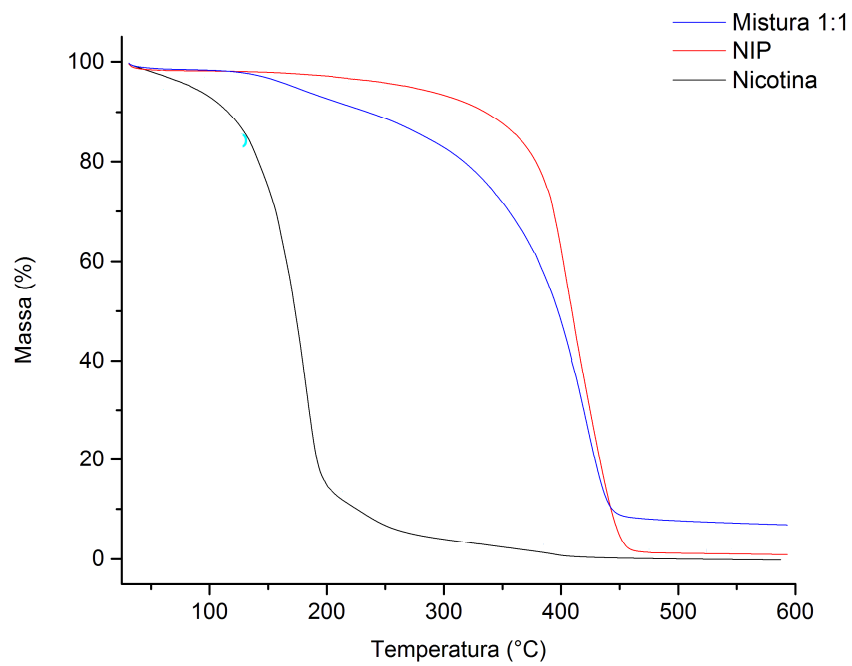


Figura 17 – Curvas termogravimétricas obtidas para a nicotina, NIP e mistura binária de NIP e nicotina (NIP+Nico) nas proporções de 1:1 (p/p).

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 14 e 15, pode-se perceber dois eventos endotérmicos na curva de aquecimento da nicotina obtidas por CDV. O primeiro evento foi observado em 142 °C e foi atribuído à volatilização do fármaco. O segundo evento foi observado em 291 °C e foi supostamente atribuído a degradação da nicotina, seguido posteriormente pelo decaimento da linha base. Os resultados obtidos para os polímeros (MIP e NIP), bem como para as misturas binárias de fármaco e polímero nas proporções de 1:1 (p/p) não indicaram diferenças significativas entre o comportamento térmico do MIP, NIP e respectivas misturas binárias com a nicotina. Observou-se nas curvas de aquecimento dos dois polímeros (MIP e NIP) o aparecimento de dois eventos endotérmicos bem definidos. O primeiro evento foi observado em 132 °C, sendo supostamente associado à dessorção de água na matriz polimérica. O segundo evento observado em torno de 400 °C foi atribuído a decomposição térmica dos polímeros, resultados semelhantes aos observados por Tunc e colaboradores (2006) durante a análise por CDV de polímeros impressos molecularmente com teofilina. É importante mencionar que para matrizes poliméricas com elevado número de ligações cruzadas, como os MIPs, geralmente não é possível a visualização da transição vítrea dos polímeros (TUNC et al, 2006). Em relação às misturas binárias de nicotina e polímero, observou-se primeiramente uma sobreposição dos eventos térmicos da volatilização da nicotina com o evento supostamente associado à dessorção da água adsorvida na matriz polimérica. Posteriormente, observou-se um evento em torno de 270 °C supostamente atribuído à decomposição térmica da nicotina. Por fim, observou-se um evento próximo a 400 °C associado à decomposição do polímero, em que houve uma modificação no formato da banda, que pode ter ocorrido devido à mistura com a nicotina.

Os resultados obtidos por CDV foram associados aos resultados obtidos por TG. Os resultados obtidos por TG estão apresentados nas Figuras 16 e 17.

Observou-se na curva termogravimétrica da nicotina que o fármaco apresentou inicialmente uma perda gradual de massa, com decaimento de cerca de 20% de massa em 142°C. Em seguida, devido à volatilização da nicotina, observou-se um decaimento rápido de massa, com perda de aproximadamente 85% em 200 °C. Não foram observadas diferenças significativas entre as curvas termogravimétricas obtidas para MIP e NIP. Nas curvas termogravimétricas destes polímeros, observou-se inicialmente em 100 °C uma perda de massa de cerca de 2

a 3% associada à dessorção de água presente na matriz polimérica. Em 440 °C, observou-se uma perda de massa de aproximadamente 85%, atribuída à decomposição térmica dos polímeros, em acordo com os resultados obtidos por CDV.

De acordo com os resultados da análise termogravimétrica das misturas binárias 1:1 (p/p), observou-se uma perda de massa mais lenta e gradual a partir de 100°C. Em 150 °C observou-se um decaimento de massa s em torno de 5%, enquanto que em 200 °C, esta perda de massa foi de aproximadamente 10%. Em 350°C, a perda de massas tornou-se maior e mais rápida, com um valor de aproximadamente 50%. Este comportamento térmico pode ser associado às interações estabelecidas entre a nicotina e as matrizes poliméricas, o que poderia dificultar à volatilização do fármaco na mistura, tornando a perda de massas mais lenta do que o comportamento térmico da nicotina em separado. Resultados semelhantes foram observados por Pongjanyakul, Khunawattanakul e Puttipipatkachorn (2009), em que a volatilização da nicotina foi mais lenta quando o fármaco estava incluído em misturas com partículas de silicato, uma vez que a nicotina estava adsorvida na superfície destas partículas, e a interação física, caracterizada pela adsorção da nicotina no silicato tornou a volatilização do fármaco mais lenta.

Não foram observados indícios de interações químicas entre o fármaco e as matrizes poliméricas. Os resultados obtidos pelas técnicas de CDV e TG puderam então ser associados aos resultados dos estudos de espectroscopia de absorção na região IV, apresentados no item 5.2.2, indicando somente que interações de natureza física podem ocorrer entre a nicotina e os polímeros.

5.2.4 Caracterização do MIP por microscopia eletrônica de varredura

Estudos microscópicos para determinação da morfologia e tamanho das partículas são de grande importância na caracterização de novos materiais, sendo a MEV uma técnica frequentemente descrita na literatura para estas finalidades (PONGJANYAKUL; KHUNAWATTANAKUL; PUTTIPIPATKHACHORN, 2009; SEGATELLI et al., 2010).

As Figuras 18 e 19 ilustram imagens de partículas de MIP e NIP obtidas por MEV.

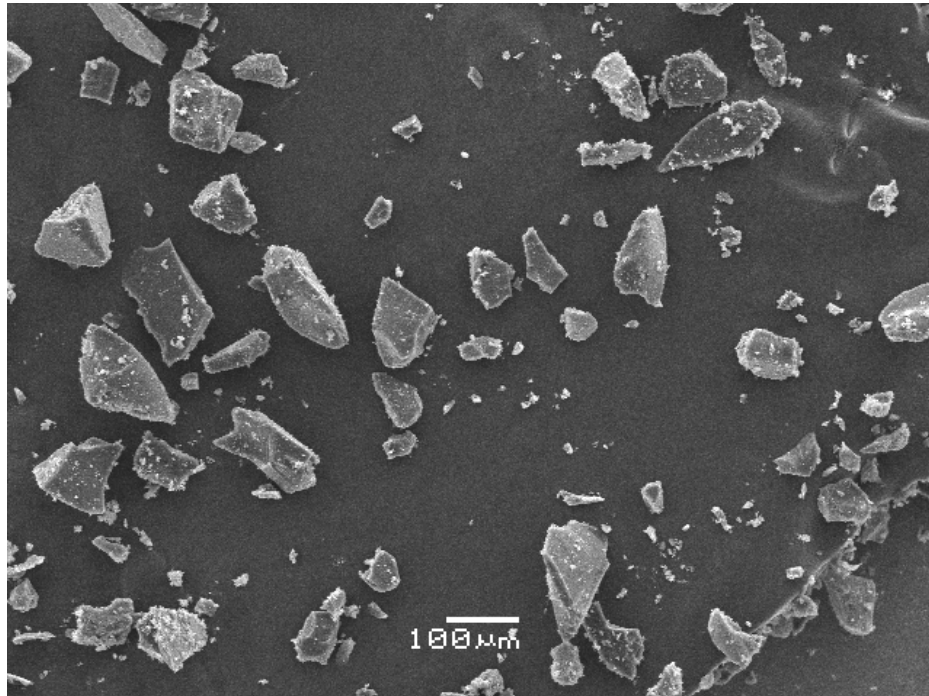


Figura 18 - Imagem das partículas de MIP obtida por MEV (Aumento de 100 X).

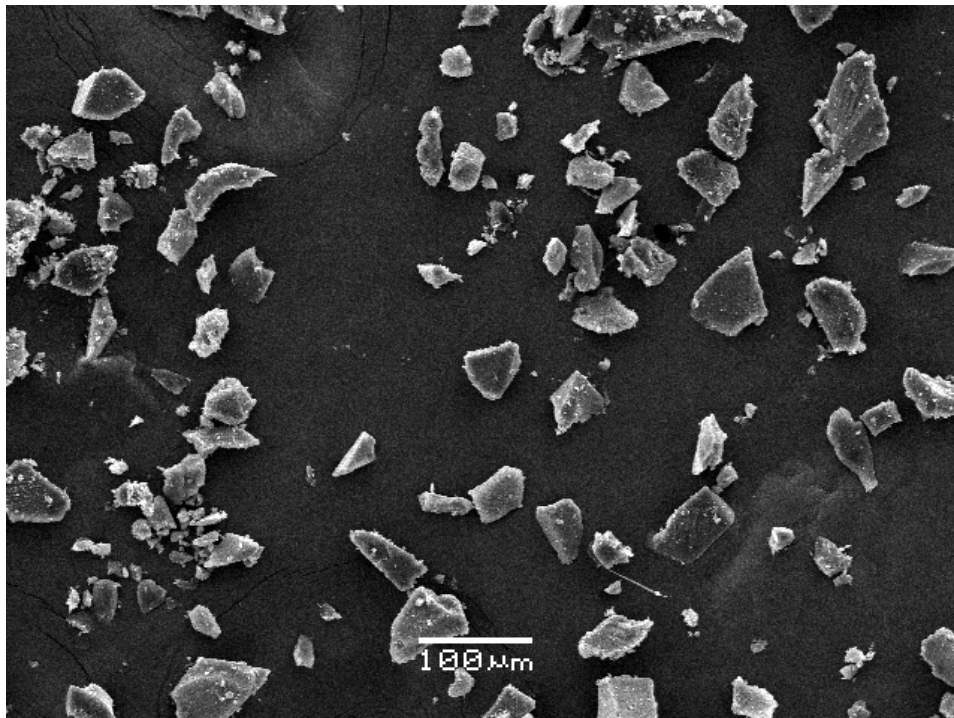


Figura 19 - Imagem das partículas de NIP obtida por MEV (Aumento de 100 X).

De acordo com as imagens apresentadas nas Figuras 18 e 19, as partículas poliméricas apresentaram uma morfologia irregular e uma superfície de baixa rugosidade. A morfologia irregular das partículas provavelmente se deve a etapa de moagem e tamisação do material. O tamanho de partícula definido durante a tamisação do material foi de 75-106 μm . Partículas com este tamanho aproximado foram predominantemente observadas nas imagens obtidas por MEV. Não foram observadas diferenças entre as partículas de MIP e NIP. Também não foram observados aglomerados de partículas.

5.2.5 Isotermas de adsorção da nicotina

A adsorção pode ser definida como um fenômeno de superfície que ocorre na interface entre duas fases, podendo ocorrer devido ao estabelecimento de interações físicas ou químicas entre adsorvido e adsorvente (DABROWSKI, 2001; PIGNATELLO; FERRO; PUGLISI, 2002). Conforme os resultados apresentados anteriormente nos estudos usando espectroscopia de absorção no IV (item 5.2.2) e análise térmica (item 5.2.3), a interação entre nicotina e MIP deve acontecer supostamente devido à adsorção física do fármaco na superfície das partículas poliméricas.

Os resultados dos estudos de adsorção da nicotina nas matrizes poliméricas (MIP e NIP) realizados em um meio solvente de baixa polaridade (diclorometano) estão apresentados na Figura 20.

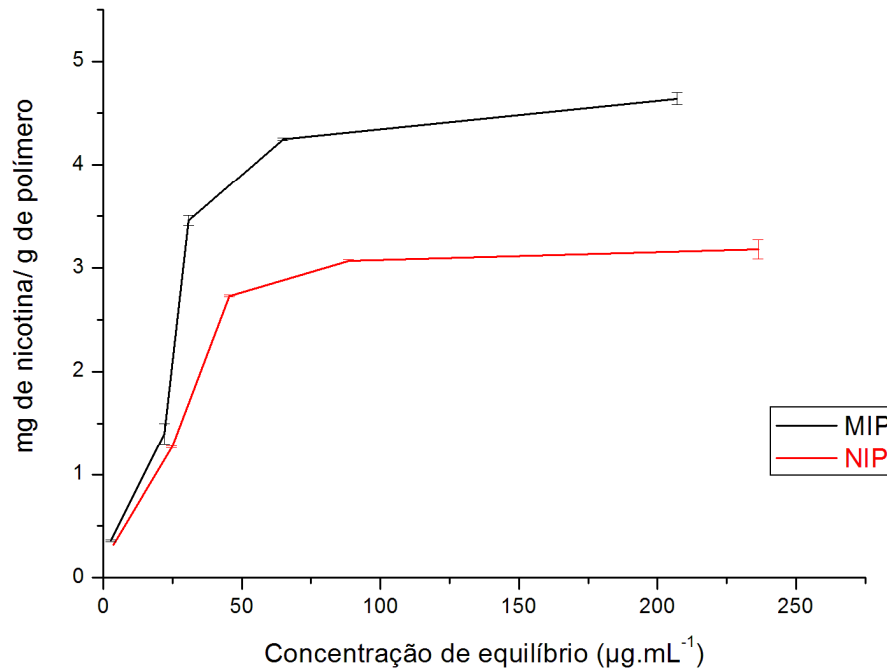


Figura 20 – Adsorção da nicotina nas matrizes poliméricas (MIP e NIP) em meio solvente de baixa polaridade (diclorometano).

A nicotina pode ser adsorvida tanto no MIP quanto no NIP, de acordo com a Figura 20. Este resultado indica que pode haver adsorção da molécula do fármaco em ambas as matrizes poliméricas, porém a quantidade de nicotina adsorvida foi maior no polímero impresso. Este resultado é esperado, pois apesar do MIP e do NIP conterem grupos carboxílicos na matriz polimérica, existe a presença de cavidades impressas na matriz polimérica impressa que favorecem a ligação do fármaco no MIP (UMPLEBY II, 2004).

Os modelos de isoterma de Langmuir e Freundlich foram aplicados aos dados experimentais. Os resultados obtidos para os parâmetros de cada modelo de isoterma de adsorção estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros calculados a partir das isotermas de Langmuir e Freundlich para a adsorção de nicotina em matrizes poliméricas (MIP e NIP).

	Langmuir			Freundlich		
	K_L	M	r	K_F	B	r
MIP	0,0243	5,56	0,9874	4,36	-1,56	0,8769
NIP	0,0245	4,02	0,9948	3,85	-1,39	0,8945

K_L é o parâmetro relacionado à afinidade entre adsorvido e adsorvente para o modelo de isoterma de Langmuir; K_F é o parâmetro relacionado à afinidade entre adsorvido e adsorvente para o modelo de Freundlich; M é a capacidade de adsorção máxima (mg.g^{-1}); B é um parâmetro empírico relacionado a heterogeneidade da superfície adsorvente; r é o coeficiente de correlação.

O modelo de isoterma de adsorção de Langmuir apresentou um melhor ajuste para os dados experimentais do MIP e NIP conforme os resultados apresentados na Tabela 9. Uma vez que os dados apresentaram um maior ajuste a este modelo de isoterma, pode-se deduzir que a adsorção da nicotina nas matrizes poliméricas ocorre como uma monocamada em sítios com características de homogeneidade, não havendo interações químicas entre as espécies adsorvidas (UMPLEBY II, 2004). Neste caso, também se pode supor que a maior capacidade adsortiva do MIP ($5,56 \text{ mg.g}^{-1}$) em relação ao NIP ($4,02 \text{ mg.g}^{-1}$) se deve ao efeito de impressão molecular, aumentando o número de sítios de adsorção no polímero impresso e consequentemente favorecendo a interação dos grupos carboxílicos presentes na matriz polimérica com grupos complementares da molécula de nicotina.

Rakic e colaboradores (2010) demonstraram que a nicotina pode ser adsorvida em estruturas zeólitas a partir de soluções aquosas. As zeólitas são materiais inorgânicos porosos compostos basicamente por silicatos de alumínio. Os autores sugeriram que a quantidade de nicotina adsorvida nas estruturas zeólitas foi maior conforme o aumento do caráter ácido do material e de sua porosidade.

A adsorção da nicotina nos MIPs, de acordo com os resultados apresentadas na isoterma de adsorção (Figura 24), é uma propriedade de fundamental importância para este trabalho, uma vez que as características de liberação da nicotina nas formulações avaliadas são em grande parte modificadas decorrente das interações entre fármaco e polímero. Sendo assim, a dessorção do fármaco a partir da matriz polimérica pode ser considerada um fator determinante na velocidade de liberação da nicotina a partir das formulações avaliadas.

5.3 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

5.3.1 Estudos de liberação *in vitro* da nicotina

Para avaliação das características de liberação dos MIPs foram preparadas formulações em veículos de diferentes polaridades, denominados como formulações 1A, 1B, 2A, e 2B, descritas anteriormente na Tabela 1. Ambos os sistemas foram preparados conforme a razão polímero/fármaco de 10:1. Os resultados dos estudos de liberação dos sistemas empregando MIPs em diferentes veículos estão apresentados como porcentagens liberadas na Figura 21.

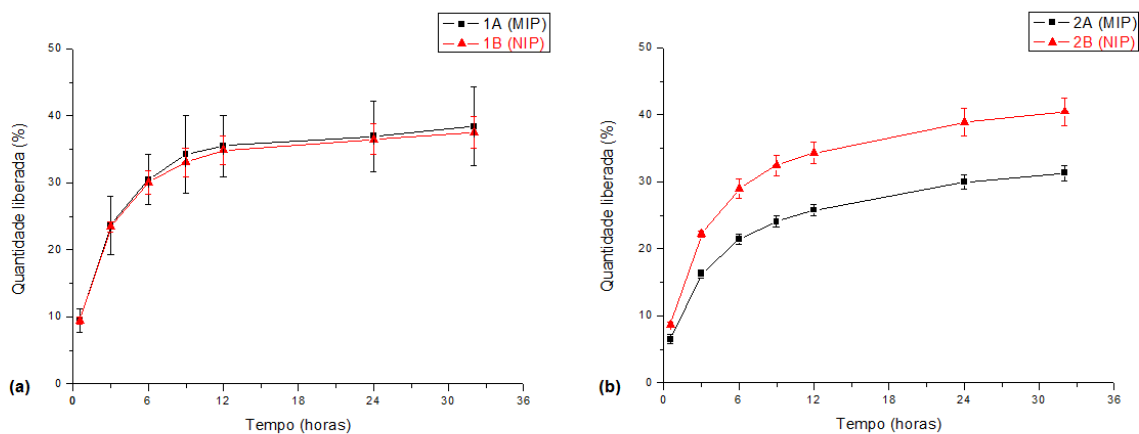


Figura 21 – Perfil de liberação da nicotina a partir de formulações preparadas em veículos de diferentes polaridades. As quantidades liberadas estão expressas em porcentagem (%). A Figura 21(a) apresenta os resultados obtidos para as formulações 1A e 1B preparadas em veículo hidrofílico e a Figura 21(b) apresenta os resultados obtidos para as formulações 2A e 2B preparadas em veículo lipofílico, n=3.

Os resultados foram avaliados em relação a diferentes modelos cinéticos. O coeficiente de correlação (r) determinados para os diferentes modelos cinéticos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Coeficientes de correlação determinados para diferentes modelos cinéticos para as curvas de liberação da nicotina em formulações preparadas em diferentes veículos.

Formulação*	Modelo Cinético		
	Ordem Zero	Primeira Ordem	Higuchi
1A	0,74816	0,65665	0,87859
1B	0,74413	0,65335	0,87498
2A	0,85489	0,73357	0,95041
2B	0,82708	0,70857	0,93282

* As formulações 1A e 1B foram preparadas veículo hidrofílico, enquanto as formulações 2A e 2B foram preparadas em veículo lipofílico.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 10, os resultados apresentaram maior ajuste ao modelo cinético de Higuchi. Na Tabela 11 estão apresentados os resultados dos estudos cinéticos conforme o modelo de Higuchi. Na Figura 22, foi apresentado graficamente o ajuste dos dados modelo de Higuchi.

Tabela 11 – Fluxo de liberação da nicotina ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1/2}$), a partir de formulações em diferentes veículos, seguindo o modelo de Higuchi.

Formulação*	Fluxo \pm DP ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1/2}$)
1A	147,7 \pm 15,2
1B	147,1 \pm 20,1
2A	133,3 \pm 4,7
2B	168,3 \pm 13,4

r, coeficiente de correlação; DP, desvio padrão.

* As formulações 1A e 1B foram preparadas veículo hidrofílico, enquanto as formulações 2A e 2B foram preparadas em veículo lipofílico.

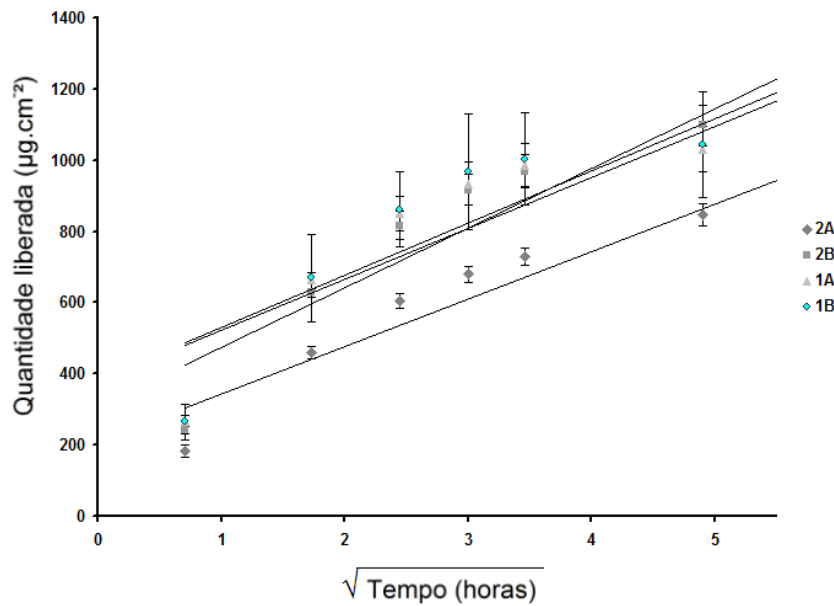


Figura 22 – Resultados de liberação da nicotina a partir das formulações 1A, 1B, 2A e 2B ao modelo cinético de Higuchi.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11 e na Figura 22, observa-se que a liberação de nicotina a partir das formulações em diferentes veículos seguiu o modelo cinético de Higuchi, tanto para o MIP quanto para o controle (NIP). Observa-se ainda que, de acordo com o modelo cinético de Higuchi, a velocidade de liberação do NIP foi significativamente maior que a do MIP no veículo hidrofóbico ($p=0,0254$). Porém, em veículo hidrofílico, não houve diferenças significativas entre a velocidade de liberação do polímero impresso em relação ao controle ($p=0,4845$). Além disso, pode-se observar que entre as formulações 1A e 1B, praticamente não houve aumento significativo da concentração liberada após o tempo de 12 horas de estudo, enquanto que para as formulações 2A e 2B, a liberação da nicotina continuou até o tempo final do estudo (32 horas).

Conforme apresentado anteriormente na Figura 21, as quantidades liberadas pelas formulações 1A e 1B foram de aproximadamente 34% no tempo de 12 horas e 38% no tempo de 32 horas, não sendo observadas diferenças entre as quantidades liberadas pelo MIP e NIP. Para a formulação 2A (contendo MIP), a quantidade liberada foi de 24% no tempo de 12 horas, enquanto que para a formulação 2B (contendo NIP) a liberação foi de 32% neste mesmo tempo. No tempo de 32 horas, enquanto 2B liberou 40% do conteúdo total de nicotina, 2A liberou apenas 31%.

Os resultados obtidos nos estudos de liberação da nicotina em formulações contendo MIPs em veículos com polaridades diferentes podem ser explicados devido ao mecanismo de reconhecimento molecular em diferentes meios. A capacidade de reconhecimento molecular dos MIPs pode ser modificada conforme a polaridade do meio em que está disperso. Sendo assim, geralmente em solventes com polaridade próxima a do solvente porogênico espera-se que a interação fármaco-polímero ocorra com maior afinidade e seletividade, pois os sítios de ligação impressos estão em uma conformação semelhante àquela do momento da etapa da síntese do polímero. A conformação complementar dos sítios de ligação à MM decorrente do efeito de impressão molecular pode estar associada deste modo às características de inchaço do polímero, decorrentes da interação com o meio solvente, o que leva a modificação de sua estrutura tridimensional (ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2004; TUNC et al, 2006).

Um estudo da liberação da nicotina a partir de dispersões em óleo mineral e em propilenoglicol a 5% (p/p) foi realizado para demonstrar que estes veículos não têm a propriedade de controlar a velocidade de liberação do fármaco, sendo esta propriedade uma característica dos polímeros empregados nas formulações. Os resultados deste estudo estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Quantidades liberadas de nicotina, a partir de dispersões do fármaco a 5% (p/p) em diferentes veículos e formulações preparadas em diferentes veículos.

	Q em 3 horas \pm DP (%)	Q em 24 horas \pm DP (%)
Óleo mineral	70,4 \pm 8,3	78,6 \pm 13,6
Propilenoglicol	41,9 \pm 0,7	41,4 \pm 0,3
Formulação 1A*	23,5 \pm 0,8	36,5 \pm 2,3
Formulação 1B*	23,7 \pm 4,3	37,0 \pm 5,3
Formulação 2A*	16,2 \pm 0,4	30,0 \pm 1,0
Formulação 2B*	22,2 \pm 0,6	38,9 \pm 2,0

Q, quantidade de nicotina liberada em porcentagem; DP, desvio padrão (n=3).

* As formulações 1A e 1B foram preparadas veículo hidrofílico, enquanto as formulações 2A e 2B foram preparadas em veículo lipofílico.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, os veículos avaliados não demonstraram influência significativa nas características de liberação da nicotina, uma vez que a variação na quantidade liberada entre 3 e 24 horas não foi diferente estatisticamente para os dois veículos testados ($p > 0,05$). De acordo com os resultados, a porcentagem de nicotina liberada a partir das dispersões em óleo mineral foi superior àquela liberada a partir das dispersões em propilenoglicol. Esta diferença está associada às características de partição do fármaco entre o veículo e o meio receptor. Assim, a nicotina tendeu a se partilhar entre o propilenoglicol (veículo hidrofílico) e o meio receptor (meio aquoso) de um modo praticamente equivalente. Quando dispersa em óleo mineral, a nicotina tendeu a apresentar maior afinidade pela fase aquosa, sendo partilhada preferencialmente para o meio receptor.

É interessante observar que, apesar das características de afinidade da nicotina pelos veículos demonstrarem que a liberação de maiores quantidades do fármaco ocorre em óleo mineral, os resultados de liberação a partir das formulações contendo os polímeros não seguem esta tendência. Conforme pôde ser observado na Tabela 12, menores porcentagens do fármaco foram liberadas a partir da matriz impressa da formulação 2A em relação à formulação 1A. O mesmo pôde ser observado para as matrizes não impressas (formulações 1B e 2B). Tal fato representa outra evidência do efeito de reconhecimento molecular sugerido pela interação do MIP com a nicotina em um meio não aquoso, o que promoveu uma maior retenção do fármaco na formulação 2A.

Uma vez que a formulação 2, em veículo lipofílico (óleo mineral), apresentou resultados promissores para o desenvolvimento dos sistemas para liberação transdérmica de nicotina, avaliaram-se modificações a partir desta formulação, alterando a razão polímero/ fármaco durante a preparação. Desta maneira, foram propostas as formulações 3A, 3B, 4A e 4B, descritas anteriormente na Tabela 1. Nas formulações 3A e 3B, a razão polímero/fármaco foi aumentada para 16:1, e nas formulações 4A e 4B utilizou-se uma razão polímero/fármaco de 8:1.

Os resultados dos estudos de liberação da nicotina a partir das formulações 3A, 3B, 4A e 4B estão apresentados como porcentagens liberadas na Figura 23.

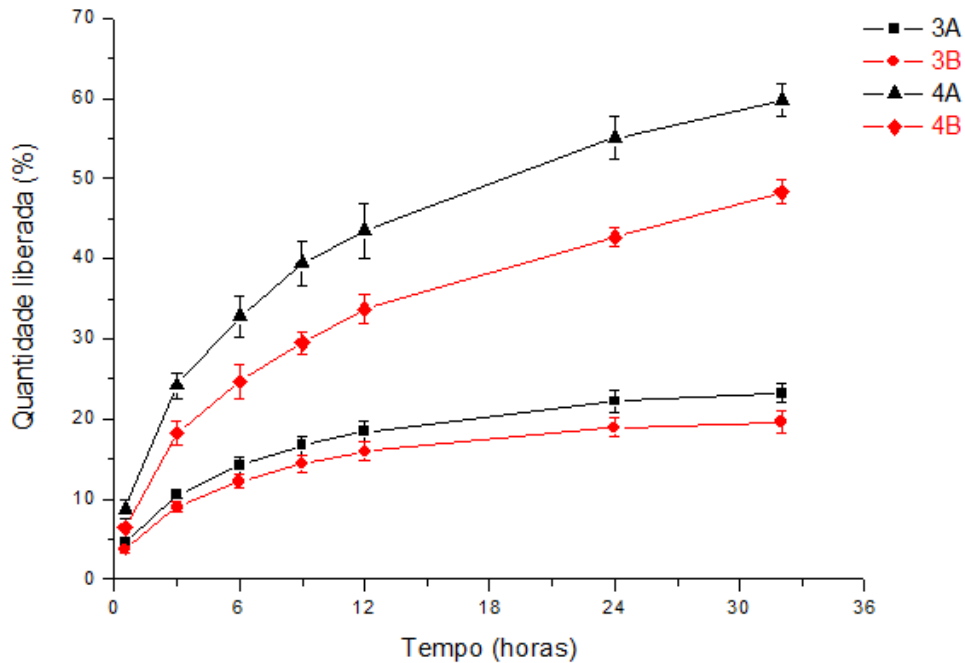


Figura 23 – Perfil de liberação da nicotina a partir das formulações 3A (MIP), 3B (NIP), 4A (MIP) e 4B (NIP), n=3. As quantidades liberadas estão expressas em porcentagem (%).

Os parâmetros cinéticos da liberação *in vitro* da nicotina a partir das formulações 3A, 3B, 4A e 4B também seguiram o modelo cinético de Higuchi. Os parâmetros cinéticos determinados conforme o modelo de Higuchi estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Parâmetros cinéticos da curva de liberação da nicotina, a partir de formulações com diferentes razões polímero/ fármaco, seguindo o modelo de Higuchi.

Formulação*	r	Fluxo \pm DP ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1/2}$)
3A	0,96810	89,2 \pm 5,5
3B	0,97236	104,1 \pm 6,3
4A	0,99175	232,1 \pm 7,0
4B	0,98532	284,6 \pm 8,0

r , coeficiente de correlação; DP, desvio padrão.

* As formulações 3A e 3B foram preparadas usando a razão polímero/fármaco de 16:1, enquanto as formulações 4A e 4B foram preparadas usando a razão polímero/fármaco de 8:1.

Analisando os resultados da Figura 22, bem como os resultados da Tabela 13, observou-se que a velocidade de liberação da formulação 3B (controle) foi significativamente maior que a velocidade de liberação da formulação 3A contendo MIP ($p=0,0182$). Da mesma forma, a velocidade de liberação da formulação 4B (controle) foi significativamente maior que a velocidade de liberação da formulação 4A contendo MIP ($p=0,0007$). É interessante observar que, conforme apresentado na Figura 22, as quantidades liberadas pela formulação 4A (contendo NIP) foram de aproximadamente 60% em 32 horas, enquanto que a formulação 4B (contendo MIP) liberou 48% de sua carga de nicotina neste mesmo tempo. Também foi observado que o aumento da razão polímero/fármaco na formulação promove uma diminuição na velocidade de liberação da nicotina, o que era esperado, pois uma maior quantidade de polímero em relação ao fármaco deve aumentar o controle da velocidade de liberação.

5.3.2 Estudos de permeação cutânea *in vitro* da nicotina

Estudos de permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir das formulações desenvolvidas também foram realizados. Os resultados de permeação cutânea da nicotina a partir das formulações 2A e 2B e das formulações 4A e 4B estão apresentados como porcentagens permeadas na Figura 24.

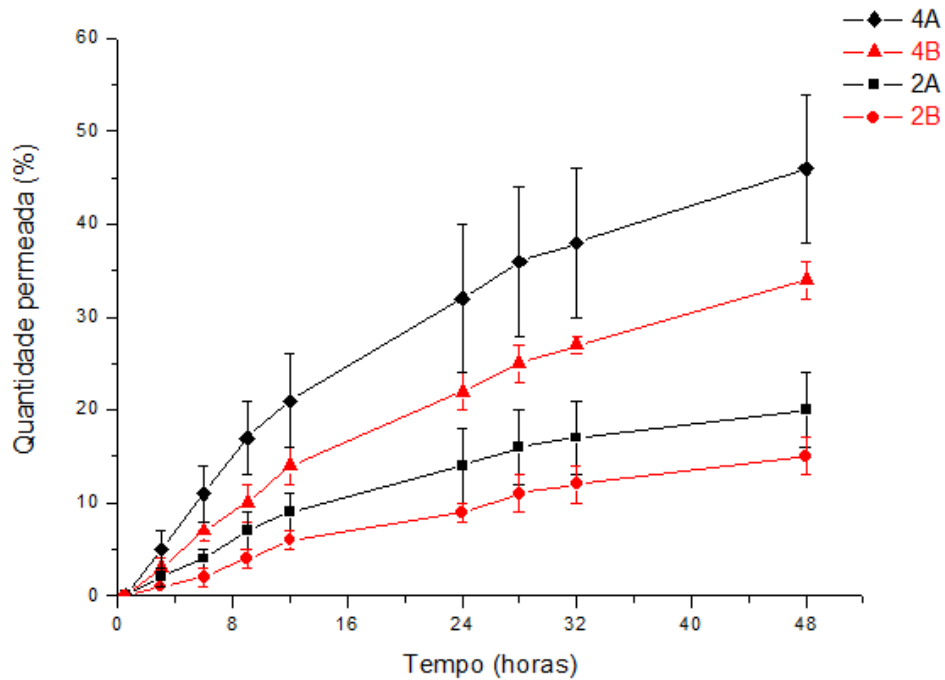


Figura 24 – Perfil de permeação cutânea da nicotina a partir das formulações 2A e 2B (n=3) e das formulações 4A e 4B (n=5). As quantidades liberadas estão expressas em porcentagem (%).

Os parâmetros cinéticos da permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir destas formulações 2A, 2B, 4A e 4B estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Parâmetros cinéticos da curva de permeação cutânea da nicotina, seguindo o modelo de Higuchi.

Formulação	r	Fluxo \pm DP ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1/2}$)
2A	0,99193	$73,0 \pm 8,9$
2B	0,99249	$99,2 \pm 20,8$
4A	0,99467	$163,0 \pm 9,1$
4B	0,99627	$220,3 \pm 40,7$

r , coeficiente de correlação; DP, desvio padrão.

Conforme pode ser observado na Figura 24, a formulação 2A, que foi preparada com MIP, apresentou menores quantidades permeadas de nicotina em 48h ($420,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; o que corresponde a 15% da carga total de nicotina) em relação

à formulação controle 2B, preparada com NIP ($566,6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; o que corresponde a 20% da carga total de nicotina). De maneira análoga, a formulação 4A, que foi preparada com MIP, apresentou menores quantidades permeadas de nicotina em 48h ($956,7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; o que corresponde a 34% da carga total de nicotina) em relação à formulação controle 4B, preparada com NIP ($1292,6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; o que corresponde a 46% da carga total de nicotina). Estes resultados indicam que os MIPs estão controlando a quantidade de nicotina que é liberada para a pele para que ocorra a permeação cutânea, confirmando os resultados encontrados anteriormente nos estudos de liberação e apresentados no item 5.3.1.

De acordo com a Tabela 14, o fluxo de nicotina através da pele foi menor para a formulação 2A, comparada com a formulação controle 2B. É importante ressaltar que a formulação 2A apresentou uma menor variabilidade dos dados com valores de DPR (%) inferiores a 2,0%, enquanto que a variabilidade para o polímero não-impresso foi em torno de 20,0% em cada tempo de amostragem. Neste caso, pode-se sugerir que o reconhecimento molecular característico das cavidades impressas do MIP pode promover um maior controle da liberação da nicotina na formulação 2A, enquanto que a ausência de cavidades impressas no NIP empregado na formulação 2B promove uma maior variabilidade dos resultados.

Similarmente para as formulações 4A e 4B, os resultados de permeação cutânea demonstram que o fluxo de nicotina através da pele foi menor quando foi empregada formulação com MIP ($p=0,0185$), como observado na Figura 24 bem como na Tabela 14, e a formulação 4B (controle) apresentou uma maior variabilidade dos dados em relação à formulação 4A (MIP). Isto demonstra que apesar das formulações empregando o NIP apresentarem uma interação com o fármaco e modificarem o seu perfil de liberação, a variabilidade dos dados pode comprometer a viabilidade da aplicação deste tipo de polímero, pois os desvios encontrados *in vitro* são um forte indício que haverá desvios na performance *in vivo* das formulações empregando o NIP. Uma vez que a variabilidade dos dados não foi observada para as formulações contendo o polímero impresso, esta característica pode ser considerada uma vantagem da utilização dos MIPs como adjuvantes tecnológicos em sistemas de liberação.

5.3.3 Avaliação da retenção cutânea da nicotina

A retenção cutânea da nicotina foi avaliada para determinar a concentração do fármaco que permaneceu na pele após os estudos de permeação cutânea (48 horas). Os resultados da concentração de nicotina retida na pele de orelha de porco, em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Quantidade de nicotina retida na estrutura da pele de orelha de porco após 48 horas.

Formulação	Concentração retida \pm DP ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
2A	75,71 \pm 5,37
2B	102,46 \pm 51,86
4A	138,36 \pm 20,03
4B	144,45 \pm 52,63

DP, desvio padrão (n=3).

De acordo com os resultados na Tabela 15, diferenças observadas entre as quantidades de nicotina permeada não estão associadas com diferenças na quantidade de fármaco retido na estrutura da pele, demonstrando que após o estabelecimento de um equilíbrio entre a quantidade de fármaco que vai sendo liberada da formulação e a quantidade de fármaco na pele, alcança-se um fluxo através da pele, dependente apenas da quantidade que está sendo liberada da formulação (BENOWITZ; HUKANNEN; JACOB III, 2009).

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na literatura, as maiores dificuldades relatadas durante o desenvolvimento de *patches* de nicotina devem-se principalmente à volatilidade do fármaco e à sua incompatibilidade química com muitos materiais convencionais utilizados no processo de fabricação. Muitos materiais podem ser dissolvidos ou degradados na

presença da nicotina, indicando incompatibilidades físicas e químicas, respectivamente. Como exemplo, polímeros adesivos acrílicos ou à base de silicone podem tornar-se pegajosos, perderem as suas propriedades adesivas ou serem carregados excessivamente com a nicotina, ocasionando um efeito *burst* durante a liberação. Vários polímeros policarbonatos, poliestirenos, politereftalato de etileno, polibutiratos, cloreto de polivinila, poliuretanos, copolímeros de estireno-acetato de vinila com altas porcentagens de acetato de vinila podem sofrer problemas como inchaço excessivo, desintegração e completa dissolução na presença de nicotina líquida. Por outro lado, muitos polímeros podem resistir ao ataque físico ou químico da nicotina, porém, estes polímeros apresentam alta permeabilidade à mesma, não permitindo a retenção da nicotina na formulação, que passa a ser liberada rapidamente. Neste caso, podem ser citados os filmes constituídos de copolímeros de estireno-acetato de vinila com porcentagens menores que 10% de acetato de vinila, que apesar de não sofrerem ataque químico da nicotina, são altamente permeáveis à mesma, não tendo efeito significativo no controle da velocidade de liberação do fármaco (BAKER, KOCHINKE, HUANG, 1990; DAVARAN et al, 2005).

Os MIPs podem ser considerados uma tecnologia com grande potencial para o desenvolvimento de formulações quando usados como adjuvantes farmacêuticos (ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2004). Entre os atributos considerados da aplicação desta tecnologia em sistemas de liberação pode-se destacar a alta estabilidade dos polímeros e as interações entre fármaco e polímero. Estas propriedades são de grande relevância para o desenvolvimento de novos produtos.

Diante destas considerações, pode-se constatar que a nicotina, considerada uma molécula modelo para a terapia transdérmica devido principalmente à sua alta permeabilidade, pode ter seu perfil de liberação/permeação controlado pelo uso de MIPs. Os estudos de caracterização do material permitiram demonstrar que interações de natureza física entre fármaco e polímero permitiram a modificação das características de liberação da nicotina a partir dos sistemas matriciais propostos, além de demonstrar a compatibilidade entre o fármaco e os polímeros avaliados, o que é uma propriedade de grande importância, uma vez que frequentemente relatam-se problemas decorrentes da incorporação da nicotina em formulações transdérmicas. Também se constatou que a aplicação dos MIPs apresentou potencial a ser explorado em sistemas de liberação transdérmica de fármacos, sendo um campo promissor para futuros estudos. Diante destas considerações,

pode-se ressaltar que este trabalho alcançou seus objetivos, uma vez que foi possível desenvolver e avaliar formulações transdérmicas para liberação de nicotina empregando MIPs como promissores adjuvantes farmacêuticos.

6 CONCLUSÕES

- A metodologia analítica por CLAE para determinação de nicotina em ensaios de liberação e permeação cutânea *in vitro* pode ser apropriadamente validada, apresentando seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão e estabilidade.
- MIPs puderam ser sintetizados pela metodologia proposta usando nicotina como molécula modelo.
- Estudos por espectroscopia de absorção na região do IV, CDV e TG junto aos estudos de isoterma de adsorção indicaram que interações físicas podem ser estabelecidas entre a nicotina e os polímeros sintetizados (MIP e NIP).
- Estudos por espectroscopia de absorção na região do IV, CDV e TG indicaram a compatibilidade entre a nicotina e os polímeros empregados como adjuvantes farmacêuticos nas formulações.
- A adsorção física da nicotina nas matrizes poliméricas (MIP e NIP) apresentou maior ajuste ao modelo de isoterma de adsorção de Langmuir, sendo que o polímero impresso apresentou maior capacidade de adsorção.
- Estudos empregando MEV indicaram que as partículas poliméricas apresentaram uma morfologia irregular, não sendo observadas diferenças entre as partículas impressas e não-impressas.
- Os sistemas para liberação transdérmica de nicotina empregando MIPs em veículo lipofílico apresentaram maior capacidade de controlar a velocidade de liberação do fármaco.
- Os sistemas para liberação transdérmica de nicotina apresentaram liberação e permeação *in vitro* com maior ajuste ao modelo cinético de Higuchi, em que

a liberação do fármaco é controlada por difusão a partir de uma matriz polimérica. Além disso, considerou-se que a liberação da nicotina a partir das formulações avaliadas é em grande extensão modificada pela dessorção do fármaco a partir das estruturas poliméricas.

- Estudos de permeação cutânea foram realizados por até 48 horas, demonstrando a liberação controlada e prolongada da nicotina a partir das formulações propostas.
- A avaliação dos MIPs como adjuvantes farmacêuticos apresentou resultados promissores, considerando que os polímeros desenvolvidos foram compatíveis com a nicotina e puderam ser usados no desenvolvimento de formulações transdérmicas para liberação controlada de nicotina.

REFERÊNCIAS

ALLENDER, C. J. et al. Pharmaceutical applications for molecularly imprinted polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 195, n. 15, p. 39-43, 2000.

ALVAREZ-LORENZO, C.; COCHEIRO, A. Molecularly imprinted polymers for drug delivery. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 804, n. 1, p. 231-245, 2004.

ANDERSSON, L. I. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 745, n. 1, p. 3-13, 2000.

AZARMI, S.; ROA, W; LOBENBERG. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosages forms. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 328, n. 1, p. 12-21, 2007.

BAKER, R. W.; KOCHINKE, F.; HUANG, C. Prolonged activity nicotine patch. US Patent no. 4,943,435. 1990.

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

BAZZO, G. C.; SILVA, M. A. S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 315-322, 2005.

BENOWITZ, N. L.; HUKANNEN, J.; JACOB III; P. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. **Handbook Experimental Pharmacology**, Germany, v. 192, p. 29-60, 2009.

BODHIBUKKANA, C. et al. Composite membrane of bacterially-derived cellulose and molecularly imprinted polymer for use as a transdermal enantioselective controlled-release system of racemic propranolol. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 43-56, 2006.

BYRNE, M. E.; PARK, K.; PEPPAS, N. A. Molecular imprinting within hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 149-161, 2002.

CARLISLE, M. R.; CHICOINE, M. L.; WYGANT, M. B. A stability-indicating high performance liquid chromatography assay for nicotine in transdermal patches. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 80, n. 1-3, p. 227-242, 1992.

CEVC, G; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 141, n. 3, p. 277-299, 2010.

CHAPUIS, F. Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers: Application to the extraction of triazines from complex matrices. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 804, n. 1, p. 93-101, 2004.

CHENG, Y. et al. Development of a novel nasal nicotine formulation comprising an optimal pulsatile and sustained plasma nicotine profile for smoking cessation. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 79, n. 1-3, p. 243-254, 2002.

CHOONARA, Y. E. et al. Mechanistic evaluation of alginate-HEC gelisphere compacts for controlled intrastriatal nicotine release in Parkinson's disease. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 98, n. 6, p. 2059-2072, 2009.

CONAGHEY, O. M.; CORISH, J. CORRIGAN, O. I. The release of nicotine from a hydrogel containing ion exchange resins. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 170, n. 2, p. 215-224, 1998.

CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecular imprinted polymers: synthesis and characterization. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 804, n. 1, p. 173-182, 2004.

CUNLIFFE, D.; KIRBY, A.; ALEXANDER, C. Molecularly imprinted drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, n. 12, p. 1836-1853, 2005.

DABROWSKI, A. Adsorption – from theory to practice. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 93, p. 135-224, 2001.

DAVARAN, S. et al. Development of a novel prolonged-release nicotine transdermal patch. **Pharmacological Research**, New York, v. 51, n. 3, p. 233–237, 2005.

DEVEAUGH-GEISS, A. M. et al Pharmacokinetic comparison of two nicotine transdermal systems, a 21-mg/24-hour patch and a 25-mg/16-hour patch: A randomized, open-label, single-dose, two-way crossover study in adult smokers. **Clinical Therapeutics**, USA, v. 32, n. 6, p. 1140-1148, 2010.

FARAHMAND, S.; MAIBACH, H. I. Transdermal drug pharmacokinetics in man: Interindividual variability and partial prediction. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 367, n. 1-2, p. 1-15, 2009.

FDA – Guidelines for industry: SUPAC-SS Nonsterile semisolid dosage forms. Scale-up and post approval changes: Chemistry, manufacturing and controls: *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation, may 1997.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B., ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 361-375, 2008.

FIGUEIREDO, E. C. et al. On-line molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in the urine of smokers. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 635, n. 1, p. 102-107, 2009.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 59, n. 11, p. 1152-1161, 2007.

GORE, A. V.; CHIEN, Y. W. The nicotine transdermal system. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, USA, v.16, n. 5, p. 599–615, 1998.

GUPTA, S. K. et al. Bioavailability and absorption kinetics of nicotine following application of a transdermal system. **British Journal of Clinical Pharmacology**, London, v.36, n. 3, p. 221–227, 1993.

HANSON, R. A primer on release-rate testing of semisolids. **Dissolution Technologies**, Hockessin, USA, v. 17, n. 4, p.33-35, 2010.

HWANG, B. et al. In vitro skin permeation of nicotine from proliposomes. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 49, n. 2-3, p. 177-184, 1997.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Publications: Guidelines. "Quality" Topics. **Q2 (r1) Validation of Analytical Procedures**: text and methodology. Geneva, 2005. 13 p.

JANTARAT, C. et al S-Propranolol imprinted polymer nanoparticle-on-microsphere composite porous cellulose membrane for the enantioselectively controlled delivery of racemic propranolol. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 349, n. 1-2, p. 212-225, 2008.

JENQUIN, M. R.; MCGINITY, J. W. Characterization of acrylic resin matrix films and mechanisms of drug-polymer interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 102, n. 1-2, p. 23-34, 1994.

KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Modeling transdermal drug release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 48, n. 2-3, p. 159-172, 2001.

LEWIS, D. et al. In vitro comparative studies of transdermal nicotine delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 148, n. 2, p. 177-189, 1997.

MAGHRABY, G. M. E.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 34, n. 4-5, p. 203-222, 2008.

MCCALLEY, D. V. Comparison of the performance of conventional C18 phases with others of alternative functionality for the analysis of basic compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 844, n. 1-2, p. 23-38, 1999.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's analysis of drug and poisons**: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 4 ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. 2609 p.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

NAIR, M. K. et al. Biomembrane permeation of nicotine: Mechanistic studies with porcine mucosae and skin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 86, n. 2, p. 257-262, 1997.

NAKAMURA, M. et al. Uniformly sized molecularly imprinted polymer for atropine and its application to the determination of atropine and scopolamine in pharmaceutical preparations containing *Scopolia* extract. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 37, n. 2, p. 231–237, 2005.

NIAURA, R. et al. Comparative efficacy of rapid-release nicotine gum versus nicotine polacrilex in relieving smoking cue-provoked craving. **Addiction**, AIBNgdon, UK, v. 100, n. 11, p. 1720-1730, 2005.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLIVIER, J. C.; RABOUAN, S.; COUET, W. In vitro comparative studies of two marketed transdermal nicotine delivery systems: Nicopatch® and Nicorette®. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 252, n. 1-2, p. 133-140, 2003.

PHARMACOPEIAL FORUM 2009. Topic and transdermal drug products – Product performance tests, Rockville, US, v. 35, n. 3, 2009.

PIGNATELLO, R.; FERRO, M.; PUGLISI, G. Preparation of solid dispersions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with acrylic polymers and studies on mechanisms of drug-polymer interactions. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, USA, v. 3, n. 2, p. 35-45, 2002.

PONGJANYAKUL, T.; SUKSRI, H. Nicotine-loaded sodium alginate –magnesium aluminum silicate (SA–MAS) films: Importance of SA – MAS ratio. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 80, n. 4, p. 1018-1027, 2010.

PONGJANYAKUL, T.; KHUNAWATTANAKUL, W.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Alginate-magnesium aluminum silicate films for buccal delivery of nicotine. **Applied Clay Science**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 242-250, 2009.

PONGJANYAKUL, T.; SUKSRI, H. Physicochemical characterizations and release studies of nicotine - magnesium aluminum silicate complexes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 74, n. 3-4, p. 103-113, 2009.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 11, p. 1261-1268, 2008.

PUOCI, F. et al. New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/ release in water media. **European Polymer Journal**, New York, v. 45, n. 6, 1634-1640, 2009.

RAZIK, V. et al. The adsorption of nicotine from aqueous solutions on different zeolite structures. **Water Research**, Amsterdam, v. 44, n. 6, 2047-2057, 2010.

ROSENBERG, R. T.; SIEGEL, S.; DAN, N. Release of highly hydrophilic drugs from poly(ϵ -caprolactone) matrices. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 107, n. 5, p. 3149-3156, 2008.

RUFINO, E. S.; MONTEIRO, E. E. C. Infrared study on methyl methacrylate-methacrylic acid copolymers and their sodium salts. **Polymer**, Switzerland, v. 44, n. 23, p. 7189-7198, 2003.

SAMBE, H. et al. Uniformly-sized, molecularly imprinted polymers for nicotine by precipitation polymerization. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1134, n. 1-2, p. 88-94, 2006.

SEGATELLI, M. G. et al. Cadmium ion-selective sorbent preconcentration method using ion imprinted poly(ethylene glycol dimethacrylate-co-vinylimidazole). **Reactive & Functional Polymers**, Amsterdam, v. 70, n. 6, p. 325–333, 2010.

SELLERGREN, B.; ALLENDER, C. J. Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, n. 12, p. 1733-1741, 2005.

SHAH, V. P. et al. *In vitro* release: Collaborative study using the vertical diffusion cell. **Pharmacoepial Forum**, Rockville, USA, v. 32, n.5, p. 1590-1596, 2006.

SHI, Y. et al. Selective solid-phase extraction of cholesterol using molecularly imprinted polymers and its application in different biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 42, n. 5, p. 549–555, 2006.

SHIFFMAN, S. et al. Rapid absorption of nicotine from new nicotine gum formulations. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Phoenix, USA, v. 91, n. 3, p. 380–384, 2009.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C. K.; SHAH, V. P. FIP/AAPS Guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosages forms. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, USA, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2003.

SINGH, N. et al. Formulation and statistical optimization of novel double-incorporated PLA-PLGA microparticles within an alginate-pectinate platform for the delivery of nicotine. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 23, n. 2, p. 153–167, 2006.

SUEDEE, R. et al. Development of a reservoir-type transdermal enantioselective-controlled delivery system for racemic propranolol using a molecularly imprinted polymer composite membrane. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 129, n. 3, p. 170-178, 2008.

_____. Development of a pH-responsive drug delivery system for enantioselective-controlled delivery of racemic drugs. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 142, n. 1, p. 122-131, 2010.

SUKSAEREE, J. et al. Characterization, *in vitro* release and permeation studies of nicotine transdermal patches prepared from deproteinized natural rubber latex blends. **Chemical Engineering Research and Design**, Washington, v. 90, n. 7, p. 906-914, 2011.

TAMBWEKAR, K. R.; KAKARIYA, R. B.; GARG, S. A validated high performance liquid chromatographic method for analysis of nicotine in pure form and from formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 32, n. 3, p. 441–450, 2003.

TAN, Y. et al. A study of a new TSM bio-mimetic sensor using a molecularly imprinted polymer coating and its application for the determination of nicotine in human serum and urine. **Bioelectrochemistry**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 141–148, 2001.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP (“Molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.

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

TUNC, Y. et al. Comonomer effects on binding performances and morphology of acrylate-based imprinted polymers. **Polymer**, Switzerland, v. 47, n. 20, p. 6931-6940, 2006.

TYNDALE, R. F.; SELLERS, E. M. Variable CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior and risk. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, USA, v.29, n. 4, 2001.

UMPLEBY II, R. J. Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 804, n. 1, p. 141-149, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 35 ed. NATIONAL FORMULARY 30. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2012.

VALENTA, C.; AUNER, B. G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 279-289, 2004.

VENKATRAMAN, S.; GALE, R. Skin adhesives and skin adhesion 1. Transdermal drug delivery systems. **Biomaterials**, Oxford, UK, v. 19, n. 13, 1119-1136, p. 1998.

WALTERS, K. A.; BRAIN, K. R. Drug formulation and transdermal systems. In: WALTERS, K. A. **Dermatological and transdermal formulations**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. cap. 7, p. 338-344.

WHITCOMBE, M. J.; VULFSON, E. N. Imprinted polymers. **Advanced materials**, Germany, v. 13, n. 7, p. 467-478, 2001.

WHITE, H. K.; LEVIN, E. D. Chronic transdermal nicotine patch treatment effects on cognitive performance in age-associated memory impairment. **Psychopharmacology**, Germany, v. 171, n. 4, p. 465-471, 2004.

WILSON, A. L. et al. Nicotine patches in Alzheimer's disease: Pilot study on learning, memory, and safety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Phoenix, USA, v. 51, n. 2-3, p. 509-514, 1995.

WOKOVICH, A. M. et al. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 1-8, 2006.

WOLF, R.; TUZUN, B.; TUZUN, Y. Adverse skin reactions to the nicotine transdermal system. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, USA, v. 16, n. 5, p. 617-623, 1998.

WU, C. et al. Detection of nicotine based on molecularly imprinted TiO₂-modified electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, n. 1, p. 119-126, 2009.

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

YANG, J. et al. Selective hair analysis of nicotine by molecular imprinted solid-phase extraction: An application for evaluating tobacco smoke exposure. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, UK, v. 45, n. 6, 896-903, 2007.

ZEVIN, S.; GOURLAY, S. G.; BENOWITZ, N. L. Clinical pharmacology of nicotine. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, USA, v. 16, n. 5, p. 557-564, 1998.