

MARIA EMMA CONTIN OLIVEIRA DE ANTONIO

**PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*
COMO FERRAMENTA AUXILIAR PARA O ESTUDO DE
FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS DE CETOCONAZOL PARA
APLICAÇÕES TÓPICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF – do Setor de Ciências da Saúde, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná – UFPR – como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Mayumi Eliza O. Sato

CURITIBA

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

À Mayumi,
pelo companheirismo de sempre.

Ao meu marido Eliseu
pela paciência e dedicação.

Aos meus filhos, Fernanda, Lucas e Ricardo,
pelas horas em que eu não estive presente.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela presença constante.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial as professoras. Dr^a. Almeriane Maria Weffort Santos e Dr^a Márcia do Rocio Duarte, prezadas coordenadora e vice-coordenadora do mesmo, pela oportunidade proporcionada viabilizando este trabalho de pesquisa, e a sra. Regina Montrezol, secretaria do Programa, sempre pronta a atender com carinho todas as solicitações feitas.

À Profa. Dra. Mayumi Eliza Otsuka Sato, pelos conhecimentos, dedicação e amizade transmitidos durante toda a orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento, pela bondade e pelos preciosos esclarecimentos prestados.

Aos Profs.drs. Leticia Carpentieri e Itamar Francisco Andreazza pelo carinho e estímulo a mim demonstrado.

À Farmacêutica Maria da Graça Teixeira de Toledo pela alegria, amizade e ajuda nas análises.

Às estagiárias, Fernanda Venâncio da Silva e Suélyn Féderle, pela amizade e pelo apoio na execução das tarefas.

Aos meus pais, Agostinho Alves de Oliveira e Elizabeth Contin de Oliveira, pelo que me proporcionaram estes anos todos.

À minha irmã Maria Ester de Oliveira Kloss, pelo incentivo e auxílio.

Ao meu marido, Eliseu Ricardo de Antonio, e meus filhos, Fernanda Oliveira de Antonio, Lucas Oliveira de Antonio e Ricardo Oliveira de Antonio, pelo amor e dedicação demonstrados a todo o momento.

A todos que direta e indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

RESUMO

Os antifúngicos imidazólicos, por seu largo espectro de ação e baixa toxicidade são usados em grande número de formulações para uso tópico e sistêmico. Os produtos dermatológicos utilizando veículos emulsionados, são eficazes como carreadores de fármacos antifúngicos, e de boa aceitação pela população. O cetoconazol é um imidazólico utilizado em grande número de formulações do mercado, e foi o fármaco selecionado para este trabalho, por possuir um medicamento de referência, Nizoral®, e medicamentos genéricos na forma farmacêutica emulsão para uso tópico, todos devidamente registrados e de acordo com os critérios e atribuições previstos na legislação brasileira. Estas formulações foram objetos deste estudo, cuja proposta foi reproduzir os parâmetros organolépticos e físicos do medicamento de referência, em formulações simuladas no laboratório, e nestas e nas formulações genéricas selecionadas, tentar elucidar questões como modo de elaboração e incorporação do fármaco, e a relação destas variáveis tecnológicas, com os diferentes excipientes disponíveis e normalmente utilizados no preparo de formas farmacêuticas emulsionadas. Por metodologia *in vitro*, foi avaliada a permeação cutânea das formulações mencionadas, e para sua realização utilizaram-se células de difusão, onde no compartimento doador trabalhou-se com duas tomadas de amostra (2,0g e 0,2g). A membrana permeante foi a pele de orelhas de porco, e a solução receptora, tampão fosfato pH 7,4 adicionado de etanol 10%. As coletas para o estudo de permeação cutânea foram feitas em tempos específicos. Nos intervalos de 1h, 3h, 6h, 12h e 24h, foram coletadas as membranas expostas à permeação, para a verificação da retenção cutânea. As análises foram realizadas por CLAE com detecção no UV, no comprimento de onda de 225nm, utilizando como fase móvel, metanol e solução de acetato de amônio 0,5% (20:80).

Das considerações feitas e das observações práticas, pôde-se concluir que embora em conformidade com as normas vigentes, os medicamentos genéricos possuem diferentes comportamentos, decorrentes das diversas variáveis tecnológicas a que se submetem, e tais diferenças, podem acarretar comprometimento na eficácia do produto, fatos que devem ser comprovados com testes clínicos. Sugere-se a criação de procedimentos de controle de qualidade específicos para os semi-sólidos, considerando o enorme potencial cutâneo como via de liberação para novos medicamentos.

Palavras-chave: Cetoconazol; Absorção cutânea; Estudo *in vitro* de permeação cutânea; Medicamentos Genéricos.

ABSTRACT

The imidazolic anti-fungals, due to their large spectrum of action and low toxicity, are used in great number of formulations for topical and systemic use. The dermatologic products using emulsified vehicles are effective as carriers for antifungal medicines, and highly accepted by population. The cetoconazol is an imidazolic compound used in great number of market formulations, and it was the selected drug in this work, for its presence in the reference medicine Nizoral®, a generic pharmaceutical form of emulsion for topical use, all properly registered and in agreement with the criteria and attributions foreseen in the Brazilian legislation. The aim of this study was to reproduce the physical and organoleptic parameters of the reference medicine and in simulated formulations, and to try to elucidate subjects such as ways of medicine elaboration and incorporation, and the relationship of these varied technological variables with the different available excipients normally used in the preparation of emulsified pharmaceutical products.

The evaluation of the mentioned formulations was investigated by using an *in vitro* skin permeation method, and in order to do this, diffusion cells was used, so the donor compartment was filled out with two samples (2,0g and 0,2g). The permeant-membrane used was the pig ear skins, and the receptor solution was the phosphate buffer solution, pH 7.4, added with 10 % ethanol. At pre-established time intervals samples of the medium were collected for the study of cutaneous permeation. At intervals of 1, 3, 6, 12 and 24 hr, the exposed membranes were removed, to monitor skin penetration. The analyses were carried out by HPLC with UV detection at 225 nm wavelength, using methanol and 0.5 % ammonium acetate solution (20:80) as mobile phase. From the considerations and practical observations it can be concluded that, although in accordance with the effective norms, the generic medicines possess different behaviors, as a result of submission to several technological variables, and these differences can compromise the effectiveness of the product, facts that should be proven with clinic tests. It is suggested the creation of specific quality control procedures for the semi-solids, considering the skin as having enormous potential as route for new medicines.

Keywords: Ketoconazole; Skin absorption; *In vitro* study of Percutaneous absorption; Generic medicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Esquema representativo das vias de penetração do fármaco através do estrato córneo (via transcelular e via intercelular)	26
Figura 02	Força de cisalhamento aplicada sobre um fluido	41
Figura 03	Curva de fluxo de fluidos não newtonianos de propriedades dependentes do tempo	44
Figura 04	Estrutura molecular do cetoconazol	49
Figura 05	Esquema da célula de difusão (Microette Plus-Hanson Research [®]) empregada nos estudos de liberação e permeação cutânea <i>in vitro</i>	59
Figura 06	Orelhas de porco prontas para dissecação (a) e (b) e após dissecação (c)	80
Figura 07	Orelhas de porco prontas para o estudo do <i>in vitro</i> de permeação cutânea	81
Figura 08	Sistema de difusão contendo 6 células	81
Figura 09	Perfil cromatográfico característico para o fármaco cetoconazol	86
Figura 10	Cromatogramas ilustrando a curva analítica de calibração do cetoconazol em metanol	87
Figura 11	Curva analítica de calibração do cetoconazol	88
Figura 12	Curva de fluxo da formulação de referência (E)	97
Figura 13	Curva da viscosidade da formulação de referência (E)	97
Figura 14	Cromatograma do cetoconazol padrão em solução receptora	105
Figura 15	Cromatogramas das concentrações utilizadas na curva analítica do cetoconazol em solução receptora	106
Figura 16	Curva analítica do cetoconazol em solução receptora	107
Figura 17	Estudo <i>in vitro</i> de permeação cutânea da formulação (E) nas 24h	108
Figura 18	Estudo <i>in vitro</i> de permeação cutânea do cetoconazol na formulação (A1) nas 24h	109
Figura 19	Estudo <i>in vitro</i> de retenção cutânea do cetoconazol na formulação (A1) nas 24h	112

Figura 20	Estudo in vitro de retenção cutânea do cetoconazol da formulação (E) nas 24h	112
Figura 21	Cromatogramas característicos da retenção cutânea do cetoconazol nas formulações não-iônicas simuladas no laboratório	113
Figura 22	Cromatogramas característicos da retenção cutânea das especialidades farmacêuticas do comércio	117
Figura 23	Comparativo entre a quantidade retida e a não retida de cetoconazol na formulação(E)-amostra 1-24h (%)	120
Figura 24	Comparativo entre a quantidade retida e a não retida de cetoconazol na formulação(E)-amostra 2 - 24h (%)	120
Figura 25	Perfil de retenção cutânea (%) nas tomadas de amostra 1 e 2-formulação (E)	121
Figura 26	Perfil de retenção cutânea (%) nas tomadas de amostra 1 e 2-formulação (A1)	121
Figura 27	Cálculo da equação da reta para a obtenção do tempo de meia-vida da formulação (E)-tomada de amostra 1	122
Figura 28	Cálculo da equação da reta para a obtenção do tempo de meia-vida da formulação (E) - tomada de amostra 2	123
Figura 29	Valores de $t_{1/2}$ para todas as formulações na tomada de amostra 1 nas 24h	124
Figura 30	Valores de $t_{1/2}$ para todas as formulações na tomada de amostra 2 nas 24h	124
Figura 31	Valores de $t_{1/2}$ para todas as formulações em estudo na tomada de amostra 1 nas 24h (exceto G)	126
Figura 32	Valores de $t_{1/2}$ para todas as formulações em estudo na tomada de amostra 2 nas 24h (exceto G)	126
Figura 33	Interferência da tomada de amostra no tempo de meia-vida	127
Figura 34	Interferência dos emolientes no tempo de meia-vida	127
Figura 35	Interferência dos emolientes, tomada de amostra e tempo de meia-vida	128
Figura 36	Interferência do modo de elaboração das emulsões no tempo de meia-vida	128
Figura 37	Interferência do modo de elaboração e tomada de amostra no tempo de meia-vida	129
Figura 38	Interferência do modo de incorporação do fármaco no tempo de meia-vida	129

Figura 39	Interferência do modo de incorporação e tomada de amostra no tempo de meia-vida	130
Figura 40	Valor Total (VT) da retenção cutânea média ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	131
Figura 41	Análise por regressão linear da formulação (A1) em relação à formulação (E) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Curva analítica do cetoconazol em metanol	70
Tabela 02	Composição das especialidades farmacêuticas.	71
Tabela 03	Composição das especialidades farmacêuticas (F), (G), (I)	72
Tabela 04	Formulações não-iônicas segundo o sistema EHL.	75
Tabela 05	Efeito dos emolientes na formulação não-iônica contendo o fármaco solubilizado	76
Tabela 06	Formulações não-iônicas contendo cera auto emulsionante	77
Tabela 07	Componentes da Solução Receptora (SR)	78
Tabela 08	Curva analítica do cetoconazol em solução receptora	79
Tabela 09	Análise por CLAE da solução padrão do cetoconazol	86
Tabela 10	Determinação das características organolépticas e físico-químicas da formulação (E)	95
Tabela 11	Estudo do comportamento reológico da formulação (E)	96
Tabela 12	Parâmetros de qualidade das formulações genéricas	98
Tabela 13	Composição da formulação base não iônica pelo sistema EHL	100
Tabela 14	Composição da formulação base não-iônica contendo cera auto emulsionante	101
Tabela 15	Parâmetros de qualidade das formulações não iônicas simuladas no laboratório	102
Tabela 16	Teor em cetoconazol nas formulações	104
Tabela 17a	Resultados do estudo de retenção cutânea do cetoconazol nas formulações simuladas no laboratório	110
Tabela 17b	Resultados do estudo de retenção cutânea do cetoconazol na formulação de referência (E) e nas formulações simuladas no laboratório	111
Tabela 18a	Resultados do estudo de retenção cutânea do cetoconazol nas especialidades farmacêuticas genéricas do comércio	116

Tabela 18b	Resultados do estudo de retenção cutânea do cetoconazol nas especialidades farmacêuticas genéricas do comércio	116
Tabela 19a	Resultados do estudo das formulações após o término do estudo <i>in vitro</i> (%)	119
Tabela 19b	Resultados do estudo das formulações após o término do estudo <i>in vitro</i> (%)	119
Tabela 20	Valores dos $t_{1/2}$ (1) e $t_{1/2}$ (2) para todas as formulações	123
Tabela 21	Valores dos $t_{1/2}$ (1) e $t_{1/2}$ (2) para todas as formulações exceto (G)	125
Tabela 22	Médias das retenções cutâneas nas tomadas de amostras 1 e 2	131
Tabela 23	Análise da retenção cutânea por regressão linear	133
Tabela 24	Porcentuais de retenção cutânea do cetoconazol na pele nas diversas formulações	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Água em óleo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
O/A	Óleo em água
OECD	Organization for Economic Co-Operation and development
ppm	Partes por milhão
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	PELE	21
3.2	BIOQUÍMICA DA PELE	22
3.2.1	Queratinização	22
3.2.2	Lipídios da Superfície da Pele	23
3.3	FUNÇÃO BARREIRA E A PERMEABILIDADE CUTÂNEA	24
3.3.1	Passos Importantes na Absorção Percutânea	26
3.3.2	Interferentes na Absorção Cutânea	28
3.4	FORMAS FARMACÊUTICAS SEMI-SÓLIDAS DE USO TÓPICO	34
3.4.1	Emulsões	34
3.4.1.1	Sistema EHL	39
3.4.1.2	Estabilidade das emulsões	40
3.4.1.3	Reologia das emulsões	40
3.5	MEDICAMENTOS GENÉRICOS E MEDICAMENTO REFERÊNCIA	45
3.6	AGENTES ANTIFÚNGICOS	47
3.6.1	Imidazóis	47
3.6.2	Cetoconazol	48
3.6.3	Farmacodinâmica e Farmacocinética	50
3.6.4	Determinação Analítica do Cetoconazol em Preparações Farmacêuticas	51
3.7	ESTUDOS DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	54
3.7.1	Métodos de Estudo da Permeação e Retenção Cutânea de Fármacos	54
3.7.2	Fundamentos da Permeação Cutânea <i>In vitro</i>	56
3.7.3	Aparelhos utilizados nos Estudo de Permeação Cutânea <i>In vitro</i>	58
3.7.4	Membranas e Soluções Receptoras Utilizadas no Estudo de Permeação Cutânea <i>In vitro</i> , em Células Tipo Franz	60

4	MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1	MATERIAIS	66
4.1.1	Fármacos e Medicamentos em Estudo	66
4.1.2	Matérias- primas e Reagentes	66
4.1.3	Equipamentos e Utensílios	67
4.2	MÉTODOS	68
4.2.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	68
4.2.1.1	Condições cromatográficas	68
4.2.1.2	Fase Móvel	69
4.2.2	Construção da curva analítica do cetoconazol por CLAE	69
4.3	COMPOSIÇÃO QUALITATIVA DAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS.	71
4.3.1	Preparo das Formulações para a determinação do Teor em Cetoconazol	72
4.3.2	Determinação das Características Organolépticas e Físico-químicas.	73
4.3.3	Estudo do Comportamento Reológico	73
4.4	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES NÃO-IÔNICAS SIMULADAS NO LABORATÓRIO	74
4.4.1	Desenvolvimento de Formulações Não-lônicas pelo sistema EHL	74
4.4.1.1	Desenvolvimento de formulações não-iônicas contendo diferentes emolientes	75
4.4.2	Formulações Não-lônicas contendo Cera Auto Emulsionante	76
4.5	ESTUDO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i> DO CETOCONAZOL.	78
4.5.1	Escolha da Solução Receptora	78
4.5.2	Elaboração da Curva Analítica	79
4.5.3	Preparo das Membranas Permeantes.	79
4.5.4	Ensaio de Permeação Cutânea <i>In vitro</i> do cetoconazol	81
4.5.5	Estudo de Retenção Cutânea <i>In vitro</i> do Cetoconazol	82
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85

5.1	MÉTODO ANALÍTICO	85
5.2	CURVA ANALÍTICA DO CETOCONAZOL POR CLAE	85
5.3	ANÁLISE PRELIMINAR DAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS	89
5.3.1	Composição Geral	89
5.3.2	Modo de Elaboração	90
5.3.3	Incorporação do Fármaco Cetoconazol	91
5.3.4	Elementos Oleosos das Formulações	92
5.4	AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS DE QUALIDADE DA FORMULAÇÃO DE REFERENCIA (E) DAS DEMAIS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS DO COMÉRCIO	94
5.4.1	Teor em Cetoconazol	94
5.4.2	Características Organolépticas e Físico-químicas da Formulação de Referência (E) e das Especialidades Farmacêuticas do Comércio	94
5.4.3	Estudo do Comportamento Reológico da Formulação de Referência (E) e das Especialidades Farmacêuticas do Comércio	96
5.5	SELEÇÃO DAS EMULSÕES NÃO IÔNICAS SIMULADAS NO LABORATÓRIO	100
5.5.1	Avaliação dos Parâmetros de Qualidade das Formulações Não-Iônicas Simuladas no Laboratório	102
5.5.2	Comparativo dos Teores de Cetoconazol Obtidos por CLAE Para Todas as Formulações	103
5.6	ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA	105
5.6.1	Elaboração da Curva Analítica do Cetoconazol em Solução Receptora	105
5.6.2	Membrana Permeante	106
5.7	ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA	108
5.7.1	Análise da Solução Receptora	108
5.7.2	Análise da Membrana Permeante	110
5.7.3	Análise das Formulações Após o Término do Estudo <i>In vitro</i>	118
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DE RETENÇÃO CUTÂNEA	122
5.8.1	Cálculo da Cinética de Retenção Cutânea	122
5.8.2	Análise da Quantidade Total de Fármaco Retido na Pele nas 24h	130

5.8.3	Cálculo do Porcentual de Retenção Cutânea por Regressão Linear das Diferentes Formulações em Função da Referência (E)	132
6	CONCLUSÕES	135
	REFERÊNCIAS	137

1 INTRODUÇÃO

Estudos *in vitro* de liberação e absorção cutânea, são extremamente importantes na otimização das técnicas de elaboração e da escolha adequada dos componentes das formas farmacêuticas de liberação dérmica (CHIEN, 2005). Não possuem interferentes como nos métodos *in vivo* (BARRY, 1983) e freqüentemente são realizados para a verificação do comportamento de diferentes veículos das formulações (LEVEQUE et al., 2003, PERSHING; CORLETT; JORGENSEN, 1993).

As vantagens dos métodos *in vitro* sobre os *in vivo* são que nos primeiros podem ser controladas as condições de estudo, não havendo os interferentes biológicos; além de não serem dispendiosos e facilmente realizáveis (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007, CHIEN, 2005). Nos estudos *in vitro* podem-se usar tanto peles humanas como as de espécies animais, sendo a pele de orelha de porco muito utilizada, por possuir características semelhantes às da pele humana (ANDEGA; KANIKKANNAN; SINGH, 2001, AULTON, 2005).

Em produtos dermatológicos, onde é desejável que o fármaco administrado tenha pequeno fluxo e alta retentividade através das membranas (TOUITOU; MEIDAN; HORWITZ, 1998), estes estudos *in vitro* são realizados de modo que o fármaco seja liberado da formulação onde está veiculado, e se difunda através de uma membrana para uma solução receptora, a qual deve garantir condições termodinâmicas favoráveis ao fármaco (LÓPEZ et al., 1998, OECD, 2004).

Os estudos *in vitro* são uma ferramenta muito valiosa e determinante na avaliação do comportamento de formulações semi-sólidas de uso tópico, diante das inúmeras variáveis que comprometem o processo de fabricação. Através deles se obtém dados que possibilitam um maior entendimento dos fatos ocorridos, desde a aplicação na pele, liberação do fármaco da forma farmacêutica, retenção e absorção cutânea. (CAMPOS, 1994, NOKHODCHI et al., 2003).

Para este trabalho, o fármaco selecionado foi o cetoconazol, um antifúngico imidazólico com largo espectro de ação e alguma atividade antibacteriana (FITZPATRICK et al., 1997, FUCHS; WANNMACHER, 1998, KOROLKOVAS, 1998). Justifica-se a ênfase às formulações tópicas com cetoconazol, por serem eficazes em muitos tratamentos de micoses superficiais de pele e mucosas, sem significantes efeitos adversos. O fármaco cetoconazol pela rota oral, ao contrário, pode provocar efeitos indesejáveis como hepatotoxicidade e interferência no metabolismo da testosterona (KOROLKOVAS, 1998, LOW; WANGBOONSKUL, 1999; ROYCHOWDHURY; DAS, 1996).

As formulações emulsionadas oferecem boa aderência à pele e normalmente apresentam comportamento reológico característico do tipo pseudoplástico que faz com que se deformem e fluam com facilidade quando aplicadas à superfície cutânea, sendo as mais utilizadas como veículo dermatológico (LABA, 1993).

No Brasil o Nizoral® é descrito como medicamento referência para o fármaco cetoconazol (BRASIL, 2007), sendo o creme dermatológico utilizado pela via tópica. Vários medicamentos genéricos são disponíveis no mercado brasileiro para uso tópico, na mesma concentração e forma farmacêutica que o medicamento de referência (BRASIL, 2007). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003), os medicamentos genéricos de aplicação tópica estão dispensados de estudos de bioequivalência (Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência), bastando a comprovação da equivalência farmacêutica para manter a intercambialidade destes com o medicamento de referência (BRASIL, 2003).

Não há ainda método analítico reconhecido oficialmente, para a quantificação do cetoconazol em emulsões, embora diferentes técnicas analíticas sejam propostas na literatura científica para este fim (KEDOR-HACKMAN et al., 2006, VELIKINAC et al., 2004).

A adequada elaboração e utilização das bases dermatológicas, a verificação da interferência dos componentes nelas utilizados, em especial os emolientes e emulsionantes, a forma de incorporação do fármaco e a importância dos testes *in vitro* na verificação da liberação e permeação de fármacos de uso tópico, levaram à escolha do objeto de estudo deste trabalho onde formulações contendo o antifúngico cetoconazol simuladas no laboratório e outras especialidades farmacêuticas contendo o fármaco cetoconazol, foram analisadas comparativamente ao medicamento referência.

As análises realizadas tiveram como objetivo, além de demonstrar diferenças no comportamento quanto à liberação e retenção cutânea do fármaco cetoconazol, realçar a importância dos estudos *in vitro* como suporte na pesquisa e controle de qualidade de formulações de uso tópico contendo este fármaco, para as quais não há exigência de estudos biofarmacêuticos por parte da ANVISA.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo averiguar o comportamento decorrente das variáveis tecnológicas a que são submetidas as formulações farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico, e o comprometimento destas com a eficácia do produto final. Para tanto se avaliou a liberação e absorção percutânea do cetoconazol em estudo *in vitro*, nas formulações simuladas no laboratório e nas especialidades farmacêuticas disponíveis no mercado brasileiro.

2.1.1 Objetivos Específicos

- a) selecionar método analítico para a quantificação do cetoconazol em formas farmacêuticas emulsionadas;
- b) analisar o medicamento de referência (Nizoral®), as especialidades farmacêuticas contendo o fármaco cetoconazol e as formulações desenvolvidas no laboratório com relação aos aspectos organolépticos, teor do fármaco, pH e viscosidade;
- c) realizar para cada formulação, dois ensaios por metodologia *in vitro* de liberação, retenção e absorção cutânea do cetoconazol, tomando como variáveis as tomadas de amostra;
- d) verificar a interferência dos emolientes e emulsionantes, modo de elaboração e modo de incorporação do fármaco, por meio dos estudos *in vitro* de permeação e retenção cutânea.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A estrutura adotada para o referencial teórico segue um encaminhamento lógico para possibilitar o entendimento das variáveis que compõem o processo de absorção cutânea. Desta forma, suas relações com o tema proposto visam:

- a) possibilitar a compreensão, sobre características e funções da pele, e fatores que interferem na absorção cutânea;
- b) conhecer sobre os medicamentos antifúngicos tópicos, em especial com cetoconazol; propor formulações e analisá-las em função de um medicamento de referência;
- c) conhecer sobre as metodologias *in vitro* de permeação cutânea, e possibilitar as análises dos medicamentos simulados e referência do comércio, em confronto com a legislação para genéricos vigente no País.

3.1 PELE

A pele é o mais extenso órgão do corpo humano, aproximadamente 5% do peso total e o principal meio de comunicação com o exterior. Em um indivíduo adulto de peso e altura médios, a superfície da pele é de 2m², seu peso é correspondente a 4,2 kg, e recebe cerca de um terço do sangue circulante no corpo.

Constitui um limite anatômico e uma barreira de proteção contra ataques físicos, químicos e contra microorganismos, imprescindível à existência de vida, além de outras características peculiares que variam com sua localização e função específicas (CHIEN, 2005, FITZPATRICK, 1997).

Microscopicamente a pele é um órgão composto de multicamadas, mas é geralmente descrito por três camadas, que num corte perpendicular visto de fora para dentro, são: epiderme, derme e hipoderme.

3.2 BIOQUÍMICA DA PELE

O pH da superfície cutânea é para muitos autores, um importante indicador funcional da pele e sua determinação na superfície cutânea, modernamente por metodologias cada vez menos invasivas de estudo cutâneo, têm motivado muitos pesquisadores. Um exemplo de moderno equipamento é o *Phmeter* que avalia o pH superficial da pele, por potenciometria direta, isto é, por meio de um eletrodo especial, o qual permite sensibilidade de determinação da ordem de 0,1 unidades de pH (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002, RIEGER, 2000).

O pH da superfície cutânea é devido à produção de ácido láctico, conferindo à superfície da mesma, o que se convencionou chamar de “manto ácido cutâneo”. Desta maneira, a pele apresenta pH levemente ácido (4,6 – 5,8), o que contribui para ações bactericida e fungicida em sua superfície. A proteinase, ativa no pH fisiológico da pele pode participar modulando a resposta inflamatória nas injúrias celulares (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002, RIEGER, 2000).

As secreções cutâneas apresentam apreciável capacidade tamponante, fato importante, uma vez que o pH da pele é freqüentemente alterado em consequência da utilização de produtos tópicos inadequados, deixando-a exposta a agentes agressores especialmente microorganismos (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002, RIEGER, 2000).

Alguns processos importantes estão envolvidos na manutenção do equilíbrio da superfície cutânea, como:

3.2.1 Queratinização

É o processo pelo qual se formam as proteínas características dos pêlos, das unhas e da epiderme, e consiste na oxidação de duas moléculas de cisteína para constituir uma de cistina (CHIEN, 2005).

Testes histoquímicos indicam que na região da camada granular da pele humana normal, há um sistema de alta energia, responsável pela síntese de queratina a partir de polipeptídios no citoplasma das células epidérmicas.

Por intermédio da queratinização a epiderme consegue exercer suas principais funções: construir uma camada córnea resistente e impermeável e produzir uma camada de Malpighi com grande coesão assegurada por desmossomas, elasticidade uma vez que a pré-queratina é pobre em enxofre (CHIEN, 2005).

Cornificação: É o processo onde as células vivas são convertidas em material córneo. É a modificação que ocorre em pêlos, unhas e células epidérmicas, associada a morte celular e perda de suas organelas.

3.2.2 Lipídios da Superfície da Pele

O conteúdo lipídico extracelular (sebo), produto das glândulas sebáceas, é basicamente uma mistura de lipídios polares denominados triglicerídios, ácidos graxos livres, ceras, esteróis (colesterol), esqualeno e parafinas. As ceramidas representam até 50% deste conteúdo. Os ácidos graxos livres conferem ao sebo, atividades bactericidas e fungicidas. A pele contém dois ácidos graxos insaturados essenciais, o ácido linoléico e o ácido araquidônico. Ácido linoléico tem sido relatado em vários trabalhos como importante na regulação das funções barreira da pele. Ácido araquidônico pode contribuir no guarnecimento de prostaglandinas (FORSLIND et al., 1997).

Mais de um terço dos lipídios do estrato córneo tem comprimento de cadeia maior que 22 carbonos, enquanto nas membranas celulares há a predominância de lipídios com 16 a 18 carbonos (CHIEN, 2005).

Segundo Forslind et al. (1997), o sebo é produzido em maior quantidade na testa, menor no tronco e em quantidades mínimas nas extremidades e fatores como a idade, mudanças significativas de estação e de clima, afetam a taxa de produção e o conteúdo dos lipídios da superfície cutânea.

3.3 FUNÇÃO BARREIRA E A PERMEABILIDADE CUTÂNEA

A pele desempenha muitas e variadas funções, mas em relação à permeação cutânea humana a função mais importante é a de proteção (FORSLIND et al., 1997). O local da pele conhecido como “zona barreira”, representada por três distintas camadas o estrato córneo, epiderme viável, e derme além da rede de capilares sanguíneos, folículos pilosos, glândulas sebáceas, e sudoríparas (CHIEN, 2005), é o responsável pela proteção da pele, agindo como barreira contra agentes externos como descrito a seguir:

- a) Barreira microbiológica: o estrato córneo é a primeira barreira para microorganismos, e muito embora o manto ácido (produzido pelas secreções ecrinas e sebáceas a pH 4,2-5,6) não seja muitas vezes suficiente para defender a pele contra as bactérias, existem ainda secreções pelas glândulas da pele de ácidos graxos de cadeia curta, os quais inibem o crescimento de fungos e bactérias (AULTON, 1988);
- b) Barreira química: uma importante função da pele humana é barrar a entrada de moléculas indesejáveis de fora para dentro, enquanto controla a perda de água, eletrólitos e outros constituintes endógenos. O estrato córneo é praticamente impermeável a todas as substâncias químicas não gasosas agindo assim como passo limitante para a absorção percutânea (AULTON, 1988);
- c) Barreira à radiação: para a pele exposta à luz do sol, a radiação ultravioleta 290-400nm é a mais danosa, e desta exposição três principais reações agudas são percebidas, eritema, pigmentação (produção de melanina como resultado da estimulação dos melanócitos) e engrossamento da epiderme. Reações crônicas à exposição desta radiação incluem envelhecimento e cânceres de pele (AULTON, 1988);

- d) Barreira ao calor e regulador térmico: a pele (estrato córneo), por sua extensão por todo o corpo, é o primeiro órgão responsável pela manutenção da temperatura do corpo em 37°C, tendo papel importante a circulação periférica, as glândulas e demais constituintes (AULTON, 1988);
- e) Barreira elétrica e mecânica: a pele possui uma resistência e impedância muito maior que outros tecidos biológicos, e exerce proteção contra agressões mecânicas, através de engrossamentos e calosidades (AULTON, 1988).

A denominação permeação percutânea de substâncias em um sistema transdérmico ou em preparações dermatológicas, representa o caminho destas através das camadas da pele até a corrente linfática e sanguínea, que lhes transportarão até os órgãos os quais as reterão de acordo com suas respectivas afinidades (JATO, 1997).

Em preparações dermatológicas, embora seja importante que o fármaco penetre além da superfície, normalmente não se deseja que o medicamento penetre na circulação sistêmica (JATO, 1997).

Em média, na superfície cutânea existem 40-70 folículos pilosos e 200-250 ductos sebáceos por metro quadrado de área de pele e por eles a absorção cutânea é muito intensa (CHIEN, 2005, JATO, 1997), entretanto, estes apêndices da pele representam apenas 0,1% da superfície cutânea total, e desta maneira, a absorção percutânea pela via transepidérmica se torna a principal via de permeação de absorção de fármacos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

As vias seguidas pelo fármaco na permeação percutânea são descritas e ilustradas na Figura 1:

- a) por difusão através das células – penetração transcelular (através dos corneócitos e matriz lipídica intercelular);

- b) por difusão entre as células – penetração intercelular (por entre os corneócitos e pela matriz lipídica);
- c) por difusão através dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, e anexos pilosebáceos – penetração transanexal (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Em quaisquer dos caminhos que a permeação possa ocorrer, a estrutura do estrato córneo obriga o fármaco a se difundir através das bicamadas lipídicas intercelulares (ROUGIER, 1983).

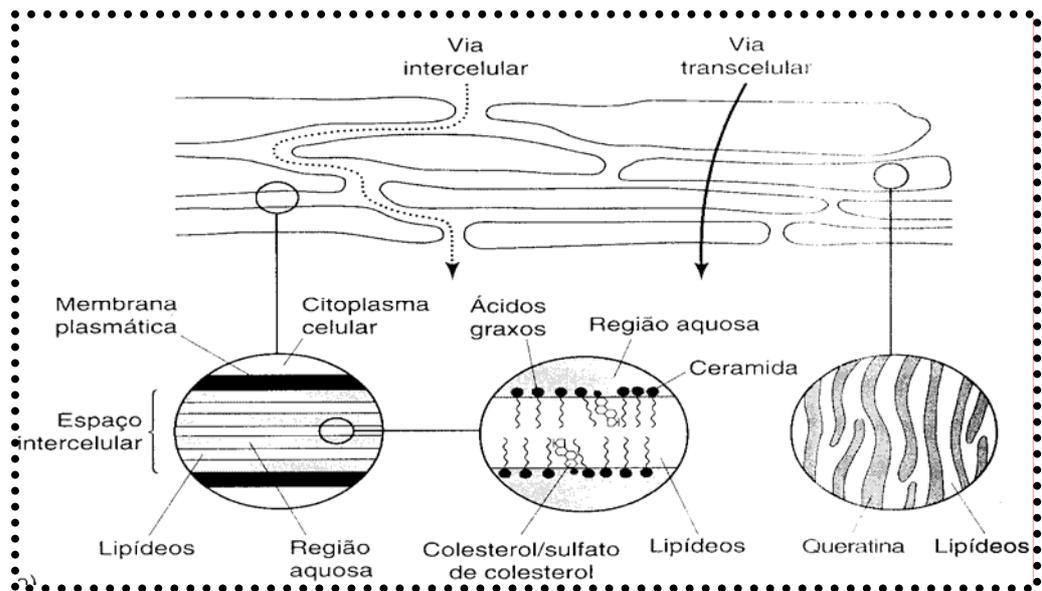


Figura 1 Esquema representativo das vias de penetração do fármaco através do estrato córneo (via transcelular e via intercecular)

Fonte: MARTINS; VEIGA (2002)

3.3.1 Passos Importantes na Absorção Percutânea

Na absorção cutânea, interferem os seguintes fatores:

- a) liberação do fármaco do veículo;

- b) penetração através das barreiras da pele;
- c) ativação da resposta farmacológica.

Estes passos determinantes para a absorção cutânea são afetados por fatores como tipo, condição e a presença de umidade na pele (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000) a natureza do fármaco (propriedades físicas e químicas) e do veículo utilizado (CAMPOS, 1994, JATO, 1997).

As partículas do fármaco inicialmente precisam ser solubilizadas para que então possam sofrer partição e se difundir passivamente para a interface veículo/estrato córneo. Algumas substâncias podem se ligar ou ficar retidas em determinados locais deste, ou então sofrer nova partição para uma segunda interface estrato córneo/epiderme viável (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

O processo de difusão ocorre espontaneamente sendo acompanhado de perda de energia livre (G) do sistema. A difusão pode ser definida como, a transferência espontânea de um componente de uma região com alto potencial químico, para uma região com potencial mais baixo, sendo o gradiente de concentração a força condutora neste processo (AULTON, 2005).

As leis que descrevem o fenômeno de difusão, normalmente são expressas em termos de gradientes de concentração como, por exemplo, a primeira Lei de Fick, que indica que a taxa de difusão é proporcional ao gradiente de concentração, conforme a eq. **(1)**:

$$J = dm/dt = - D dC /dx \quad (1)$$

Onde:

O fluxo J do fármaco expresso em termos de quantidade (dm) transportada em determinado tempo (dt) através de um plano por unidade de área (dC/dx) fornece o gradiente de concentração D que é o coeficiente de difusão expresso em unidades de área por unidade de tempo (AULTON, 2005).

A segunda Lei de Fick é geralmente empregada em experimentos onde se emprega uma membrana permeante separando dois compartimentos, tendo-se num deles a maior concentração do fármaco (compartimento doador) e no outro (compartimento receptor) a concentração zero (*sink conditions*) mantendo assim o gradiente de concentração, a quantidade acumulada do fármaco (m) que passa através da membrana, por unidade de área e como função do tempo até alcançar o estado de equilíbrio pode ser expressa na eq. (2) a seguir:

$$(dm/dt) = DC_0K / h \quad (2)$$

Onde:

C_0 é a concentração constante do fármaco na solução doadora,

K é o coeficiente de partição do soluto entre o veículo e a membrana,

h é a espessura da membrana.

Quando plotados em um gráfico o tempo de absorção (t) e a quantidade acumulada absorvida (m) por unidade de área de membrana como função do tempo, o equilíbrio é verificado quando o gráfico se torna linear, e os dados desta porção linear, extrapolados, de modo a obter o intercepto da curva quando $m = 0$ fornecem o *lag time* (tempo que leva para começar a ocorrer a absorção) (AULTON, 2005).

3.3.2 Interferentes da Absorção Percutânea

Pelo fato da pele ser composta de complexas e heterogêneas camadas laminares, onde cada lâmina contribui com uma resistência difusional específica, e por fatores inerentes ao fármaco além de outras variáveis envolvidas no processo, o processo de absorção percutânea pode ser favorecido ou não por situações específicas, e algumas destas características são relatadas a seguir.

Sendo o fluxo do soluto proporcional ao gradiente de concentração através membranas, então para um máximo de fluxo é necessário que a solução doadora seja saturada, e isto pode ser conseguido otimizando-se a solubilidade do fármaco através da melhor composição do veículo, e da escolha da solução no compartimento receptor pela experimentação com uma série de solventes apropriados (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007, AULTON, 2005, JATO, 1997, MARTINS; VEIGA, 2002).

O coeficiente de partição é fator importante para estabelecer o fluxo do fármaco através da membrana. Quando a membrana é a maior fonte de resistência difusional no processo, a magnitude do coeficiente de partição é muito importante, e isto freqüentemente ocorre na permeação percutânea, quando a impermeabilidade do estrato córneo é o passo limitante na absorção, sendo então o coeficiente de partição estrato córneo/veículo crucialmente importante para o estabelecimento da alta concentração inicial do fármaco na primeira camada da membrana (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007; AULTON, 2005; JATO, 1997);

Embora a concentração diferencial do fármaco entre as duas fases, doadora e receptora, seja a força condutora para o processo de difusão, o gradiente químico potencial ou gradiente de atividade é o parâmetro fundamental. A atividade termodinâmica do fármaco na fase doadora ou a membrana pode ser radicalmente alterada por mudanças no pH, formação de complexos ou a presença de tensoativos, ou cosolventes. Tais fatores também modificam o coeficiente de partição efetivo (AULTON, 2005).

Ácidos e bases fracas se dissociam em diferentes graus dependendo do pH do meio e do seu pK_a ou pK_b , e o lado onde a proporção do fármaco não ionizado for maior (somente as moléculas não ionizadas do fármaco passam facilmente através das membranas lipídicas) irá determinar o gradiente efetivo através da membrana (AULTON, 2005, LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

Misturas cosolventes polares tais como propilenoglicol e água podem produzir soluções saturadas e maximizar o gradiente de concentração através do estrato córneo. No entanto o coeficiente de partição de um

fármaco entre o veículo e estrato córneo diminui, com a solubilidade do fármaco na mistura solvente. Este dado é importante, quando não se deseja a promoção da penetração do fármaco, então na formulação deve-se proceder a solubilização deste no veículo até próximo da saturação (AULTON, 2005).

O efeito do uso dos tensoativos na pele é relatado como sendo no abaixamento da tensão interfacial e mudanças na conformação protéica do estrato córneo. A formação de complexos afeta a permeação do fármaco de maneira semelhante a solubilização micelar. Quando o complexo se forma ocorre mudanças na aparente solubilidade e aparente coeficiente de partição do fármaco (AULTON, 2005);

O manto superficial (0,4-10 μ m) dificilmente afeta a absorção percutânea. Os apêndices podem ser uma rota importante apenas para íons e moléculas grandes polares (pesos moleculares acima de 500 Daltons) os quais têm dificuldade de atravessar o estrato córneo intacto. Pela via epidérmica, as moléculas penetram pelo estrato córneo ou intercelularmente ou transcelularmente. Na queratina intracelular presente na formação em mosaico das regiões polar e não polar, fármacos se dissolvem e se difundem de acordo com suas afinidades químicas. Os lipídios neutros da via intercelular provêm uma rota alternativa (AULTON, 2005, JATO, 1997).

O dinâmico processo de absorção percutânea sofre variações de fatores biológicos tais como idade e a condição e a localização da pele. A literatura relata que peles do feto e de tecido jovem são mais permeáveis que as de tecido adulto. A condição da pele é importante uma vez que muitos solventes rompem ou modificam a complexa estrutura da camada córnea intacta. Em estados doentis onde há a caracterização de modificação na camada córnea, uma maior permeação percutânea é verificada. A espessura e a natureza da camada córnea promovem variações na permeabilidade cutânea, assim como a densidade dos apêndices cutâneos. Peles de diferentes animais diferem largamente na espessura, densidade de glândulas e de folículos pilosos e ainda no suprimento sanguíneo, entre outros fatores, os afetam as rotas de

penetração e a resistência à permeação. Estudos comparativos demonstraram que as peles de macacos e porcos são mais próximas à humana sendo embora mais permeáveis que esta, a pele de ratos sem pelos tem algumas características similares à humana, sendo também mais permeáveis que esta (AULTON, 2005).

As interações fármaco/pele e a hidratação da pele são fatores importantes na absorção percutânea. Quando a água satura a pele, sua permeabilidade aumenta acentuadamente. Muitos compostos podem possibilitar esta função, como ácidos graxos livres, pirrolidonas, uréia, sódio, cálcio, potássio, lactato, complexos entre proteína-açúcar ou misturas destes compostos. Pode ser particularmente importante, a interação do fármaco com a pele, resultando em reservatório do fármaco na camada córnea, como acontece com os filtros solares e produtos tópicos contendo esteróides (AULTON, 2005, MARTINS; VEIGA, 2002).

Igualmente importantes são as interações veículo/pele. O veículo pode modificar o estado e a permeabilidade da pele: alterando sua hidratação, veículos oclusivos como óleos e gorduras reduzem ou prevenindo a perda de água, aumentando a umidade da pele e assim promovem a penetração; grande variação na temperatura pode aumentar a taxa de penetração na pele humana até dez vezes, veículos oclusivos aumentam a temperatura da pele em alguns graus, mas seu efeito sobre a permeabilidade cutânea é pequeno se comparado ao efeito da hidratação; uso de promotores de absorção (meios químicos), substâncias que podem temporariamente diminuir a impermeabilidade da pele, e sendo seguros e não tóxicos, podem ser usados clinicamente para aumentar a penetração de fármacos (FEMENÍA-FONT et al., 2005). Um promotor de penetração cutânea ideal, segundo Femenía- Font al. (2005), logo após sua remoção deve permitir a rápida recuperação da propriedade barreira da pele; deve ter outros atributos como, ser compatível com o fármaco e demais excipientes; ser um bom solvente para o fármaco aumentando a efetiva concentração do fármaco no veículo e deve possibilitar boa espalhabilidade da formulação e agradável sensação na pele; deve

possibilitar sua incorporação em todas os tipos de preparações usadas topicamente além de não possuir cheiro, odor, cor e ser economicamente viável, alguns exemplos de promotores com estas características são o miristato de isopropila, ésteres do ácido nicotínico; fosfolipídios hidrogenados de soja; óleos essenciais, etanol; n-octanol e decanol e terpenos (NOKHODCHI, 2003). Dificilmente uma só substância possuirá todas estas propriedades desejadas (AULTON, 2005, MARTINS; VEIGA, 2002).

Por segurança e eficiência o melhor promotor de penetração é a água. Todas as substâncias penetram melhor através da pele hidratada que da pele seca, então qualquer substância química inativa, não tóxica que promova hidratação da camada córnea pode ser considerada como um promotor de penetração.

Os mais efetivos promotores de absorção são os solventes apróticos como o dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e dimetilacetamida (DMA), possuindo vários dos atributos mencionados para um promotor ideal. As pirrolidonas podem ser usadas com uma série de fármacos para promover a penetração e também estabelecer um reservatório do fármaco no estrato córneo e unhas. Os agentes de superfície podem promover a absorção pelos apêndices por reduzir a tensão superficial. Os tensoativos, especialmente os aniônicos alteram a conformação em hélice das proteínas do estrato córneo. Estudos de Nokhodchi et al. (2003), relatam que tanto os tensoativos aniônicos quanto os não iônicos têm o poder de aumentar a penetração de alguns fármacos pouco solúveis em água e que a concentração destes tem importante papel na solubilidade aparente do fármaco. O Tween® 80, segundo os resultados destes estudos, aumenta a capacidade de penetração do lorazepam via ambos o mecanismo molecular hidrofílico e o lipofílico, pois sua estrutura lhe confere ambas as características lipofílicas e hidrofílicas na molécula o que permite uma maior partição entre os lipídios e proteínas.

Derivados de longas cadeias dos sulfóxidos tais como o decilmetilsulfóxido, em baixas concentrações, provavelmente exercem seu efeito como promotores.

Baixas concentrações de propilenoglicol e álcool não são potentes promotores. Em estudos de Fang et al. (2003), o fármaco lipofílico flurbiprofeno foi veiculado num hidrogel formado com polímeros de celulose, e nestes, a presença de propilenoglicol proporcionou maior solubilização do fármaco no veículo, e embora tenha havido retardamento no início do fluxo, não houve alteração da taxa de liberação do fármaco para a pele. Em estudo de outros autores, o propilenoglicol quando em combinação com o ácido oléico e/ou álcool oléico, mostra eficiente ação promotora da permeação cutânea, para algumas moléculas (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007, AULTON, 2005, MARTINS; VEIGA, 2002).

As interações fármaco/veículo são também muito importantes na absorção percutânea, quando a impermeabilidade do estrato córneo não é o fator determinante, e sim é a liberação do fármaco no veículo, o passo limitante para a penetração cutânea. Isto acontece quando a difusão do fármaco no veículo é excepcionalmente baixa ou quando o veículo possui a capacidade de controlar a liberação do fármaco (sistemas de liberação de fármacos com taxa controlada) (AULTON, 2005).

3.4 FORMAS FARMACÊUTICAS SEMI-SÓLIDAS DE USO TÓPICO

Em geral, os medicamentos destinados à pele, podem ser de aplicação tópica ou sistêmica. As formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico são preparações destinadas a uma ação sobre a pele e mucosas, acessíveis ao meio externo. Os medicamentos sistêmicos são administrados pela via oral, medicamentos injetáveis, ou através de sistemas transdérmicos e se distribuem por todo o organismo.

Os fármacos contidos em uma formulação tópica são incorporados aos excipientes e assim, conforme as combinações entre eles, as preparações tópicas apresentam composição e consistência diversas. Os excipientes determinam a natureza, a consistência e também o grau de penetrabilidade.

As formas farmacêuticas dermatológicas usadas com maior frequência são pomadas, cremes, loções e soluções tópicas, embora outras formas farmacêuticas como pastas, linimentos; pós; géis; tinturas; e aerossóis sejam também usadas, mas em menor proporção (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Entre as formas farmacêuticas semi-sólidas descritas na literatura, merecem destaque os cremes, em especial os do tipo O/A, por apresentarem facilidade de aplicação, espalhabilidade sobre a pele e facilidade de veiculação de fármacos. Os cremes constituem formas farmacêuticas semi-sólidas obtidas por emulsão. Sua natureza anfifílica e similaridade com a epiderme humana permitem elevada eficiência na veiculação de fármacos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007, AULTON, 2005;).

3.4.1 Emulsões

Pela emulsificação, há a possibilidade de misturas estáveis e homogêneas de dois líquidos imiscíveis ou relativamente imiscíveis entre si.

Tem-se uma emulsão quando um líquido estiver dividido (fase interna, dispersa ou descontínua) em pequeníssimos glóbulos no seio de outro (fase externa, dispersante ou contínua).

As emulsões são classificadas de acordo com a natureza lipofílica (ou hidrofóbica) da fase dispersante em sistemas óleo em água (O/A) ou sistemas água em óleo (A/O), e ainda de acordo com a sua utilização, em de uso interno ou externo:

- a) para uso interno: as emulsões administradas por via oral são exclusivamente do tipo O/A;
- b) para uso externo: podem ser tanto O/A quanto A/O, dependendo da natureza do fármaco a ser incorporado, da via de administração, tipo de emolientes na formulação e condição da superfície cutânea (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

A miscibilidade ou a solubilidade em óleo e em água do fármaco que vai ser usado numa preparação emulsificada, é fator determinante para a escolha do veículo adequado, sendo os fármacos quando incorporados na fase interna da emulsão, menos irritantes para a pele (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

A fase aquosa é em geral água destilada ou deionizada, já que a presença de sais de cálcio na água dura seriam elementos desestabilizadores da emulsão. Nesta fase podem ser incorporados os elementos hidrossolúveis; fármacos, conservantes, tampões, corretivos de pH, antioxidantes, conservantes, sequestrantes, corantes, edulcorantes, aromatizantes (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001);

A fase oleosa é composta de componentes oleosos ou emolientes e é responsável por características importantes da emulsão que podem ser moduladas conforme a natureza do elemento oleoso escolhido.

Esta escolha pode ser baseada em vários critérios, como propriedades físico-químicas (estabilidade frente a ácidos e bases, ponto de fusão,

polaridade), e estrutura química do emoliente, a qual é responsável pela grande maioria das propriedades que as emulsões apresentam ao serem aplicadas à pele (espalhabilidade, grau de absorção, emoliência, lubrificação, toxicidade, viscosidade, controle da umidade e comedogenicidade), e permite ainda prever sobre a estabilidade das mesmas frente à hidrólise ácida e alcalina. Alguns exemplos são ésteres de ácidos e álcoois graxos; óleos de origem vegetal como os de sésamo, arroz, semente de algodão; hidrocarbonetos derivados do petróleo e triglicerídios de origem animal. Pela análise preliminar e seleção dos emolientes podem-se influenciar os parâmetros tecnológicos, sensoriais e mercadológicos, de maneira controlada (SANCTIS, 2000). As características impostas à emulsão pela utilização de um ou combinação de emolientes específicos, interferem no processo de permeação cutânea do fármaco nela veiculado (AULTON, 2005).

O agente emulsivo, além de facilitar a obtenção da fase dispersa, contribui para a estabilização termodinâmica da emulsão por provocar modificações nas propriedades reológicas da mesma (JATO, 1997). São substâncias que reduzem a tensão interfacial entre a água e o óleo, e assim reduzem a energia que é necessária para dispersar um líquido no outro. Os tensoativos são substâncias formadoras de filme em volta de cada gotícula da fase dispersa, de modo a originar uma barreira (mecânica) que evite a coalescência das gotículas quando contatam umas com as outras (JATO, 1997; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Os filmes formados, dependendo da natureza do agente emulsivo podem ser representados por uma camada monomolecular, multimolecular ou partículas sólidas finamente divididas (JATO, 1997).

Os agentes emulsivos sintéticos em relação à estrutura molecular e a natureza de seus grupos polares podem ser classificados em tensoativos anfóteros, aniônicos, catiônicos e não-iônicos. Estes agentes contêm grupos lipófilos e hidrófilos sendo que a parte lipófila, geralmente é a responsável pela atividade superficial. Os agentes emulsivos não-iônicos não têm tendência a se ionizar, e dependendo de sua natureza podem formar

emulsão O/A ou A/O (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Em solução aquosa possuem grupo polarizado, mas não ionizável. A porção hidrofílica pode ser um álcool, glicerol, sorbitol, poliglicol, polietilenoglicol, polipropilenoglicol, amidoglicol e alcanolamidas.

A parte hidrofóbica pode ser representada por um grupo alquil ou grupo alquil aril. Os não-iônicos são os mais empregados em emulsões destinadas ao uso tópico. Os álcoois e ésteres polioxietilênicos onde a fração lipofílica é representada pelos ácidos, esteárico; palmítico; oléico e ricinolêico são os mais empregados atualmente e considerados os menos irritantes para a pele, pois não desnaturam as proteínas. Exemplos importantes são os ésteres de glicerol, ésteres de glicóis, ésteres de polietilenoglicóis, ésteres de sorbitano e álcoois graxos etoxilados.

Os derivados de lanolina, frações ricas em esteróis etoxilados, são emulsionantes primários muito complexos, mas com boas propriedades eudérmicas. Estes tensoativos são eficazes na faixa de pH de 3-10 (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). A relação do volume da fase interna com o da fase externa, e a natureza iônica são características importantes e primordiais na escolha do tensoativo na elaboração da emulsão desejada (JATO, 1997, SANCTIS, 2000);

Além das substâncias mencionadas, outros componentes são utilizados como reguladores da viscosidade entre estes estão os polímeros hidrófilos e hidrocolóides derivados da celulose (quando a fase externa for aquosa) e lanolina e substâncias com características plásticas, (quando a fase externa for oleosa) (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Os emulsificantes auxiliares são denominados espessantes, normalmente hidrofílicos, evitam a coalescência das emulsões por aumentar a viscosidade da fase externa (goma xantana, caraia, arábica, polímeros carboxivinílicos, derivados de celulose, e outros) (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Os umectantes são substâncias utilizadas para impedir ou retardar a formação de cristais devido à evaporação ou secagem completa da fase aquosa. Exemplos de umectantes mais empregados são a glicerina, o propilenoglicol e o sorbitol (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Os silicones, os polissiloxanos, possuem inércia química, muito especialmente em relação à oxidação. A elevação de temperatura afeta pouco, a sua viscosidade. Fixam-se à superfície de diversos materiais, tornando-os hidrofóbicos (o grupo siloxano se orienta para a superfície contactante, e os radicais orgânicos hidrofóbicos se voltam para o exterior). O aquecimento exalta a hidrorepelência, pois ao serem aquecidas as moléculas dos silicones desdobram-se, criando mais pontos de apoio na superfície de contacto. São destituídos de toxicidade e a aplicação cutânea mesmo prolongada não produz irritação (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Entre os antioxidantes e conservantes (preservantes), os mais utilizados nas preparações semi-sólidas para uso tópico são os que atuam por mecanismos preventivos impedindo a auto-oxidação na presença de metais. Entre estes, o butilhidroxitouleno (BHT) é recomendado como uma alternativa ao tocoferol numa concentração de 10 ppm para estabilizar a parafina líquida. Os ésteres do ácido gálico são muito utilizados (propil, octil e dodecil éster) para óleos fixos em concentrações acima de 0,001% e para óleos essenciais em concentrações acima de 0,1%. (AULTON, 1988).

Os ésteres do ácido para-hidroxibenzóico (metil, etil, propil e butil) e seus sais largamente usados para a conservação das emulsões, nas concentrações de 0,1 – 0,2%.

O metabissulfito de sódio possui efeito antioxidante e inibidor sobre a proliferação de microorganismos, mais efetivo na faixa de pH 7-9.

Ainda é utilizado o clorocresol, em concentrações em torno de 0,1%, com atividade reduzida na presença de óleos fixos de origem animal ou vegetal, e em pH alcalino; o fenoxietanol (0,5-1,0%), que devido a sua inefetividade frente a bactérias Gram-negativas, geralmente é associado a outros preservantes como os ésteres do ácido para-hidrobencóico; o bronopol (0,02%), geralmente em combinação com outros preservantes; os compostos quaternários de amônio, usados principalmente como anti-sépticos para administração tópica, e a cetrimida, utilizado como agente emulsificante primário.

Normalmente além da estabilização do fármaco, o uso destes agentes potencializa a ação conservante por promover a quelação dos metais essenciais ao crescimento dos microorganismos, sendo o ácido cítrico, o agente sequestrante de metais mais usados na proteção dos óleos devido à sua inocuidade e o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético e seu sal sódico), desprovido de toxicidade largamente aplicado na proteção de preparações farmacêuticas (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

3.4.1.1 Sistema EHL

Os emulsificantes geralmente possuem uma parte hidrófila e uma lipófila, com predominância de uma delas (fato que influencia o tipo de emulsão formada). Segundo o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL), para cada substância se atribui um número ou valor de EHL, que indica a polaridade da substância. Os valores usuais são de 1-20, embora cheguem a 40. Os números mais elevados correspondem aos elementos altamente polares ou hidrofílicos, e os mais baixos aos menos polares ou lipofílicos (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

No sistema EHL também se atribui um valor de EHL aos óleos e substâncias semelhantes, e quando da elaboração da emulsão, escolhem-se os emulsificantes que possuam o valor de EHL mais próximo ao valor da fase oleosa da emulsão pretendida.

Os agentes emulsificantes são compostos tensoativos com valores de EHL de 3 a 6, e numa emulsão reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a água, minimizando a energia superficial pela formação de glóbulos (são altamente lipofílicos).

Estes valores de EHL são utilizados para os cálculos da porcentagem necessária do emulsificante, sendo muitas vezes utilizada uma mistura deles com ótimos resultados (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

3.4.1.2 Estabilidade das emulsões

As emulsões são termodinamicamente instáveis, possuindo um tempo de vida limitado e a instabilidade destas formulações farmacêuticas pode ser detectada em alguns casos por uma mudança na aparência física, na cor, no odor e na textura, enquanto em outros casos, podem ocorrer alterações químicas que não são evidentes e que só podem ser verificadas por análises químicas (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Os dados obtidos pelo estudo da estabilidade de uma formulação, levam a previsão do prazo de validade esperado para o produto e se necessário a um novo procedimento para a formulação (TADROS, 2004, VOIGT, 1982).

Uma emulsão é considerada estável quando mantém os constituintes da fase oleosa dispersa na fase dispersante, ou vice-versa, mesmo, quando submetida a tensões decorrentes de temperatura, agitação e gravidade.

Durante o desenvolvimento de uma formulação para abreviar os conhecimentos sobre a compatibilidade da formulação, sobre a embalagem e prazo de validade do produto pronto, se faz uso de condições exageradas de temperatura, umidade, luz e outros, para avaliar a estabilidade das formulações farmacêuticas (TADROS, 2004).

3.4.1.3 Reologia das emulsões

Reologia é o estudo da deformação e fluidez dos materiais sob a influência de forças externas. Tecnicamente é definida como "a resistência ao fluxo ou ao movimento" (CHIEN, 2005).

As propriedades reológicas de produtos farmacêuticos são sempre de fundamental importância, seja na elaboração, no desenvolvimento ou na avaliação de formas farmacêuticas (AULTON, 2005).

Na elaboração de produtos farmacêuticos semi-sólidos, se faz necessário a padronização do desenvolvimento e da produção, a fim de se obter e conquistar a credibilidade dos consumidores, e característica muito

importante para aceitação neste tipo de produto é a observação da aparência (principalmente a consistência). Estes mesmos produtos precisam ter garantido sua qualidade e estabilidade quando transportados de um local a outro, e para isto são submetidos a métodos de análise para detectar mudanças devido ao estresse mecânico, e às flutuações de temperatura (BRUMMER; GODERSKY, 1999).

A viscosidade de materiais não-newtonianos é determinada pelo viscosímetro rotacional, capaz de produzir diferentes velocidades de cisalhamento, medir a tensão de cisalhamento e criar um gráfico com os resultados obtidos (AULTON, 2005).

As medidas reológicas provêm informações sobre a estabilidade física e a consistência da emulsão. É essencial realizar as medidas reológicas como função da temperatura (TADROS, 2004).

Diferentes forças agem sobre os materiais, em função das condições de estocagem, processamento ou condições de aplicação e a resultante destas forças, pode modificar o comportamento reológico destes materiais.

Considerando-se um fluido contido entre duas placas planas paralelas de área A , separadas por uma distância y , uma força F é aplicada na parte superior, movimentando a placa a uma velocidade v , constante em relação à placa inferior, que é mantida fixa (Figura 2).

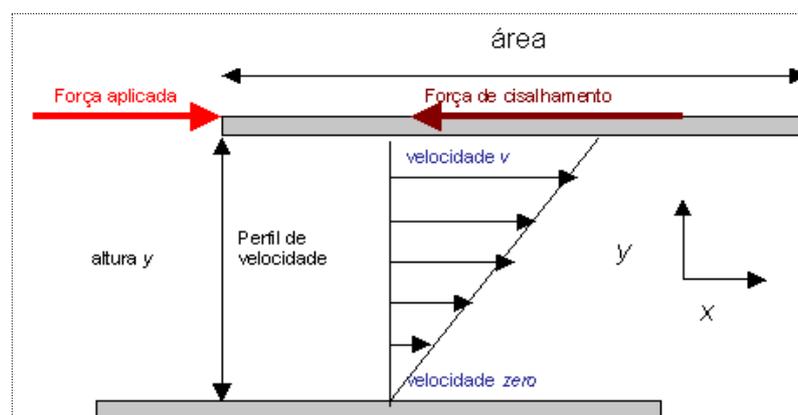


Figura 2 Força de cisalhamento aplicada sobre um fluido

Fonte: http://www.deq.ufpe.br/disciplinas/MecFluidos/REOGIA_DE_FLUIDOS.pdf

Somente poucos materiais seguem a lei de Newton, isto é, exibem uma direta proporcionalidade entre a tensão (τ) e a taxa de cisalhamento (γ) segundo mostra a eq. (3), conhecida como equação de Newton, onde (η) é definida como viscosidade absoluta, dinâmica (constante), isto inclui líquidos de baixo peso molecular (água, glicerina, clorofórmio); soluções verdadeiras (xaropes); e sistemas coloidais poliméricos muito diluídos.

$$\tau = \eta \cdot \gamma \quad (3)$$

As dimensões de viscosidade (η) são:

Pascal/(1/segundo) = Pascal . s (Pa.s), onde:

1 Pascal (Pa) = 10 dyn./cm², 1 Pa.s = 10 poise, 100cP = 1 poise

1 cP = 1 m Pa.s sendo 1cP = 1centi-poise, 1000 m Pa s = 1 Pa.s

Na representação gráfica, a curva de fluxo ou reograma em coordenadas cartesianas dos fluidos newtonianos, mostra uma relação linear e passa pela origem, sendo a sua inclinação, igual a viscosidade única do fluido. Outra forma de analisar o comportamento do fluido é verificando a relação entre a viscosidade e a taxa de cisalhamento (curva da viscosidade). Para o fluido newtoniano, esta relação é uma reta paralela aos eixos das taxas de cisalhamentos (viscosidade constante) (LABA, 1993, TADROS, 2004).

Todo fluido cuja relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, não é constante, é denominado de não newtoniano, considerando ainda a temperatura e a pressão constantes e o escoamento laminar. Estes fluidos são classificados de acordo com o aspecto da curva de fluxo e a correlação com algum modelo ou equação matemática. A viscosidade destes fluidos não é única, e varia com a magnitude da taxa de cisalhamento, eq. (4), e é denominada viscosidade aparente (η_a). Esta viscosidade só é válida para uma determinada taxa de cisalhamento,

portanto sempre que citada, deve vir acompanhada da taxa de cisalhamento correspondente,

$$\eta_{\alpha} = \tau. / \gamma \quad (4)$$

A maioria das preparações farmacêuticas possui comportamento não-Newtoniano (AULTON 1988, BRUMMER; GODERSKY, 1998, LABA, 1993).

Grande número de fluídos não-newtonianos se comporta como pseudoplástico, sendo as emulsões, dispersões e suspensões, exemplos deste comportamento.

Nos fluídos com comportamento pseudoplástico, há um decréscimo da viscosidade em decorrência do aumento da taxa de cisalhamento, comportamento também referido como "*shear thinning*", ou afinamento, significa que a resistência do material ao fluxo decresce e a energia requerida para manter este fluxo diminui, quando as taxas de cisalhamento aumentam.

Em alguns casos, há aumento da viscosidade, quando as taxas de cisalhamento aumentam, comportamento típico de pastas as quais contenham plasticizantes, ou estruturas contendo polímeros não iônicos. Nestes casos o comportamento é dito dilatante (AULTON, 1988, BRUMMER; GODERSKY, 1999, LABA, 1993).

Há materiais que apresentam uma dependência da tensão de cisalhamento com o tempo, para uma taxa de cisalhamento constante.

A mecânica dos fluídos classifica estes fluídos em reopéticos e tixotrópicos, conforme mostra a figura 3. São reopéticos quando a tensão cisalhante ou a viscosidade aumenta com o tempo, mantendo-se a mesma taxa de deformação. São tixotrópicos os fluídos que apresentam diminuição da taxa cisalhante ou da viscosidade, com o tempo de aplicação de certa taxa de cisalhamento. Ambos os fenômenos são reversíveis, sendo a reopexia um fenômeno raro de acontecer (AULTON, 2005; LABA, 1993).

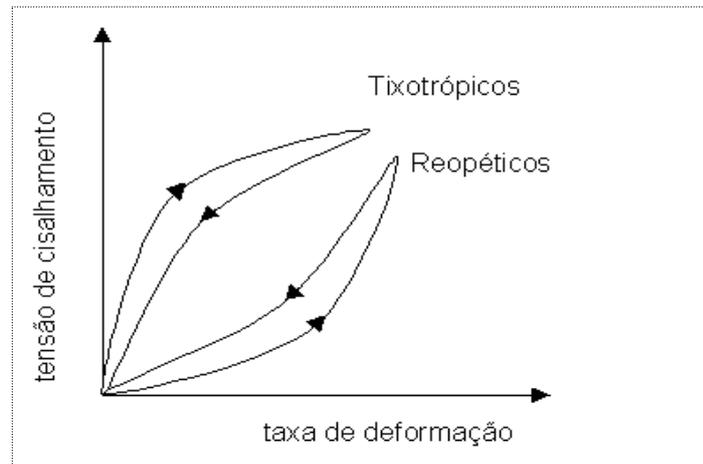


Figura 3 Curva de fluxo de fluidos não newtonianos de propriedades dependentes do tempo

Fonte: http://www.setor1.com.br/analises/reologia/cuva_inde.htm

A tixotropia é o mais comum dos dois fenômenos, e se observa quando pela retirada da força aplicada sobre o material as condições iniciais vão sendo restabelecidas em certo espaço de tempo, que pode durar desde alguns segundos até meses.

O fluxo tixotrópico é de grande utilidade nas emulsões, trata-se de uma transformação gel-sol reversível. A matriz rígida que serve para a estabilização da emulsão (forma gel) quando submetida a tensão (por agitação por exemplo), sofre amolecimento (forma sol), com as características de uma forma farmacêutica líquida, para facilidade de uso. (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Para verificar graficamente a existência de tixotropia, determina-se a velocidade de cisalhamento em ciclos nos quais se aumenta e diminui a tensão de cisalhamento. Se as curvas obtidas em cada direção forem diferentes, se obtém uma área de histerese, que caracteriza bem o fluxo tixotrópico (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

3.5 MEDICAMENTOS GENÉRICOS E MEDICAMENTO REFERÊNCIA

A ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, instituição regulatória vinculada ao Ministério da Saúde, entre outras atribuições tem como finalidade a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados.

O medicamento genérico está inserido na Política Nacional de Medicamentos através da Diretriz do Uso Racional de Medicamentos.

A promulgação de Lei nº 9787 em 10 de fevereiro de 1999 (BRASIL, 1999), que estabeleceu o medicamento genérico, foi o início das inúmeras atribuições tomadas pelo Ministério da Saúde e pela ANVISA para atender esta diretriz e aumentar o acesso da população a medicamentos eficazes, seguros e de qualidade, a preços reduzidos.

A regulamentação desta lei se deu em agosto de 1999 através da RDC nº 391 (BRASIL, 1999), que estabeleceu o regulamento técnico para o registro de medicamentos genéricos, tendo como base as normas adotadas por países EUA, Canadá, e a Comunidade Européia.

Desde então novas resoluções vão sendo instituídas pela necessidade de complementação e melhoria das ações fiscalizadoras, sendo a RDC nº 16 de 2 de março de 2007, vigente atualmente no País (BRASIL, 2007; STORPIRTIS, 1999).

Os medicamentos genéricos contêm em sua embalagem, logo abaixo do nome do fármaco que os identifica, a frase "Medicamento Genérico" e são identificados por uma grande letra "G" azul impressa sobre uma tarja amarela, situada na parte inferior das embalagens do produto. É o que estabelece a Resolução RDC nº 333, de 19 de novembro de 2003 (BRASIL, 2003).

As bases técnico-científicas da intercambiabilidade têm como suporte as definições da Lei 9.787 (BRASIL, 1999), e da Resolução RDC nº 16 (BRASIL,

2007), que entre outras atribuições traz a definição de medicamento genérico e medicamento de referência

Medicamento referência: produto inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no País, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro.

Medicamento genérico: medicamento similar ao medicamento de referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela DCB (Denominação Comum Brasileira) ou na sua ausência, pela DCI (Denominação Comum Internacional).

As formulações de uso tópico estão dispensadas de estudos de bioequivalência segundo a ANVISA, RDC N° 897 de maio de 2003: Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência, (BRASIL, 2003).

O antifúngico tópico com o cetoconazol, consta da lista de indicações terapêuticas do Órgão de Vigilância Sanitária segundo a ANVISA, RDC n° 84, 2002, (BRASIL, 2002) e topicamente o cetoconazol tem sido usado em formulações a 2%, sendo aplicado no tratamento de infecções superficiais de pele e mucosas (REYNOLDS, 1989).

O Nizoral® (Janssen- Cilag) é o medicamento de referência para o cetoconazol sendo Nizoral® creme (20mg/g) a especialidade farmacêutica tópica de referência contendo o cetoconazol, do mercado, e neste trabalho foi utilizado e denominado formulação (E).

3.6 AGENTES ANTIFÚNGICOS

A grande semelhança estrutural das células fúngicas com as dos mamíferos e a resistência de suas paredes justificam o fato dos antifúngicos atualmente disponíveis serem poucos e consideravelmente mais tóxicos que os agentes antibacterianos (TRABULSI, et al.,1999).

Cada vez mais aumenta a resistência dos fungos aos agentes terapêuticos disponíveis, conseqüentemente, há um aumento cada vez maior da incidência das infecções micóticas. Este aumento é atribuído à maior expectativa de vida, à quimioterapia oncológica, ao maior uso de tratamentos por via parenteral, transplantes de órgãos, crescimento da população imunocomprometida e uso cada vez mais freqüente de antifúngicos como profilaxia e tratamento empírico (FITZPATRICK et al., 1997, FUCHS; WANNMACHER, 1998).

Os agentes antifúngicos mais antigos como os ácidos undecilênico, benzóico e salicílico estão caindo em desuso, mas as vezes são usados em combinação com outros antifúngicos tópicos, com o objetivo de aumentar a penetração cutânea (TRABULSI, et al.,1999).

3.6.1 Imidazóis

Até 1970, poucos agentes antifúngicos eram conhecidos, e apresentavam muitas restrições em seus usos, devido a toxicidade, estreito espectro de atividade, baixa atividade farmacológica e dificuldades na administração parenteral. Esta nova classe de agentes antifúngicos imidazólicos foi introduzida na terapêutica, por sua versatilidade de administração, baixa toxicidade e abrangente espectro de atividade, sendo pouco freqüente, os fungos desenvolverem resistência a estes agentes (FITZPATRICK et al., 1997, KEDOR-HACKMANN; NERY; SANTORO, 1994).

Os agentes imidazólicos possuem atividade espectro similar, são ativos contra todos os fungos causadores de infecções superficiais de pele e

mucosas. São muito eficazes poucos tóxicos e com baixos níveis de resistência (FUCHS; WANNMACHER, 1998).

A ação principal de um fármaco imidazólico é localizada ao nível de membrana celular. A via citocromo P-450, dependente de C14 lanosterol dimetilase, é inibida, e esta é a responsável pela produção de ergosterol que é componente necessário na constituição da parede celular do fungo (PERSHING; CORLETT; JORGENSEN, 1993).

A terapia com fármacos imidazólicos é comercialmente disponível para uma variedade de rotas de administração: parenteral, intravenosa, oral ou tópica.

Os vários imidazóis e rotas de administração, no entanto tem diferentes indicações e toxicidades, dependendo da severidade e do tipo de dermatófito. A maioria das micoses superficiais mucocutâneas pode ser tratada com medicamentos tópicos, sendo necessários produtos sistêmicos, somente em algumas situações (PERSHING; CORLETT; JORGENSEN, 1993).

Atualmente existem umas séries de imidazóis substituídos como o tiabendazol, miconazol, clotrimazol, econazol e sulconazol e no Brasil são mais usados o clotrimazol, miconazol, econazol, tioconazol, isoconazol, oxiconazol e cetoconazol (FUCHS; WANNMACHER, 1998).

Os compostos imidazólicos, são os de escolha nas micoses cutâneas e de mucosas, mas uma efetiva terapia requer que o substância ativa seja liberado no sítio de infecção numa adequada concentração para produzir um efeito farmacológico (FUCHS; WANNMACHER, 1998).

3.6.2 Cetoconazol

O cetoconazol apresenta-se como um pó branco ou quase branco, praticamente insolúvel na água, facilmente solúvel no cloreto de metileno, solúvel no metanol e ligeiramente solúvel no álcool, com ponto de fusão entre 148°C e 152°C, peso molecular 531,43 (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2006).

A designação comum do cetoconazol é (+)-cis-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il] metoxi] fenil] piperazina (MECK INDEX, 1989).

O fármaco puro deve conter no mínimo 98% e no máximo 102% (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2006) de $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$.

Sua estrutura (Figura 4) apresenta dois grupos básicos, a piperazina e o imidazol com valores de pKa de 2,94 e 6,51, respectivamente.

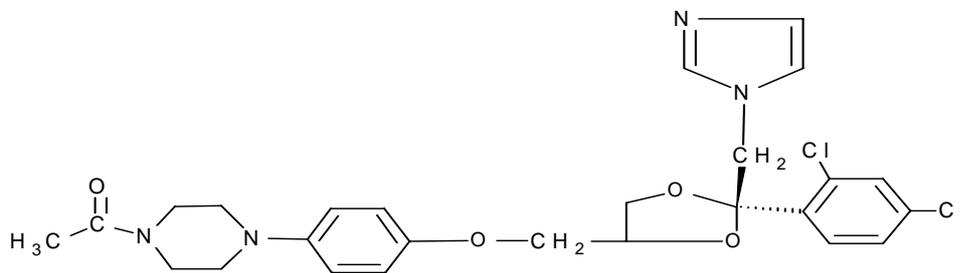


Figura 4 Estrutura molecular do cetoconazol

A solubilidade em água e a atividade antimicótica são dependentes da porcentagem de protonação do grupo piperazina. Esta decresce drasticamente quando o pH do meio é maior que o ponto isoelétrico do grupo piperazínico. Sendo uma base fraca, escassamente solúvel em água (4,5µg/mL), com habilidade para permear a mucosa do intestino desde a parte apical até a basolateral (log P=4,3) é classificada como fármaco pertencente à classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS). Fármacos pertencentes à classe II são ditos de alta permeabilidade, mas com solubilidade insuficiente em meio aquoso, para que a dose total seja dissolvida no trato gastrointestinal, sob condições normais (GALIA et al.; 1998).

Vários estudos foram realizados para o cetoconazol para a verificação das variações das suas propriedades físico-químicas em relação ao efeito da recristalização e nestes, a observação de formas polimorfas pela fusão e a

verificação da recristalização devido ao uso de solventes de uso rotineiro na indústria farmacêutica, foram evidenciadas por técnicas termoanalíticas como a calorimetria diferencial exploratória (DSC), por difração de raios X, espectroscopia por Infravermelho e por CLAE (VISERAS; SALEM; RODRIGUEZ-GALAM, 1995).

Os resultados destas mostraram mudanças nos eventos térmicos de temperatura e no comportamento das raias das diferentes recristalizações frente as análise de DSC e difração de raios X.

A espectroscopia por Infravermelho indicou não haver mudanças na estrutura química do cetoconazol. A CLAE mostrou decréscimo na solubilidade e nenhuma degradação foi relatada (VISERAS; SALEM; RODRIGUEZ-GALAM, 1995).

3.6.3 Farmacodinâmica e Farmacocinética

O cetoconazol é um antifúngico de amplo espectro com ação sistêmica e tópica, antiadrenal e antineoplásico. É fungistático, mas dependendo da concentração pode ser fungicida (KOROLKOVAS, 1998).

Tem atividade *in vitro* contra a maioria dos dermatófitos como *Blastomices dermatitidis*, *Candida* sp, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Phialofora* sp, *Trichophyton* sp, *Epidermophyton* sp e *Microsporum* sp. É ativo também contra *Pityrosporum orbiculare* (antigamente com o nome de *Malassezia furfur*) e *Cryptococcus neoformans* (FUCHS; WANNAMACHER, 1998, ZECEVIC; TOSKIC-RADOJICIC, 1993).

O cetoconazol possui uma farmacocinética reportada como bifásica, com um respectivamente $t_{1/2}$ (tempo de meia-vida) inicial de 2 horas e um $t_{1/2}$ terminal de 8 horas. Em humanos a dose oral usual (1-6 meses) é 200 mg. O $t_{1/2}$ médio de eliminação relatado é 3,3 h, sendo apenas 0,22% do fármaco excretado na urina de forma inalterada, sugerindo um quase completo metabolismo. É relatado ainda que o cetoconazol possa ser retido e acumulado principalmente nas camadas da pele e ser seguro clinicamente

(FUCHS; WANNMACHER, 1998, REYNOLDS, 1989, RICHARDSON; GANGOLLI, 1994).

3.6.4 Determinação Analítica do Cetoconazol em Preparações Farmacêuticas

A literatura oficial (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2006), descreve métodos analíticos para a determinação quantitativa do cetoconazol em comprimidos e suspensões orais, mas nenhum método validado foi encontrado para a determinação em formas farmacêuticas emulsionadas (KEDOR-HACKMANN et al., 2006).

Alguns dos métodos analíticos recomendados pela literatura científica para a determinação quantitativa do cetoconazol em formas farmacêuticas e materiais biológicos são: espectrofotometria na luz visível e espectrofotometria no ultravioleta (UV) (KEDOR-HACKMANN; NERY; SANTORO, 1994), espectrofluorometria (PASCUCCI; BENNETT; NARANG, 1983); cromatografia em camada delgada (ROYCHOWDTHURY; DAS, 1996), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com vários sistemas de detecção tal como UV (ABDEL-MOETY et al. 2002, VELIKINAC et al. 2004), com arranjo de diodos, detecção eletroquímica, técnicas voltamétricas e polarográficas (KEDOR-HACKMANN et al., 2006).

A técnica por CLAE desenvolvida por (PASCUCCI; BENNETT; NARANG, 1983), se mostrou sensível, rápida e reprodutível, oferecendo vantagens sobre os métodos microbiológicos. A detecção fluorométrica oferece um aumento na sensibilidade, quando da quantificação do cetoconazol em fluidos biológicos por CLAE. Para a determinação de alguns antifúngicos derivados dos azóis como clotrimazol, cetoconazol e fluconazol em suas formas puras e em formulações farmacêuticas, o método por CLAE, tem sido aplicado com sucesso como um método indicador da estabilidade (PIETRA et al., 1992, ROYCHOWDTHURY; DAS, 1996).

A determinação quantitativa do cetoconazol em preparações farmacêuticas comerciais (comprimidos e cremes) foi realizada por técnicas

de espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia de alta eficiência na extração, onde os resultados entre os dois métodos não foram compatíveis, mas foi demonstrada a maior acuracidade do método por CLAE, pelos resultados de recuperação do fármaco, mostrando que este poderia ser uma alternativa para os métodos espectrofotométricos (KEDOR-HACKMANN; NERY; SANTORO, 1994).

Muitos métodos envolvendo uma variedade de diferentes técnicas analíticas têm sido publicados para o doseamento do cetoconazol. Muito poucos destes se referem a quantificação do cetoconazol em preparações farmacêuticas, e não é mencionado corretamente a interferência dos excipientes ou outros componentes residuais das formulações.

Quatro impurezas são relatadas como associadas ao cetoconazol e suas respectivas estruturas são relatadas nestes estudos, onde o cetoconazol é quantificado sem a interferência das mesmas utilizando como fase estacionária o octadecilsilano e fase móvel solução tampão fosfato em um adequado pH contendo ainda acetonitrila. A dietilamina, por ser uma amina de baixo peso molecular, foi empregada para mascarar os grupos silanóis residuais. A metodologia foi seletiva e capaz de quantificar o cetoconazol em baixas concentrações em várias preparações farmacêuticas (comprimidos, cremes e xampus), sem a interferência das impurezas e dos excipientes das formulações, sendo o pH fator importante na separação do cetoconazol, ocorrendo ótima separação a pH 4,0 (LOW; WANGBOONSKUL, 1999).

O cetoconazol também tem sido determinado por CLAE na presença de seus produtos de degradação ácida e sem a interferência dos excipientes nos trabalhos de Velikinac et al. (2004), onde é utilizado metanol e solução de acetado de amônio 0,5% (80:20) como fase móvel. Este estudo realiza metodologias por CLAE e eletroforese capilar, comparando os resultados, onde CLAE mostrou-se mais sensível e específico para a quantificação do cetoconazol em formas farmacêuticas emulsionadas. A eletroforese capilar pode ser usada para a separação de misturas de antifúngicos imidazólicos ou separação de enantiômeros.

Nos trabalhos de Kedor-Hackmann et al. (2006) foi realizada a determinação espectrofotométrica do cetoconazol em emulsões utilizando a primeira derivada no UV comparativamente a determinação por CLAE. Neste último, a fase móvel utilizada foi uma mistura de trietilamina em metanol (1:500 v/v): solução de acetato de amônio em água (1:200 p/v), 75:25v/v. As condições de análise foram fluxo de 1,0mL por minuto, tempo de corrida 6 minutos, temperatura ambiente ($24^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$), com detecção no UV com comprimento de onda 225nm.

3.7 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

A seguir, são apresentados os métodos de estudo de permeação e retenção cutânea.

3.7.1 Métodos de Estudo da Permeação e Retenção Cutânea de Fármacos

Estudos sobre a penetração cutânea de fármacos são extremamente importantes na otimização da elaboração de formas farmacêuticas de liberação, dérmicas e transdérmicas (LEVEQUE et al., 2003).

Métodos para quantificar a liberação e absorção de fármacos através da pele podem ser divididos em duas categorias: *in vivo* e *in vitro*.

Métodos *in vivo* têm sido freqüentemente usados com propósitos regulatórios, e se desenvolvem com experimentos com animais. Eles têm algumas vantagens sobre os métodos *in vitro*, que incluem a geração de uma cinética sistêmica e informações sobre o metabolismo. As desvantagens são o uso de animais vivos, a diferença de permeabilidade existente entre as peles das diversas espécies de animais (a pele de animal é normalmente mais permeável que a humana, e desta maneira pode-se superestimar os resultados para permeação cutânea humana), a necessidade de um material radio-marcado para facilitar a obtenção dos resultados (CHIEN, 2005).

As características *in vivo*, nem sempre serão satisfatoriamente reproduzidas, todavia sabendo-se que o passo limitante para a permeação cutânea *in vivo* é a difusão através do estrato córneo, uma metodologia *in vitro* bem fundamentada poderá produzir resultados bastante coerentes com os *in vivo* (BARRY, 1983, FRANZ, 1975, 1978).

As vantagens dos métodos *in vitro* sobre os métodos *in vivo* são que os primeiros podem ser usados igualmente bem com peles humanas e com as de espécies animais (porcos, macacos, ratos ou camundongos, sem pêlos); podem-se fazer muitas replicatas das análises, não se utilizando animais

vivos, podem-se administrar as condições do estudo especialmente a temperatura, e várias formas físicas podem ser investigadas, além disso, são facilmente realizáveis e não são dispendiosos. Como limitações, haveria a dificuldade de obtenção das membranas (usando pele humana), de armazenagem, custos e variabilidade da permeação, as condições da circulação sanguínea podem não ser reproduzidas totalmente (não levam em conta o metabolismo cutâneo), o transporte de moléculas de baixa solubilidade aquosa não é possível (a menos que um solvente como, por exemplo, o etanol seja adicionado para aumentar a solubilidade em água), não leva em conta o efeito de possíveis degradações e separações do estrato córneo do resto da epiderme e nem a ocorrência de mudanças fisiológicas e anatômicas, inevitáveis, devido à ausência da circulação sanguínea (ALLEN; PROPOVICH; ANSEL, 2007, CHIEN, 2005, VENTER et al., 2001).

Segundo Barry (1983), a pele retirada de animais pode variar em qualidade e permeabilidade, características verificadas em estudos onde quantificaram experimentalmente as diferenças entre as peles humanas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em relação à penetrabilidade do soluto. A variação intraespécie humana calculada por meio do coeficiente de variação, em teste *in vivo* foi de cerca de 30% e a interesespécie 45%. Os parâmetros *in vitro* mostraram 45% para a intraespécie e 65% para interesespécie.

A absorção cutânea é primeiramente um processo passivo, e os estudos realizados em adequadas condições *in vitro* têm produzido resultados que confirmam a aplicabilidade do estudo, para grande quantidade de substâncias químicas (CHIEN, 2005; WESTER, R. C.; MAIBACH, 1989). Estas práticas são úteis, por exemplo, para prover informações sobre as diferenças na liberação de determinado fármaco quando em diferentes veículos (OECD, 2002; OECD, 2004). São úteis para avaliar parâmetros físico-químicos tais como o coeficiente de partição, o fluxo e coeficiente de difusão dos fármacos (BARRY, 1983).

3.7.2 Fundamentos da Permeação Cutânea *In vitro*

Em produtos dermatológicos é desejável que o fármaco administrado tenha pequeno fluxo e alta retentividade nas membranas. Ao contrário, nos produtos transdérmicos, o efeito desejável é sistêmico e, portanto, esperam-se baixa retentividade do fármaco nas membranas e um grande fluxo através das mesmas (TOUITOU; MEIDAN; HORWITZ, 1998).

Uma terapia efetiva nas enfermidades cutâneas requer que o agente ativo seja liberado no sítio de infecção, em concentrações adequadas para produzir o efeito farmacológico. No caso de infecções superficiais da pele, onde o agente patogênico reside sobre ou entre as camadas mais externas da pele, o produto terapêutico deve ser liberado no estrato córneo em concentrações adequadas para inibir o crescimento do agente patogênico (PERSHING; CORLETT; JORGENSEN, 1993). Para produtos dermatológicos, estes estudos são realizados de modo que o fármaco seja liberado da formulação onde está veiculado, e se difunda através de uma membrana que pode ser de origem natural (humana ou animal) ou artificial, para uma solução receptora (OECD, 2004).

A pele humana obtida de cirurgias de mama, ou a partir de cadáveres, tem sido utilizada, mas muitos pesquisadores têm realizado seus estudos usando peles animais como modelo, sendo a de porco, estruturalmente mais próxima da humana, um das mais usadas (TOUITOU; MEIDAN; HORWITZ, 1998).

O coeficiente de partição ($\log P$) é geralmente usado para prever a penetração no estrato córneo. Considera-se $\log P$ entre 2 e 3 como ótimo para liberação tópica, no entanto, tais considerações se referem mais a pequenas moléculas, com menos cadeias de grupos polares (ABDULMAJED; HEARD, 2004).

No estudo de permeação cutânea *in vitro*, as condições termodinâmicas devem ser mantidas para que o processo ocorra com eficiência. O veículo doador deve manter a membrana exposta a uma constante concentração do permeante, e a fase receptora cujas amostras

são colhidas em intervalos de tempo pré-determinados, deve garantir condições termodinâmicas favoráveis ao fármaco. Efetua-se então a determinação analítica da concentração do fármaco liberado (OECD, 2004 PHARMACOPEIAL FORUM, 2006). Todos estes pontos devem ser examinados, com bastante cuidado quando os experimentos são realizados com substâncias com limitada solubilidade em água (LÓPEZ et al., 1998).

A liberação do fármaco a partir do medicamento e a partição deste para a membrana são verificadas pela quantificação do fármaco restante na formulação após o intervalo total do estudo de permeação e pela análise feita na pele após o estudo *in vitro* (CHIEN, 2005). A determinação da concentração do fármaco na pele, ao final do período de exposição, requer a remoção do excesso de formulação, seguido de extração em um adequado solvente. Usando então uma técnica analítica sensível como CLAE, se quantifica o fármaco extraído. A quantidade de fármaco retido nas camadas da pele é igual à quantidade inicial menos a quantidade final de fármaco presente (TOUITOU; MEIDAN; HORWITZ, 1998).

Vários compostos de aplicação tópica exibindo uma larga variedade de propriedades físico-químicas e estruturas químicas foram examinados por Reifenrath et al. (1994), quanto à penetração na pele, demonstrando a capacidade barreira da pele total e não somente do estrato córneo e das camadas epidérmicas, para as substâncias aplicadas topicamente, e sendo os estudos destes autores citados nos trabalhos de Touitou; Meidan e Horwitz, (1998).

Embora estas determinações na pele total sejam fáceis e rapidamente realizadas, elas têm a desvantagem de não fornecer dados sobre a real localização do fármaco. A camada córnea, a camada mais externa da pele pode ser separada do resto da epiderme + derme por processos especiais. Desta maneira pode-se refinar os resultados, aplicando várias e distintas extrações nas diferentes camadas de pele separadas.

A área mais externa da pele (camada córnea) que ficou exposta a permeação, pode sofrer o processo chamado de *tape-stripping*, ou seja, nela são passadas fitas adesivas cujas características e número de extrações

variam de acordo com as diversas técnicas, e são padronizados para cada fármaco. Estas fitas adesivas são recohidas em um solvente capaz de solubilizar o fármaco, e as soluções obtidas são analisadas por método analítico, normalmente por CLAE (TOUITOU; MEIDAN; HORWITZ, 1998). Este método tem como limitação não remover totalmente o estrato córneo (OTTO et al., 2005).

Nos estudos *in vitro*, após a remoção do estrato córneo, a pele restante, o conjunto epiderme sem estrato córneo + derme é picotada e submetida à extração do fármaco retido, com o uso de solventes adequados. A penetração através da camada barreira geralmente também é quantificada por amostragens da solução receptora em intervalos de tempo durante o período total de estudo, então todas as soluções são analisadas por métodos analíticos sensíveis (BARRY, 1983).

Várias técnicas analíticas podem ser usadas para medir a concentração do permeante, mas cintilografia, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência, são as mais utilizadas devido à sensibilidade destes métodos, os quais monitoram a liberação do fármaco em estudo, na solução receptora, ou a taxa de perda do fármaco a partir da fase doadora.

3.7.3 Aparelhos Utilizados nos Estudos de Permeação Cutânea *In vitro*

Para avaliação da liberação de fármacos de sistemas transdérmicos *in vitro*, a literatura oficial (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2006) disponibiliza e fornece as especificações respectivas de vários aparatos, a saber:

- a) Aparato 5 – com pá e disco;
- b) Aparato 6 - com cilindro rotatório;
- c) Aparato 7 – com suportes recíprocos;
- d) Aparato 8 – células de difusão.

Para a avaliação das formas farmacêuticas emulsionadas de uso dermatológico, a literatura científica relata o uso estudos de permeação e

retenção cutânea, *in vitro*, utilizando a “célula de difusão ou de Franz” (FRANZ, 1975, 1978), esquematizada na Figura 5, e que se baseia em dois sistemas de funcionamento: de fluxo contínuo (aonde a solução receptora continuamente vai sendo bombeada), e de fluxo estático (aonde a solução receptora é constante durante todo o experimento). O sistema de difusão de Franz é bastante utilizado devido ao seu baixo custo, boa reprodutibilidade dos resultados e realização em pequeno espaço de tempo, comparativamente a outras técnicas (LEVEQUE et al., 2003).

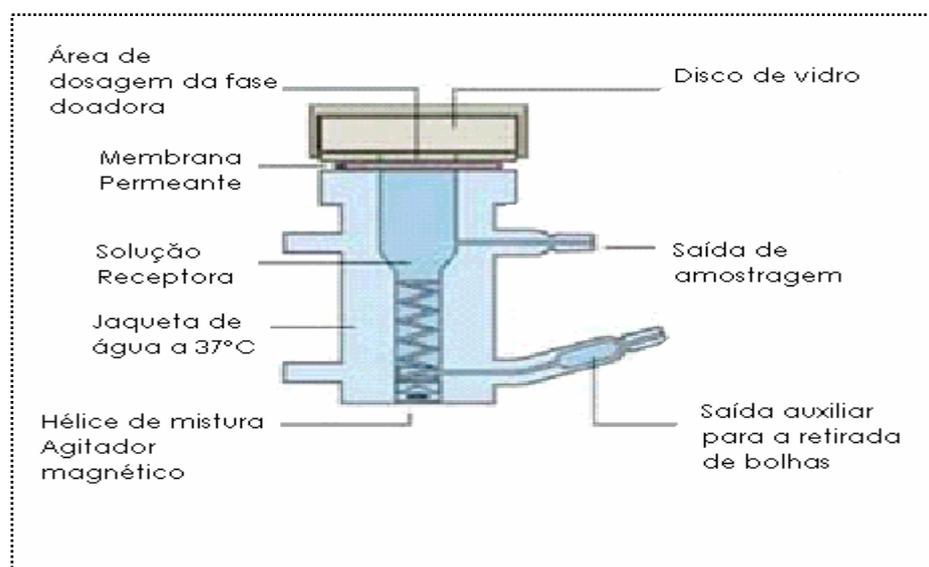


Figura 5 Esquema da célula de difusão (Microette Plus-Hanson Research ®) empregada nos estudos de liberação e permeação cutânea *in vitro*

Qualquer que seja a célula de difusão escolhida, ela consistirá de um compartimento doador e um compartimento receptor entre os quais a pele é posicionada.

Cada aparelho tem certo número de células de difusão, e estas têm todas, uma igual superfície de área (numa faixa de 0,3 a 5cm²). A pele preparada é posicionada na célula de modo que o estrato córneo fique para cima. O sistema deve possibilitar agitação constante, temperatura controlada e facilidade de amostragens da solução receptora (OECD, 2004).

3.7.4 Membranas e Soluções Receptoras Utilizadas nos Estudos de Permeação Cutânea *in vitro*, em Células Tipo Franz

Os estudos de liberação e permeação cutânea *in vitro* têm seus resultados mais próximos dos obtidos *in vivo* quando se utilizam membranas permeantes.

A investigação da permeabilidade da membrana é freqüentemente realizada por metodologias *in vitro*, que têm sido estabelecidas como úteis ferramentas para a estimativa da penetração cutânea de fármacos, especialmente devido à dificuldade em realizá-las em estudos *in vivo*, e já em 1975, estudos de Franz sobre absorção percutânea *in vitro* de doze compostos orgânicos utilizando pele humana, obtiveram boa correlação nos resultados em comparação com os testes *in vivo*. Segundo este autor, a permeação cutânea realizada com pele humana armazenada por um período de 3 meses em congelador, não alterou as características de permeação cutânea desta, em relação aos mesmos compostos orgânicos (FRANZ, 1975).

Nos trabalhos de Bronaugh e Franz (1986), com pele humana, três fármacos (cafeína, ácido benzóico e testosterona), foram analisados em estudos de absorção cutânea *in vitro* e *in vivo* quando solubilizados em três diferentes veículos (vaselina sólida, gel de etilenoglicol e gel hidrofílico) e nas condições do experimento, a cafeína penetrou mais rapidamente, quando veiculada na vaselina sólida, e a maior absorção do fármaco testosterona foi quando veiculado em gel hidrofílico, o ácido benzóico mostrou resultados de difícil interpretação.

Os autores Toruan-Purba; Tabibi e Mendes (1993), estudaram a permeação cutânea tentando buscar membranas animais, como alternativas para as membranas naturais humanas. A membrana natural de cobra foi utilizada (*Elaphe obsoleta*), mostrando vantagens na utilização sobre a pele retirada de cadáveres humanos, pela fácil obtenção e por não haver necessidade de sacrificar o animal.

A membrana artificial de silicone foi utilizada no estudo de permeação cutânea das soluções saturadas dos fármacos cianofenol e cianonaftaleno solubilizados em diferentes veículos (água, etanol e polietilenoglicol 400). Os resultados demonstraram que os veículos podem ter um importante grau de penetração por si só, e ainda podem afetar o grau de permeação dos fármacos neles solubilizados. Água destilada foi usada como solução receptora sendo freqüentemente agitada e mantida a 25°C (WATKINSON et al., 1995).

Derivados sintéticos da capsaicina, a nonivamida (NVA) e o acetato de nonivamida sódica (SNA) foram analisados em estudo de permeação utilizando diferentes proporções etanol-solução tampão pH 7,4 como solução receptora, a 37°C. A proporção mais adequada para o estudo em questão foi a utilização de 50% de etanol e 50% de solução tampão pH 7,4. Várias formulações bases, com diferentes hidrofílicidades contendo os fármacos, e ainda diversos tipos de pele foram analisados. O fluxo através das membranas foi calculado e se mostrou menor para a pele humana, seguida da de porco, coelho, rato, silicone e camundongo, para ambos os fármacos estudados quando em bases hidrofílicas (FANG et al., 1995).

Os psoralenos, 8-metoxipsoraleno; 5-metoxipsoraleno e 4,5',8-trimetilpsoraleno (comumente usados no tratamento de psoríase e vitiligo) foram avaliados em células de difusão de Franz® em estudo de permeação cutânea utilizando como solução receptora 1,4% de soro albumina humana em solução tampão fosfato pH 7,4. A escolha desta solução foi feita pela similaridade com a composição do fluido intersticial da pele. As solubilidades e também dos respectivos coeficientes de partição, foram avaliados. A quantidade acumulada do permeado no tempo total do estudo (24h), foi inversamente correlacionada com a lipofílicidade do fármaco. Os resultados do estudo de permeação nas 24 horas permitiram predizer que o 4,5',8-trimetilpsoraleno é o mais conveniente fármaco para aplicação tópica em terapia específica contra o vitiligo e psoríase, devido a sua fraca penetrabilidade. Os resultados também permitiram demonstrar a influência da polaridade molecular na permeação cutânea (SAÏD et al., 1997).

O captopril pode ser ionizado em solução aquosa e afetar a capacidade de absorção cutânea. As características de permeação cutânea desta espécie iônica foram verificadas através de pele de rato, em células de difusão tipo Franz horizontal, utilizando solução tampão McIlvaine como solução receptora sob várias condições de pH, e utilizando tensoativos como possíveis promotores da permeação. Os resultados obtidos permitiram dizer que entre os tensoativos não iônicos o efeito promotor é mais pronunciado quando a hidrofilicidade dos mesmos é mais acentuada (WU et al., 1996).

A verificação da permeação cutânea e da histopatologia de análogos da capsaicina foi feita por Lee et al. (1997), utilizando células de difusão tipo Franz® vertical, e solução receptora salina isotônica a 32°C. Peles de camundongo, de hamsters, ratos fêmea, e humana, foram utilizadas e os resultados foram significativos para a utilização desta nova formulação como sistema de liberação em formulações transdérmicas. O fluxo do fármaco se mostrou mais alto quando peles de camundongos sem pêlos foram usadas, entretanto mais baixo quando se utilizou pele de hamsters.

Soluções saturadas 75% em solução tampão pH 6,2 comparativamente a soluções saturadas com excesso dos mesmos componentes, de uma série homóloga de fenil-álcoois, foram estudadas *in vitro*, em células de difusão vertical do tipo estático, utilizando-se como solução receptora solução salina-tampão pH 7,4, temperatura 37°C. Ficou demonstrado principalmente a importância de se estabelecer as condições experimentais na determinação do coeficiente de permeabilidade (LÓPEZ et al., 1998).

A mucosa bucal de porco foi utilizada no estudo de permeação *in vitro* em células de Franz® do óleo essencial de *Salvia desoleana* Atzei & Picci e deste veiculado em preparações do tipo microemulsão, hidrogel e microemulsão-hidrogel, objetivando a otimização da permeabilidade deste óleo por meio de um acelerador da permeação: o dietilenoglicol monoetiléter (TRANSCUTOL®). A mistura água-etanol (3:2 v/v) foi usada no compartimento receptor de volume 4,8 mL, com o objetivo de solubilizar os

componentes do óleo essencial, e estes foram capazes de permear a mucosa bucal de porco (CESCHEL et al., 2000). Todas as formulações mostraram um alto coeficiente de permeabilidade em comparação com o óleo essencial puro. Este óleo essencial foi considerado útil para uma possível aplicação no campo da estomatologia.

Peles de orelhas de porco e peles de cadáveres humanos foram utilizadas num estudo de comparação do efeito dos álcoois graxos (saturados e insaturados), como promotores na permeação cutânea *in vitro* da melatonina, em células de difusão de Franz (PERMEGEAR®), utilizando como solução receptora tampão fosfato pH 7,4. Maior fluxo foi observado com os álcoois graxos saturados e com número de carbonos entre 8 a 10. Acima de 10 carbonos, entretanto, houve um decréscimo na permeação cutânea em ambas as peles utilizadas. Os álcoois insaturados mostraram aumentar a penetração cutânea da melatonina de acordo com o aumento do número de duplas ligações a partir de uma (álcool oléico) para três (álcool linolêico). Com um número superior a três duplas ligações, entretanto, houve uma diminuição do fluxo através de ambas pele de porco e pele humana. A presença de duplas ligações pode favorecer a formação de torceduras (nós) na estrutura lipídica da pele, permitindo a permeação de água através desta. O mecanismo pelo qual os álcoois graxos aumentam a permeabilidade cutânea parece envolver o rompimento das densas camadas lipídicas as quais preenchem o espaço extracelular (ANDEGA; KANIKKANNAN; SINGH, 2001).

As peles de porco são usadas devido a sua similaridade com a pele humana em termos de morfologia e características de permeabilidade (características morfológicas e funcionais semelhantes à pele humana) (OECD, 2004). As fibras elásticas na derme, as enzimas presentes na epiderme, o tempo de *turnover* do tecido epidermal, as proteínas queratínicas e a espessura da epiderme da pele de porco, são características de similaridade à pele humana, havendo diferenças, no entanto em relação à constituição do tecido gorduroso e na vascularização das glândulas cutânea. Não obstante, os fatos mencionados, a peles de

ratos são freqüentemente utilizados devido ao maior número de estudos sobre toxicidade já desenvolvidos nestes animais em relação aos demais (ANDEGA, KANIKKANNAN; SINGH, 2001).

A liberação do fármaco flurbiprofeno veiculado numa hidrogel, foi verificada num estudo de difusão em células de Franz, tendo na fase doadora a tomada de amostra de 1g da formulação e na fase receptora solução contendo 10mL de tampão fosfato-citrato pH 7,4. O estudo foi conduzido frente a diversos polímeros de celulose e incorporação de cosolventes, demonstrando a interferência dos veículos na liberação e permeação cutânea deste fármaco (FANG et al., 2003).

Segundo a OECD (2004), a solução receptora deve ser compatível com a metodologia de análise e elaborada com o conhecimento dos parâmetros de solubilidade e estabilidade da substância a ser testada e no modelo estático de células de difusão, o volume recomendado é entre 2-20mL. A OECD também preconiza para substâncias lipofílicas, a utilização de solventes orgânicos como etanol (mistura etanol: água, 1:1) e 6% de polietilenoglicol 20 oleil éter em água para garantia da solubilidade das mesmas na solução receptora.

Membranas sintéticas como polidimetilsiloxano (PDMS) podem ser empregadas para estudar a partição na camada barreira da pele humana. Estas membranas representando membranas artificiais e membranas de porco naturais foram usadas no estudo de liberação de dois fármacos, um hidrofílico a cafeína ($\log P$ 0,07), e um lipofílico a testosterona ($\log P$ 3,32), objetivando a determinação dos respectivos coeficientes de permeabilidade e caracterizando a distribuição estatística dos dados. Os resultados nas duas membranas foram similares. Respectivamente para a cafeína e para a testosterona, como soluções receptoras foram utilizadas a solução tampão fosfato pH 7,4, e solução tampão fosfato adicionada de etanol em células de difusão de Franz (KHAN et al., 2005).

Para a determinação da penetração cutânea da ciclosporina através da membrana de porco, foi utilizado em células de difusão de Franz na fase doadora uma tomada de amostra de 100mg de uma solução 4%(p/p) em

propilenoglicoloma, e na fase receptora, solução composta de solução tampão fosfato pH 7,2 100mM, contendo 10% de etanol. Estudos anteriores têm demonstrado a utilização de soluções receptoras contendo até em torno de 33% de etanol para aumentar a solubilidade dos fármacos nestas. Os resultados das análises das concentrações retidas no estrato córneo e na epiderme sem estrato córneo + derme foi determinada após 12 horas da aplicação sobre a pele, após vários procedimentos de extração e análise por CLAE, pela acuracidade e precisão obtidos, foram importantes para a elaboração de adequadas formas farmacêuticas considerando as vantagens terapêuticas da administração deste fármaco por via tópica, no tratamento das infecções cutâneas (LOPES; BENTLEY, 2005).

A pele de rato foi também utilizada em estudo *in vitro* em células de difusão de Franz, para a verificação da ação de promotores da permeabilidade cutânea, por Nokhodchi et al. (2003), e os resultados foram compatíveis com os obtidos em peles humanas.

Membranas de ratos fêmeas com 4 a 6 semanas retiradas da parte dorsal da pele sem pêlos foram usadas em *estudo* de liberação *in vitro* em sistema de difusão de Franz® (Microette Hanson Research Corporation®), das micropartículas de vitamina E contidas em formas farmacêuticas semi-sólidas emulsões O/A e A/O. Para fármacos altamente insolúveis, em meio aquoso, as vezes se torna necessário (para que as *sink conditions* sejam mantidas) adicionar a esta solução algum componente que facilite a solubilização, sendo muito usados os tensoativos não-iônicos como o polissorbato 80. Como solução receptora foi utilizado 7mL de solução isotônica tampão fosfato pH 7,2 contendo 2 mM de polissorbato 80 (ALENCASTRE, 2006)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Fármacos e Medicamentos em Estudo

Padrão secundário cetoconazol – Sigma - Aldrich

Matéria - prima Cetoconazol – Globe Química

Medicamentos contendo cetoconazol 2%do comércio brasileiro:

Medicamento de referência - creme Nizoral® Janssen Cilag
[formulação (E)]

Medicamentos genéricos – formulações (F), (G), (H), (I), (J) e (K).

4.1.2 Matérias- primas e Reagentes

Acetato de amônio P.A

Ácido clorídrico – P.A.

Água puificada- grau analítico I – PURITECH-PERMUTION®

Álcool cetílico

Álcool cetoestearílico

Álcool cetoestearílico 20 OE – VOLPO® CS 20

Álcool cetoestearílico 20 OE - EUMULGIN® B12

Álcool estearílico

Álcool etílico absoluto – P.A

Cera autoemulsionante não iônica (Álcool cetoestearílico e álcool cetoestearílico etoxilado, estearato de sorbitano e monooleato de sorbitano etoxilado 20OE)- POLAWAX® NF

Fosfato monobásico de potássio – P.A.

Hidróxido de sódio - P.A.

Metanol - grau CLAE – J. T. BAKER

Metilparabeno –NIPAGIN®
Miristato de isopropila - CRODAMOL® IPM
Monoestearato de sorbitano - SPAN®60
Monoleato de sorbitano – SPAN®80
Monoleato de sorbitano etoxilado – TWEEN®80 (POLISSORBATO 80)
Oleato de decila – CETIOL V®
Peles de orelhas de porco – Matadouro Basso
Propilenoglicol
Propilparabeno - NIPAZOL®
Edetato de sódio ou ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA)
Triglicerídios do ácido cáprico e caprílico – CRODAMOL® GTCC
Vaselina líquida

4.1.3 Equipamentos e Utensílios

Agitador magnético - MICROQUÍMICA® - modelo MQAMA 301
Balança analítica – METTLER TOLEDO® - modelo AG 245
Balança analítica - GEHAKA® modelo BG 2000
Banho-maria – NOVA TÉCNICA® modelo NT 265
Bisturi
Capela
Centrifuga – EXCELSA BABY FANEM®
Embalagens primárias – potes plásticos de polietileno com parede dupla
Estufa-FANEM®
Filtros de seringas com porosidade 0,2µm -SARTORIUS® RC15
Geladeira - ELECTROLUX®
Lâminas para bisturi tamanho 15 e 24
Membranas filtrantes de acetato de celulose com porosidade 0,45µm -
SARTORIUS® AG modelo PTFE
Micropipetas automáticas ajustáveis 100µL -1000 µL- BRAND®
pHmetro digital GEHAKA® – modelo PG 2000

Pinça anatômica

Pipetas calibradas – 0,5mL – 5,0mL

Pipetas volumétricas – 1mL; 2mL; 3mL;5mL;10mL

Sistema com células de difusão e sistema de agitação mecânica PERMEGEAR®

Sistema de filtração à vácuo

Ultraturrex® - IKA® modelo T18 basic

Ultra-som – ELMA TRANSSONIC® 460/H

Viscosímetro BROOKFIELD®DVII+ (análise dos dados pelo programa WINGATHER® V1.1 Engineering Laboratories)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.2.1.1 Condições cromatográficas:

- Cromatógrafo VARIAN® 210 com bomba ternária, três pistões, injetor Rheodyne® (*loop* de 20 µL).
- Coluna cromatográfica C18 de fase reversa de 150 x 4,6mm com tamanho das partículas 5µm, modelo MICROSORB® MV 100 C 18.
- Detector UV de arranjo de Fotodiodos com variável comprimento de onda PROSTAR® 320 operando no comprimento de onda de 225nm.
- Injeção automática, condição isocrática
- Fase móvel*- mistura da solução de acetato de amônio 0,5% em água ultrapura e Metanol (20:80 v/v).
- Tempo de retenção - 4,66 ± 0,24 min
- Tempo de corrida – 6 min
- Temperatura da análise – temperatura ambiente (25°C)
- Temperatura da amostra nos *vials* - 15°C
- Fluxo --1,0mL /min

- Injeção em triplicata - 20µL
- Lavagens da agulha – três vezes com metanol

4.2.1.2 Fase Móvel

Com base na metodologia proposta por Velikinac et al. (2004), utilizou-se como fase móvel a solução de acetato de amônio 0,5% adicionada ao metanol (20:80v/v). A mistura foi em seguida filtrada, utilizando o sistema filtrante e filtros de papel com 0,45µm e deaerada por sonicação por 30 minutos em Ultra-som. Esta solução foi previamente preparada no momento da realização das análises.

4.2.2 Construção da Curva Analítica do Cetoconazol por CLAE

A curva analítica foi construída com 8 pontos (VELIKINAC et al. 2004). Segundo a metodologia descrita na Resolução RE nº 899 da ANVISA em “Guia para validação de métodos analíticos” (BRASIL, 2003), são necessários no mínimo 5 concentrações diferentes, e procedimentos alternativos devem ser justificados.

Com três pesagens em dias diferentes, a solução estoque padrão de cetoconazol foi preparada utilizando-se uma amostra de 10mg de cetoconazol padrão secundário, solubilizado em metanol em um balão volumétrico de 10mL, sendo em seguida o volume ajustado até a marca com o mesmo solvente. Obteve-se desta maneira soluções de concentração 1000µg/mL. Estas soluções foram diluídas em triplicata (n=9), obtendo-se uma série de soluções finais com concentrações de 6, 10, 12,5, 25, 50, 125, 250 e 500µg/mL, Tabela 1, e uma solução padrão em metanol com concentração 100µg/mL, sendo esta última, utilizada como solução padrão nas determinações por CLAE.

Tabela 1 Curva analítica do cetoconazol em metanol

Amostras	Solução Estoque(mL) 1mg/mL	Metanol (mL)	Concentração obtida $\mu\text{g/mL}$
1	0,15	q.s.25	6,0
2	0,25	q.s.25	10,0
3	0,31	q.s.25	12,5
4	0,63	q.s.25	25,0
5	1,25	q.s.25	50,0
6	3,13	q.s.25	125,0
7	6,25	q.s.25	250,0
8	12,15	q.s.25	500,0

No cromatógrafo foram feitas injeções de 20 μL . Os picos obtidos no tempo de retenção atribuído ao cetoconazol, proporcionaram o cálculo das áreas para cada concentração, obtendo-se a equação da reta (equação de regressão linear), os coeficientes de correlação e determinação, por meio dos mínimos quadrados. O desvio padrão relativo (DPR), foi obtido para cada ponto da curva.

4.3 COMPOSIÇÃO QUALITATIVA DAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS

A Tabela 2 a seguir descreve a composição qualitativa da formulação referência (E) e das especialidade farmacêuticas do comércio, utilizadas neste trabalho e aqui designadas (H, J, K),

Tabela 2 Composição das especialidades farmacêuticas (E);(H);(J);(K)

Especialidades Farmacêuticas			
E	H	J	K
Álcool cetílico	Álcool cetílico
.....	Álcool estearílico
Álcool cetoestearílico	Álcool cetoestearílico	Álcool cetoestearílico
Monoestearato de sorbitano	Estearato de sorbitano	Estearato de sorbitano	Monoestearato de sorbitano
Polissorbato	Polissorbato 60	Polissorbato 60 e 80	Polissorbato 60
Miristato de Isopropila	Miristato de Isopropila	Miristato de isopropila	Miristato de isopropila
Propilenoglicol	Propilenoglicol	Propilenoglicol	Propilenoglicol
Sulfito de sódio	Sulfito de sódio	Sulfito de sódio	Sulfito de sódio
Água purificada	Água deionizada	Água purificada	Água purificada
Cetoconazol 20mg/g creme	Cetoconazol 20mg/g creme	Cetoconazol 20mg/g creme	Cetoconazol 20mg/g creme
.....	Vaselina branca
.....	Metilparabeno
.....	Propilparabeno

Nota: Formulação (E) Nizoral® creme 2% (Janssen-Cilag I®)

A Tabela 3 traz a descrição da composição qualitativa das demais especialidades farmacêuticas do comércio utilizadas neste trabalho, e designadas como (F, G, I).

Tabela 3 Composição das especialidades farmacêuticas (F):(G):(I)

Especialidades Farmacêuticas			
F		G	I
Cera emulsionante	auto-	Simeticone	Cera auto-emulsionante
Lanolina anidra		Álcool cetoestearílico	Monoestearato de sorbitano
Óleo mineral		Álcool cetoestearílico etoxilado	Miristato de Isopropila
Vaselina		Oleato de decila	Vaselina líquida
Propilenoglicol		Propilenoglicol	Propilenoglicol
Dimeticonol		Edetato de sódio	Glicerina
Fenoxietanol		Metilparabeno	Parabenos
Metilparabeno		Propilparabeno	Butilhidroxitolueno
Butilparabeno		Metabissulfito de sódio	Sulfito de sódio
Etilparabeno		Água purificada	EDTA sódico
Propilparabeno		Cetoconazol 20mg/g creme	Água purificada
Sulfito de sódio		Cetoconazol 20mg/g creme
Acido cítrico	
Citrato de sódio	
Água deionizada	
Cetoconazol 20mg/g creme			

4.3.1 Preparo das Formulações para a Determinação do Teor em Cetoconazol

Para esta determinação, amostras de cada uma das especialidades farmacêuticas descritas nas tabelas 2 e 3, foram preparadas segundo Velikinac (2004), conforme descrito a seguir: uma quantidade da formulação creme, equivalente a 50mg de cetoconazol foi previamente pesada e

sonicada com 25mL em Ultra-som por 30 min, sendo a solução transferida para um funil de separação onde se procedeu a agitação enérgica por 10 minutos. Após este procedimento o sobrenadante filtrado por papel de filtro, foi coletado em balão volumétrico de 100mL, sendo o precipitado reservado a parte. Este procedimento de extração foi repetido por mais duas vezes. O precipitado total resultante foi submetido a centrifugação por 20 min a 3000rpm e as soluções extraídas após filtração foram adicionadas ao balão contendo as porções sobrenadantes filtradas, sendo o volume completado com metanol até 10mL. Uma alíquota de 2mL da solução sobrenadante final, foi diluída em balão de 10mL com metanol (solução estoque 100µg/mL) (VELIKINAC et al., 2004). Amostras de 1mL destas soluções estoque foram analisadas em triplicata por CLAE, nas condições cromatográficas estabelecidas no item 4.2.1 e os valores obtidos serviram para o cálculo do teor do cetoconazol nas formulações.

4.3.2 Determinação das Características Organolépticas e Físico-químicas

Os parâmetros adotados como características organolépticas foram cor, aspecto (observados a olho nu) e odor, como parâmetros físico-químicos a medida do pH e físicos a viscosidade.

A composição qualitativa e as características observadas para a formulação (E), serviram de ponto de partida para a elaboração no laboratório, das formulações não iônicas desenvolvidas para este projeto de estudo.

4.3.3 Estudo do Comportamento Reológico

Utilizando o programa WINGATHER® V1.1 (*Engineering Laboratories*) no Viscosímetro rotacional de BROOKFIELD®.DVII +, spindle S70 e temperatura 20°C estabeleceram-se uma seqüência de velocidades de cisalhamento crescentes e decrescentes que serviram para obtenção do tipo de comportamento reológico de cada formulação.

4.4 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES NÃO - IÔNICAS SIMULADAS NO LABORATÓRIO

Foram simuladas 10 formulações no laboratório baseadas na composição qualitativa da formulação de referência (E), tendo como modo de elaboração o sistema EHL. Paralelamente, 3 formulações contendo cera auto emulsionante, foram elaboradas. Em todas estas, manteve-se o mesmo emoliente da formulação (E).

4.4.1 Desenvolvimento de Formulações Não-Iônicas pelo Sistema EHL

A Tabela 4 descreve a composição das formulações elaboradas pelo sistema EHL, as quais após 48 horas do preparo foram analisadas conforme os itens 4.3.2 e 4.3.3. Com base nestes estudos, a formulação base foi selecionada.

Duas amostras da formulação base foram preparadas e nelas se procedeu a incorporação do fármaco na concentração de 2%, sendo que na primeira o cetoconazol foi previamente solubilizado à quente no propilenoglicol e acrescentado a fase aquosa da emulsão (A1), e na segunda apenas disperso em propilenoglicol à frio, e incorporado após a formulação pronta (B).

Após 48 horas em repouso, estas duas novas formulações foram avaliadas (a estabilidade das emulsões foi verificada apenas visando selecionar a melhor preparação e não a determinação do prazo de validade das mesmas) conforme descrito nos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3.

Tabela 4 Formulações não-iônicas segundo o sistema EHL

Matéria-prima	Formulações Não-Iônicas (EHL)									
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Alcool Cetílico	2,5	3,5	2,5	3,5	3,5	3,5	5,0	5,0	6,0	-----
Alcool Estearílico	2,5	2,5	3,5	3,5	3,5	3,5	5,0	5,0	6,0	-----
Alcool Cetoestearílico	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3,0	2,0	-----	12,0
Álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0	2,0
Polissorbato 80	-----	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Monoestearato de sorbitano	-----	1,0	1,0	1,0	1,0	-----	1,0	-----	1,0	1,0
Miristato de Isopropila	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	7,0	5,0	5,0	10,0	10,0
Propilenoglicol	5,0	5,0	5,0	5,0	7,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
EDTA dissódico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Metabissulfito Sódico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
BHT	0,1	0,1		0,1		0,1		0,1	-----	
Água Purificada	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
Cetoconazol	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

NOTA: Os valores constantes desta tabela são expressos em porcentagem

4.4.1.1 Desenvolvimento de formulações não-iônicas contendo diferentes emolientes

A composição da formulação base escolhida, contendo o fármaco solubilizado (A1), foi elaborada, e outras três formulações apenas pela substituição do emoliente miristato de isopropila isopropila por oleato de decila (A2), vaselina líquida (A3), e triglicerídios dos ácidos cáprico e caprílico (A4), foram respectivamente preparadas, conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5 Efeito dos emolientes na formulação não-iônica contendo o fármaco solubilizado

Formulação base	A1	A2	A3	A4
Álcool cetílico				
Álcool estearílico				
Álcool cetoestearílico etoxilado 20OE				
EMOLIENTE	Miristato de isopropila	Oleato de decila	Vaselina líquida	Triglicerídios dos ácidos cáprico e caprílico
Propilenoglicol				
Metabisulfito de sódio				
Edetato de sódio				
Monoestearato de sorbitano				
Polissorbato 80				
Cetoconazol				
Água purificada				

NOTA: As formulações acima seguiram o sistema EHL

4.4.2 Formulações Não-Iônicas contendo Cera Auto Emulsionante

Foram elaboradas três formulações (F11, F12 e F13) ambas contendo a mesma cera auto emulsionante (mistura de álcool cetoestearílico, álcool cetoestearílico etoxilado, estearato de sorbitano e monoestearato de sorbitano etoxilado 20 OE) em diferentes proporções (Tabela 6), e ainda o mesmo emoliente, miristato de isopropila (presente na formulação de referência). Após seleção da melhor composição da formulação base, elaborou-se duas novas formulações onde na primeira o cetoconazol foi solubilizado à quente em propilenoglicol e acrescentado à fase aquosa da emulsão (C) e na segunda, apenas disperso em propilenoglicol e incorporado à emulsão já pronta (D).

Todas as formulações após 48h de preparo foram analisadas nos mesmos parâmetros estabelecidas em 4.3.1; 4.3.2 e 4.3.3.

Tabela 6 Formulações não-iônicas contendo cera auto emulsionante

Matéria-prima	F11	F12	F13
Álcool cetoestearílico e álcool cetoestearílico etoxilado , estearato de sorbitano e monoleato de sorbitano etoxilado (20OE)	15%	14%	13%
Miristato de isopropila	10%	10%	10%
Propilparabeno	0,1%	0,1%	0,1%
Metabissulfito de sódio	0,2%	0,2%	0,2%
EDTA sódico	0,2%	0,2%	0,2%
Metilparabeno	0,2%	0,2%	0,2%
Propilenoglicol	5,0%	5,0%	5,0%
Água purificada	q.s.100%	q.s.100%	q.s.100%
Cetoconazol	2,0%	2,0%	2,0%

4.5 ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DO CETOCONAZOL

Para este estudo, inicialmente foi necessária a realização de testes prévios de solubilidade do fármaco cetoconazol, visando a escolha da solução receptora. Em seguida foi realizado o preparo das membranas permeantes (pele de orelhas de porco) para a utilização nas células de difusão.

4.5.1 Escolha da Solução Receptora

A escolha da solução receptora a ser utilizada no estudo da permeação cutânea *in vitro* foi baseada na solubilização da quantidade total do fármaco presente na tomada de amostra (2g e 0,2g das formulações contendo 2% do fármaco cetoconazol) no volume de solução receptora empregado no teste *in vitro* (11mL). A (Tabela 7) exemplifica várias proporções de vários componentes testados para este fim. A composição selecionada serviu para a elaboração da curva analítica.

Tabela 7 Componentes da Solução Receptora (SR)

Etanol	Polietilenoglicol20 oleil éter	Polissorbato 80	Tampão fosfato pH 7,4
10%	----	---	q.s100
20%	----	---	q.s100
30%	----	---	q.s100
40%	---	---	q.s100
10%	15%	---	q.s100
---	15%	---	q.s100
---	---	10%	q.s100
10%	3,0%	---	q.s100

Preparo da solução tampão fosfato pH 7,4

Esta solução preparada segundo a Farmacopéia Americana, (USP 29, 2006), é confeccionada adicionando-se 50ml de solução de fosfato monobásico de sódio (KH_2PO_4) 0,2M à 39,1ml de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2M. O pH foi verificado em pHmetro e procedido os ajustes para pH 7,4, com HCL puro ou sol de NAOH 10%.

4.5.2 Elaboração da Curva Analítica

Para a elaboração da curva analítica preparou-se uma solução com 10mg de cetoconazol padrão secundário em 100mL em etanol P.A., obtendo-se uma concentração 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir desta solução estoque, prepararam-se diluições obtendo as concentrações: 2; 4; 6; 8 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, conforme a Tabela 8. O coeficiente de regressão linear, e a equação da reta foram determinados.

Tabela 8 Curva analítica do cetoconazol em solução receptora

Amostra	Solução Estoque (mL)*	Etanol (mL)	Tampão fosfato pH 7,4 (mL)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	0,50	2,0	q.s.25	2
2	1,00	1,5	q.s.25	4
3	1,50	1,0	q.s.25	6
4	2,00	0,5	q.s.25	8
5	2,50	-----	q.s.25	10

Nota: solução estoque 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.5.3 Preparo das Membranas Permeantes

As membranas naturais utilizadas neste estudo foram obtidas por dissecação de peles de orelhas de porcos, jovens e albinos, e recém-abatidos. Inicialmente as orelhas foram lavadas em água purificada sendo o excesso de água retirado com papel absorvente. Após a seleção das peles

íntegras (livres de lesões, arranhões ou manchas) os pêlos foram cortados com tesoura. Em seguida com auxílio de pinça anatômica e bisturi, procedeu-se a dissecação extraíndo-se a epiderme conjuntamente com a derme, e descartando a hipoderme (tecidos subcutâneos e gordurosos presentes abaixo da derme) (Figura 6).

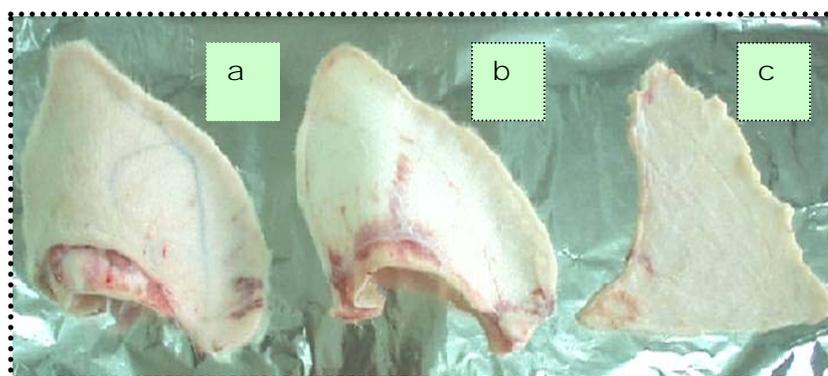


Figura 6 Orelhas de porco prontas para dissecação (a) e (b) e após dissecação (c)

As amostras de peles assim dissecadas foram cortadas em tamanhos padronizados e adequadas à utilização na área de permeação, e então acondicionadas em filme plástico e papel alumínio, e mantidas em congelador até o momento do uso (por no máximo 1 mês) (Figura 8).

Quando solicitadas estas peles foram retiradas do congelador e descongeladas à temperatura ambiente, sendo então cada fragmento de pele colocado numa célula de difusão.

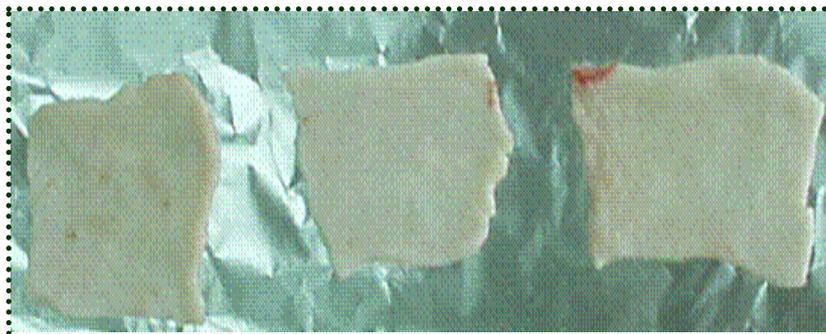


Figura 7 Orelhas de porco prontas para o estudo *in vitro* de permeação cutânea

4.5.4 Ensaio de Permeação Cutânea *in vitro* do Cetoconazol

O sistema de difusão utilizado (Figura 8), constou de 6 células de difusão, sendo uma delas utilizada para controle das análises (placebo).



Figura 8 Sistema de difusão contendo 6 células (PERMEGEAR®)

Os fragmentos de membranas devidamente preparados e descritos no item 4.5.3 foram colocados sobre as células de difusão, com a epiderme voltada para o compartimento doador e a derme voltada para o

compartimento receptor, o qual foi preenchido com a solução receptora, tendo-se o cuidado de evitar a formação de bolhas.

À temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, duas tomadas de amostra de cada formulação (uma contendo 2,0g e outra 0,2g), todas contendo 2% de cetoconazol, foram espalhadas uniformemente sobre a membrana permeante colocada sobre a área disponível para a permeação ($1,89\text{cm}^2$) nas células de difusão, sendo então o sistema de agitação acionado. Cada célula foi então coberta com filme plástico e papel alumínio, ficando assim durante todo o tempo do experimento.

Amostras de 1mL da solução receptora, foram coletadas nos intervalos de tempo de 15 min, 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24h, sendo repostos igual volume de nova solução receptora, mantendo-se desta maneira o volume constante no compartimento receptor. Os estudos foram feitos em triplicata, com um branco (sem o fármaco) para todas as formulações e nas duas tomadas de amostra.

Nas formulações genéricas e referência utilizou-se como controle apenas um fragmento de membrana, o qual sofreu os mesmos procedimentos realizados para as amostras.

As amostras coletadas foram analisadas por CLAE nas condições cromatográficas já especificadas em 4.2.1 a partir da curva analítica do cetoconazol na solução receptora.

Os valores permeados obtidos por CLAE servem para o cálculo dos parâmetros cinéticos (escolha do modelo cinético correspondente), tempo de latência (*Lag Time*) e fluxo (J) do cetoconazol através da membrana.

4.5.5 Estudo de Retenção Cutânea *in vitro* do Cetoconazol

A análise da retenção cutânea foi realizada após o término do tempo total estabelecido para o estudo de permeação cutânea *in vitro* (24h), e também nos tempos de 1h, 3h, 6h e 12 h.

As peles foram analisadas em todos estes tempos de coleta para todas as formulações e nas duas quantidades de tomada de amostra (2,0g e 0,2g), igual procedimento foi realizado também com os placebos.

Após o término do tempo de permeação cutânea estipulado, retiraram-se as membranas do aparelho de difusão e destas, com o auxílio de uma espátula as amostras dos cremes que sobraram, colocando-os em recipiente contendo metanol (25mL) e sonicando em seguida segundo descrito no item 4.3.1. Após diluição 1:10 em metanol estas soluções foram analisadas por CLAE, obtendo-se assim os valores do cetoconazol não-retido nas peles.

As peles foram lavadas com solução receptora (e as lavagens foram submetidas à análise). A área da pele exposta à permeação foi delimitada, recortada e picotada com auxílio de bisturi e lâmina e os fragmentos recolhidos em frascos contendo metanol (25mL), e então submetidos a sonicação em Ultra-som por 20 min.

Após este tempo os fragmentos em solução metanólica foram triturados (Ultraturrex®) até a total dilaceração da pele. A suspensão obtida foi novamente sonicada (30 minutos). A mistura assim obtida foi filtrada por papel de filtro (0,45µm) para balão volumétrico de 50mL e o volume completado com metanol. O cetoconazol foi assim determinado em todos os filtrados obtidos, por CLAE, utilizando-se a curva analítica do cetoconazol em metanol conforme já descrito no item 4.2.2. Desta maneira, determinou-se a quantidade de cetoconazol retido nas peles para todas as formulações e em todos os tempos de análise.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os métodos estatísticos empregados foram baseados na análise de regressão linear. Os dados cinéticos de tempo de meia vida foram calculados pela equação (EDGINTON; SHERMAN, 1971).

$$C = C_0 e^{-kt}$$

onde pode ser calculado quanto da concentração inicial (C_0) permanece após o tempo "t". A constante de proporcionalidade é "k," e o valor de "e" 2,7183. O gráfico cartesiano de $\ln (C_0 - C)$ versus "t" fornece uma linha reta, com a declividade "b" representando a constante de proporcionalidade. A recíproca da declividade, conhecida como vida média, multiplicada por 0,693 (logaritmo natural de 2) fornece o tempo de meia vida ($t/2$) que é o tempo exato em que 50% da concentração inicial é encontrada.

A associação entre os dados de dois pares de formulações foi também analisada e pela regressão linear. Um valor de coeficiente de correlação superior a 0,9 indica uma boa associação entre as duas variáveis e a aceitabilidade da comparação. A vantagem desse tipo de comparação sobre as comparações de médias (valores pontuais) é que as comparações são visualizadas em toda a dimensão dos valores obtidos, sejam altos médios ou baixos. Por tradição, consideram-se no eixo **x** os dados ditos de referência e no eixo **y** os dados para comparação.

Uma análise de regressão linear produz uma equação ($y = ax + b$), onde a, é o coeficiente linear, e b a declividade da reta. O valor de $b = 1$ indica a mesma grandeza dos valores x e y. Um valor de $b > 1$ indica maiores valores para y que os dos x, isto é, os dados "para comparação" são maiores. Um valor de $b < 1$ indica maiores valores para x do que os dos y, isto é, os dados "de referência" são maiores. O valor de b multiplicado por 100 indica a relação percentual da grandeza dos dados de absorção entre duas formulações estudadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos procedimentos metodológicos apresentados no capítulo anterior, os resultados são adiante estruturados de acordo com os métodos adotados.

5.1 MÉTODO ANALÍTICO

Para a realização dos ensaios de retenção e permeação cutânea do cetoconazol, nas formas semi-sólidas de uso tópico (emulsões), foi necessário primeiramente a escolha de um método analítico validado para a quantificação deste fármaco. Algumas metodologias analíticas foram encontradas para este fim na literatura científica, mas a que se mostrou mais sensível e reproduzível foi a metodologia proposta por Velikinac et al., (2004), onde é utilizado CLAE com detecção no UV na análise do medicamento referência–NIZORAL® creme a 2%.

Por haver concordância entre os resultados obtidos no laboratório e os propostos pelo autor quanto ao medicamento referência, utilizamos este método analítico em nossa proposta metodológica, adequando-o às demais formulações farmacêuticas.

5.2 CURVA ANALÍTICA DO CETOCONAZOL POR CLAE

A determinação do fármaco na solução padrão por CLAE foi feita em triplicata e em três dias diferentes, e com a preparação de nova fase móvel a cada dia, conforme a Tabela 9. Obteve-se repetibilidade entre os resultados intradia, e coerência entre os resultados interdia, sendo isto demonstrado pelos valores de desvio padrão relativo.

Tabela 9 Análise por CLAE da solução padrão do cetoconazol

Solução Padrão (100µg/mL)	Análise 1	Análise 2	Análise 3	Média	DPR
1	100,03	100,98	100,95	100,65	0,54
2	99,78	100,08	99,99	99,95	0,15
3	100,08	100,01	100,34	100,14	0,17
Média Geral				100,25	0,29

Fonte: (VELIKINAC et al.,2004).

A Figura 9 ilustra o cromatograma do cetoconazol padrão (100µg/mL), preparado segundo o item 4.2.1 da metodologia, e evidencia o tempo de retenção característico do fármaco, entre 4 e 5 minutos.

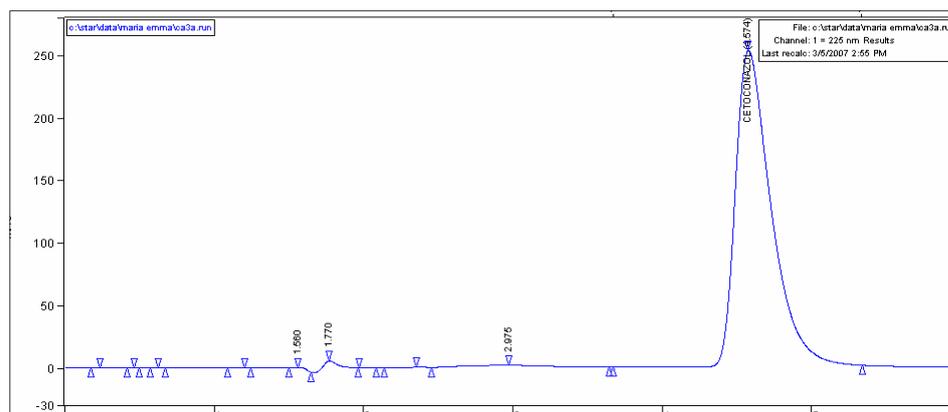


Figura 9 Perfil cromatográfico característico para o fármaco cetoconazol

Nota: Solução metanólica de cetoconazol padrão 100µg/mL

A Figura 10 mostra os cromatogramas obtidos para as diversas concentrações utilizadas na elaboração da curva analítica, evidenciando em todos o tempo de retenção característico entre 4 e 5 minutos para o cetoconazol.

A curva analítica do cetoconazol em metanol realizada segundo o item 4.2.2 da metodologia, mostrou-se linear (intercepto da reta: $y = + 3,72$).

$10^5x + 1,93 \cdot 10^6$), e sensível nas concentrações entre 6 e 500 $\mu\text{g/mL}$, indicando que nesta faixa de valores os resultados gerados mostram proporcionalidade à concentração do fármaco.

O coeficiente de determinação ($r^2= 0,9992$) e coeficiente de correlação ($r= 0,9996$) demonstram haver correlação linear entre as variáveis analisadas. Segundo Lanças (2004), coeficiente de determinação 0,98 já é satisfatório. Segundo a ANVISA, o coeficiente de correlação deve ser igual ou superior a 0,95 (BRASIL, 2003).

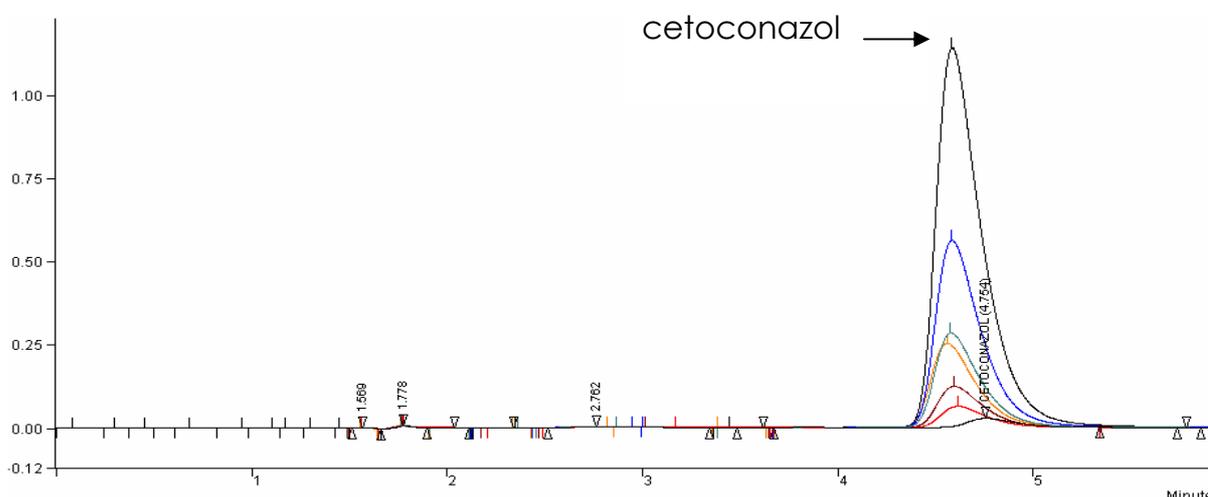


Figura 10 Cromatogramas ilustrando a curva analítica de calibração do cetoconazol em metanol

A Figura 11 mostra a representação gráfica do tratamento matemático aplicado à curva analítica do cetoconazol em metanol, de acordo com item 4.2.2 da metodologia.

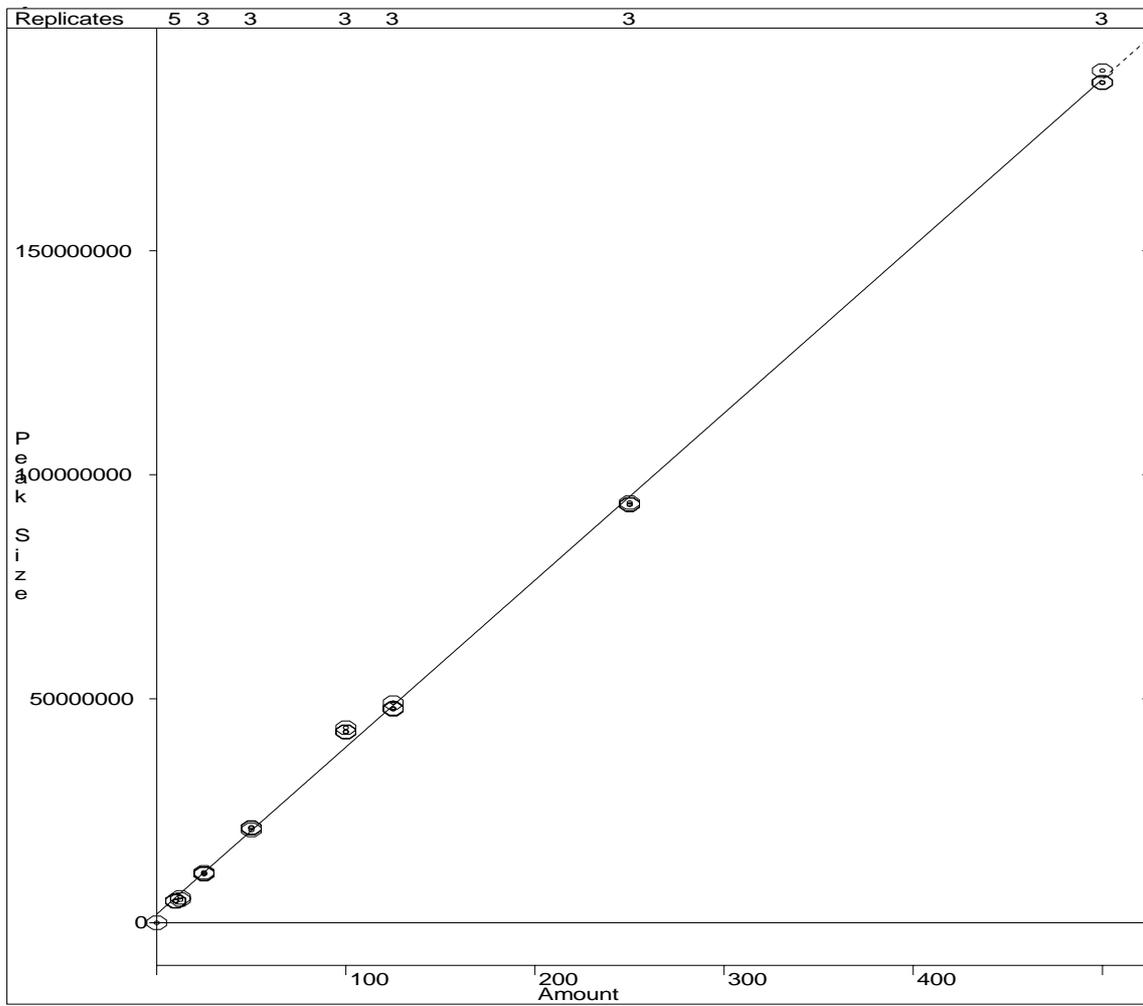


Figura 11 Curva analítica de calibração do cetoconazol

5.3 ANÁLISE PRELIMINAR DAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS

Foram analisadas, uma formulação de referência denominada formulação (E) e formulações genéricas (BRASIL, 2007) denominadas (F), (G), (H), (I), (J), (K).

Os critérios adotados para a escolha destas formulações dentre as demais do mercado, foram composição qualitativa e tipo de emolientes.

As análises foram sempre feitas comparativamente ao medicamento de referência.

5.3.1 Composição Geral

Conforme descrito na Tabela 2 do item 4.3 da metodologia, a formulação (E) possui emulsionantes não iônicos como o álcool cetílico, álcool cetoestearílico, monoestearato de sorbitano e polissorbato, como agentes estabilizadores e de consistência das emulsões. Como emoliente possui o miristato de isopropila, que lhe confere grande espalhabilidade e lubricidade à pele. O propilenoglicol está presente como umectante e provavelmente solubilizante do cetoconazol. O sulfito de sódio é um dos antioxidantes de escolha quando da utilização do fármaco cetoconazol. Na formulação (E) não foram indicados os agentes preservantes (conservantes e antioxidantes).

As especialidades farmacêuticas (H), (J), (K), descritas na metodologia no item 4.3, foram selecionadas por possuírem emulsionantes não iônicos e o mesmo emoliente miristato de isopropila, integrantes da formulação de referência (E). O emoliente miristato de isopropila está presente em todas as formulações analisadas, exceto em (F) e (G). Na formulação (H) há a combinação miristato de isopropila e vaselina branca. Na formulação (I) há a combinação miristato de isopropila e vaselina líquida. Na formulação (F), há a combinação da lanolina com vaselina líquida. Na formulação (G) oleato de decila, e o simeticone, estão presentes.

Muitas vezes os emolientes são usados em combinação entre si, para dar à pele uma sensação exclusiva, e nestes casos é preciso a verificação de que os mesmos sejam compatíveis e estáveis no sistema escolhido (KLEIN, 2005).

As formulações (F) e (I) possuem ceras auto emulsionantes (produtos não declarados). A formulação (G) possui emulsionantes semelhantes a (E).

O antioxidante sulfito de sódio está presente em (E), (H), (J), (K) e (I), sendo que nesta última formulação há também o butilhidroxitolueno (BHT). O antioxidante EDTA, ou EDTA sódico, está presente apenas em (G) e (I). Os compostos derivados dos parabenos (conservantes), se encontram em (F), (G), (I) e (H). O fenoxietanol se apresenta em combinação com os conservantes parabênicos na formulação (F). Derivados dos silicones como dimeticonol e simeticone, aparecem respectivamente em (F) e (G).

Todas as especialidades farmacêuticas analisadas, bem como a formulação de referência, possuem em sua composição o propilenoglicol como agente umectante, sendo que a formulação (I) possui também a glicerina. Com ação umectante o propilenoglicol e a glicerina são adicionados às formulações em concentrações próximas de 5% a fim de reduzir a evaporação da água na pele, e prevenir o ressecamento das formulações (concentrações muito altas podem remover a umidade natural da pele, desidratando-a). O propilenoglicol é recomendado para solubilizar compostos hidrolisáveis (AULTON, 2005), e ele provavelmente foi empregado também com a finalidade de auxiliar a solubilização do fármaco. A glicerina possui características especiais quando utilizada em produtos para uso tópico, pois sua viscosidade confere-lhe uma aderência prolongada às superfícies em que é aplicada (AULTON, 2005, LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

5.3.2 Modo de Elaboração

As formulações do comércio (E), (G), (H), (J) e (K) pela descrição da composição apresentada, provavelmente seguiram o sistema EHL como

modelo na elaboração das formulações. As ceras auto emulsionantes estão presentes nas formulações (F) e (I), e nestas os emulsionantes primário e o secundário fazem parte do mesmo composto em proporções balanceadas para promover estabilidade e consistência, embora, em algumas formulações note-se a necessidade da adição de agentes espessantes para que a viscosidade seja a pretendida (AULTON, 2005).

Os emulsionantes não-iônicos, que por sua baixa toxicidade são mais adequados que os aniônicos para utilização por via tópica, por via oral e parenteral, possuem poucos problemas de compatibilidade com outras substâncias, e, são menos sensíveis às variações de pH ou a adição de eletrólitos. Formam um grupo muito numeroso, possibilitando emulsões A/O ou O/A.

O monoestearato de sorbitano (éster de sorbitano) presente na maioria das formulações analisadas, é de caráter lipofílico e é usado freqüentemente associado aos polissorbatos que são derivados dos ésteres de sorbitano e de polietilenoglicol conferindo-lhes vários graus de hidrofília e lipofília, pela mudança no tipo do ácido graxo e no número de cadeias de polioxietileno. Os mais utilizados comercialmente são os polissorbatos 80 (monoestearato de sorbitano com 20 moles de polioxietileno) e 60 (monoestearato de sorbitano com 20 moles de polioxietileno). Os polissorbatos são compatíveis com a maioria dos materiais aniônicos, catiônicos e não-iônicos. Possuem pH neutro e são estáveis a altas concentrações de eletrólitos, com baixa toxicidade. Estudos sobre a relação entre o poder de solubilização e o coeficiente de partição do polissorbato 80, na elaboração de emulsões, mostraram haver uma relação linear entre estes dois parâmetros, podendo-se prever a habilidade do polissorbato 80 em solubilizar um fármaco pelo seu respectivo log P (ÑUNEZ; YALKOWSKY, 2000).

5.3.3 Incorporação do Fármaco Cetoconazol

O cetoconazol é uma base fraca, e na prática, os fármacos debilmente ácidos ou básicos são mais solúveis quando estão ionizados mas normalmente instáveis nestas condições. Esta condição acontece com a maioria dos fármacos, e recursos são utilizados para que se alcance a solubilização com a manutenção da estabilidade. Entre estes recursos utilizados estão a inclusão de solventes miscíveis na água (reduzem a polaridade do solvente), ou a adição de soluções tampões (acetato, citrato, lactato, fosfato e ascorbato) (JATO, 1997).

A formulação (F), apresenta em sua composição, ácido cítrico e citrato de sódio, provavelmente exercendo uma atividade tamponante para o cetoconazol. O cetoconazol pode sofrer processos de degradação como hidrólise e oxidação, especialmente em meio aquoso, se não for formulado adequadamente, sendo necessário, portanto a adequada solubilização e adição de agentes antioxidantes (SKIBA et al., 2000).

Os antioxidantes como o butilhidroxitolueno (BHT), presente apenas na formulação (I), são mais usados para evitar a oxidação do sistema oleoso. O metabisulfito de sódio e o agente sequestrante etilenodiaminotetracético (EDTA) na forma dissódica formam a combinação antioxidante de escolha para o fármaco cetoconazol (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Os ésteres do ácido parahidroxibenzóico, como o metil, etil, propil e butil ésteres e seus sais, são conservantes, usados nas concentrações 0,1-0,2%, sendo citados nas formulações (H), (F), (G) e (I). O fenoxietanol é efetivo contra alguns tipos de microrganismos e por isso geralmente é associado aos ésteres do ácido parahidroxibenzóico. Normalmente usado na concentração 0,5-1,0%, está presente apenas na formulação (F) (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

5.3.4 Elementos Oleosos das Formulações

Deve-se levar em consideração que os elementos oleosos que são muito variados e podem estar isolados ou em combinação,

desempenhando muitas funções, atuam sobre o parâmetro viscosidade do produto final e no transporte do fármaco através da pele (AULTON, 2005).

Alguns exemplos mais utilizados, como vaselina líquida, vaselina sólida, miristato de isopropila, triglicerídios dos ácidos cáprico e caprílico, parafina líquida, óleos de silicones, agem como solubilizantes das substâncias ativas, asseguram importantes propriedades de espalhamento, de emoliência, lubricidade e de hidrorrepelência. Miristato de isopropila é um éster de cadeia ramificada, largamente utilizado em produtos para o cuidado pessoal e farmacêutico, grande poder de espalhabilidade, lubrificante, co-solvente, plasticizante, baixo ponto de turbidez, diluente para óleos vegetais e minerais, grande poder de aumentar o poder solvente dos demais excipientes sendo compatível com óleos mineral e vegetal, ésteres sintéticos, silicones de baixa viscosidade e etanol (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

A vaselina líquida, também chamada de parafina líquida, petrovaselina ou óleo mineral, considerada um sistema coloidal constituído de uma mistura de hidrocarbonetos líquidos de elevado ponto de ebulição obtidos do petróleo, está presente na composição de (F), (I) e (H).

A capacidade de absorção de água pelas vaselinas pode ser grandemente aumentada pela adição de agentes molhantes ou emulsivos de várias espécies (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

A lanolina anidra não é muito usada como tensoativo por causar reações alérgicas e por necessitar de antioxidantes. É usada como emoliente em baixas concentrações em alguns cremes (JATO, 1997). Os derivados de lanolina são emulsionantes primários não iônicos complexos, ricos em esteróis etoxilados, uma mistura de álcoois graxos com ésteres do colesterol e outros esteróis com ácidos graxos. Estas lanolinas modificadas possuem alto teor em colesterol (geralmente superior a 15%), menor viscosidade e maior poder de penetração que a lanolina anidra. Quando usada em combinação com vaselinas (hidrofóbicas) incrementam sua capacidade de fixação de água. A literatura relata o uso de lanolina em torno de 14%, com um aumento na capacidade de absorção de 50% (JATO, 1997). A lanolina é mencionada na formulação (F).

Os silicones fixam-se à superfície de vários materiais tornando-os hidrofóbicos. Esta propriedade é comum também aos óleos minerais, mas mais intensa no caso dos silicones. Eles possuem boa aderência à pele, fraca tensão superficial, servindo como agentes antiespumantes. Não são tóxicos quando aplicados em produtos de uso tópico, não rancificam e possuem propriedades hidrorepelentes. A formulação (G) possui o simeticone, um derivado do silicone, e ainda oleato de decila como emoliente o qual é um bom dissolvente de fármacos solúveis ou miscíveis com óleos. É uma mistura de ésteres do ácido oléico com álcoois superiores naturais não saturados, e um bom excipiente do ponto de vista de penetração cutânea (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

5.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DA FORMULAÇÃO DE REFERÊNCIA (E) E DAS DEMAIS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS DO COMÉRCIO

5.4.1 Teor em Cetoconazol

A formulação de referência foi preparada para análise por CLAE segundo o item 4.3.1 da metodologia. A análise foi feita em triplicata e em três dias diferentes, e o resultado obtido ($100,03\% \pm 0,92$) para o teor, representa a média e o desvio padrão de três determinações. O desvio padrão relativo foi calculado em 0,92%. Estes resultados estão em concordância com os obtidos no trabalho de Velikinac et al. (2004), que para a mesma análise, obteve a porcentagem de recuperação 99,32% e desvio padrão relativo 1,20%. Da mesma maneira, as formulações genéricas obtidas do comércio, foram preparadas e analisadas.

5.4.2 Características Organolépticas e Físico-químicas da Formulação de Referência (E) e das Especialidades Farmacêuticas do Comércio

Na Tabela 10, encontram-se relacionados as características observadas para a formulação (E).

Tabela 10 Determinação das características organolépticas e físico-químicas da formulação de referência (E)

Características organolépticas
Cor: branca Aspecto: homogêneo, opaco, boa consistência Odor: característico
Características físico-químicas
pH 7,04 / 20°C Viscosidade 4.258 cP (BROOKFIELD DVII+, Spindle S70; 67,7s ⁻¹ ; 3282dyn/cm ² ; 20°C).

A viscosidade, que define a consistência das emulsões, e que pode ser um ponto crítico em relação a aceitação e continuidade do uso do medicamento por parte do paciente, se mostrou adequada. A formulação apresentou boa espalhabilidade, e formação de fino filme sobre a pele, características estas desejadas para um creme dermatológico. A formulação tem aspecto opaco sem muito brilho. Estas características são importantes se observadas do ponto de vista do consumidor que relaciona emulsões opacas e sem brilho à idéia de má qualidade, elaboração ou composição inadequada. Igualmente importante é a aparência, pois bolhas de ar também conferem um aspecto negativo às emulsões. Do ponto de vista tecnológico, a aparência pode estar relacionada com a fase interna, com o tamanho das partículas que por sua vez tem relação principalmente com o tipo e com a quantidade do emulsionante utilizado, com a diferença de densidade entre as fases, e com as condições aplicadas durante o processo: agitação, temperatura e técnica de emulsificação (RIEGER, 2000).

Entre os parâmetros físico-químicos examinados o pH 7,04 (20°C) mostrou-se dentro da faixa fisiológica (5-8), e provavelmente é o de melhor estabilidade para o fármaco na formulação empregada (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002, RIEGER, 2000, SKIBA et al., 2000).

A todas as formulações em estudo foram aplicados os mesmos critérios de análise dos empregados para a formulação (E), e os resultados obtidos são relatados posteriormente.

5.4.3 Estudo do Comportamento reológico da Formulação de Referência (E) e das Especialidades Farmacêuticas do Comércio

A Tabela 11 mostra os resultados do comportamento reológico obtido para a formulação (E).

Da Tabela 11 foram plotados em um gráfico a tensão de cisalhamento (*shear stress*) nas ordenadas, e a taxa de cisalhamento nas abcissas (*shear rate*), obtendo-se os reogramas característicos, sendo que para a formulação de referência, evidenciaram comportamento pseudoplástico típico de produtos semi-sólidos e também, a presença de tixotropia (LABA, 1993).

Tabela 11 Estudo do comportamento reológico da formulação (E)

FORMULAÇÃO(E)				
Velocidade (rpm)	Torque (%)	viscosidade (cP)	Tensão de cisalhamento (dyn/cm ²)	Taxa de cisalhamento (s ⁻¹)
40	28,1	7358	1790	27,1
50	30,6	6589	2298	33,8
60	33,4	5989	2645	40,6
70	35,6	5135	2878	47,4
80	37,8	4678	3089	54,2
100	41,5	4258	3282	67,7
80	37,9	4478	2676	54,2
70	35,8	4610	2345	47,4
60	34,3	4989	2130	40,6
50	31,2	5676	1989	33,8
40	28,2	6134	1760	27,1

Nota: as determinações foram feitas a 20°C, no viscosímetro de Brookfield® DVII +. Spindle S70

A Figura 12 (curva de fluxo) e a Figura 13 (curva de viscosidade) ilustram o comportamento pseudoplástico com tixotropia obtido para a formulação (E).

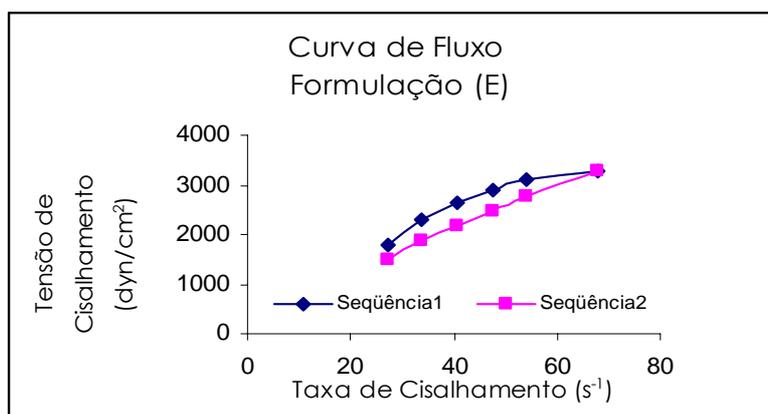


Figura 12 Curva de fluxo da formulação de referência (E)

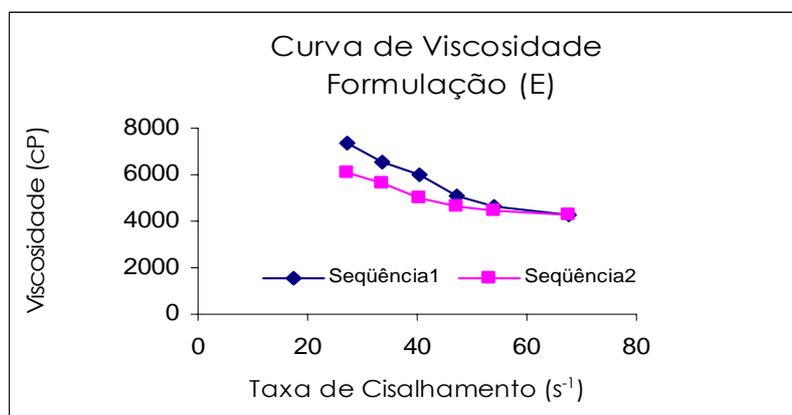


Figura 13 Curva da viscosidade da formulação de referência (E)

Ainda na Tabela 11, nota-se o valor da viscosidade (η) 4258 cP a qual está relacionada à maior taxa de cisalhamento aplicada ($67,7s^{-1}$), e tensão de cisalhamento ($3282dyn/cm^2$), na temperatura de $20^{\circ}C$. Este valor de viscosidade, chamada viscosidade estacionária por alguns autores (por ser a menor viscosidade possível para que a formulação não perca sua estrutura

inicial, e assim sua estabilidade) foi utilizado como comparativo entre as demais formulações analisadas (BRUMMER; GODERSKY, 1999).

O mesmo programa e as mesmas condições empregadas para a formulação de referência foram também empregados para as demais formulações do comércio.

Os reogramas das formulações genéricas (H); (J); (K); (F); (G); (I), apresentaram comportamento pseudoplástico e com exceção da (H) e da (K) todas as demais aparentaram tixotropia.

A Tabela 12 relaciona os resultados obtidos para as formulações do comércio, conforme relatados nos itens 5.4.1, 5.4.2 e 5.4.3 deste capítulo.

Tabela 12 Parâmetros de qualidade das formulações genéricas

Formulações	Características organolépticas			Características Físico-químicas		
	Cor	Aspecto	Odor	pH	Viscosidade	Teor (%)
H	Branca,brilhosa	Homogêneo	Característico	6,54	4268cP	100,60±0,70
J	Branca,brilhosa	Homogêneo	Característico	6,75	4265cP	101,28±1,24
K	Branca,brilhosa	Homogêneo Perolado	Característico	6,89	10510cP	100,03±0,27
F	Branca,brilhosa	Homogêneo Perolado	Característico	6,98	2079cP	99,43±0,711
G	Branca,brilhosa	Homogêneo	Característico	6,86	3998cP	99,37±0,56
I	Branca,opaca	Homogêneo	Característico	6,37	3114cP	97,03±0,25

Todas mostraram aspecto homogêneo, sendo (F) e (K) peroladas, e com exceção da (I), todas as formulações apresentaram brilho intenso. As formulações apresentaram cor branca e odor característico, com pH dentro da faixa ideal. A consistência dos cremes variou consideravelmente, sendo a

maior viscosidade demonstrada pela formulação (K) e a menor viscosidade, pela formulação (F).

O valor elevado da viscosidade da formulação (K) 10.510 cP conferiu sensorial semelhante à pomada embora com melhor espalhabilidade que este tipo de forma farmacêutica.

A viscosidade atingida na máxima taxa de cisalhamento foi menor para a formulação (F) 2079cP e maior para a formulação (K) 10.510cP. A formulação (I) também teve o valor da viscosidade mais baixo em relação as demais. Ainda para a formulação (I), o teor obtido foi abaixo das demais formulações. Em menor ou maior grau, o estudo reológico das formulações genéricas, embora demonstrando o comportamento pseudoplástico típico de produtos semi-sólidos, mostrou diferenças nos valores das viscosidades estacionárias sendo apresentados na ordem crescente:

$$(F) < (I) < (G) < (J) < (H) < (K)$$

Embora as formulações (E) e (K) tenham em comum, mesma forma farmacêutica, excipientes de mesma função, mesmo teor do fármaco, conforme preconiza a legislação vigente para os produtos genéricos, suas viscosidades estacionárias são bastante diferentes, provavelmente devido a proporção diferenciada dos excipientes. A alteração nos valores deste parâmetro físico justificam a análise do comportamento das mesmas formulações, em relação a liberação do fármaco da forma farmacêutica e em relação a absorção cutânea.

5.5 SELEÇÃO DAS EMULSÕES NÃO IÔNICAS SIMULADAS NO LABORATÓRIO

Pelas características de homogeneidade, organolépticas e físicas (viscosidade), pH, e melhor estabilidade (dentro dos critérios adotados, não visando a determinação do prazo de validade e sim apenas a melhor composição), selecionou-se a formulação base denominada (F9), e a partir desta, conforme descrito no item 4.4 da metodologia, elaborou-se as formulações (A1), onde o fármaco, a 2%, foi solubilizado à quente em propilenoglicol e incorporado a fase aquosa da emulsão, e (B), onde o fármaco, a 2%, foi apenas disperso no propilenoglicol e adicionado a emulsão já pronta. A Tabela 13 relaciona os componentes e quantidades utilizadas em (F9), - fase oleosa (1), e fase aquosa (2) - elaborada pelo sistema EHL, menciona as funções de cada componente e mostra a fase (3), onde o fármaco foi adicionado.

Tabela 13 Composição da formulação base não_iônica pelo sistema EHL

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO	FUNÇÃO
FASE OLEOSA (1)		
Álcool cetílico	6,0%	Espessante
Álcool estearílico	6,0%	Espessante
Álcool cetosteárilico etoxilado 20OE	3,0%	Emulsionante
Monoestearato de sorbitano	1,0%	Emulsionante
Miristato de isopropila	10,0%	Emoliente
Polissorbato 80	1,0%	Emulsionante
FASE AQUOSA (2)		
Propilenoglicol	2,5%	Umectante
Metabissulfito de sódio	0,2%	Antioxidante
EDTA sódico	0,2%	Sequestrante
Água purificada	q.s.100,0%	Veículo
FASE FÁRMACO (3)		
Cetoconazol	2,0%	Fármaco
Propilenoglicol	2,5%	Solubilizante

Conforme descrito no item 4.4.1.1 da metodologia, as formulações (A2), (A3) e (A4), da mesma forma que (A1), ou seja, contendo o fármaco solubilizado, foram elaboradas com diferentes emolientes a fim de avaliar em ensaio de permeação cutânea, a interferência destes como promotores de absorção. Com o mesmo emoliente da formulação de referência (miristato de isopropila) e objetivando possíveis interferências do sistema de elaboração das formulações na permeação cutânea, foram elaboradas preparações contendo cera auto emulsionante.

A Tabela 14 ilustra as respectivas funções de cada componente de (F12). As formulações tendo o fármaco solubilizado e disperso no interior do veículo neste estudo foram denominadas (C) e (D), respectivamente.

Tabela 14 Composição da formulação base não-iônica contendo cera auto emulsionante

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO	FUNÇÃO
FASE OLEOSA (1)		
Álcool cetosteárilico e álcool cetosteárilico etoxilado, estearato de sorbitano e monooleato de sorbitano etoxilado (20OE)	14,0%	Emulsionante
Miristato de isopropila	10,0%	Emoliente
Propilparabeno	0,1%	Conservante
FASE AQUOSA (2)		
Propilenoglicol	2,5%	Umectante
Metabissulfito de sódio	0,2%	Antioxidante
EDTA sódico	0,2%	Sequestrante
Metilparabeno	0,2%	Conservante
Água purificada	q.s.100,0%	Veículo
FASE FÁRMACO (3)		
Cetoconazol	2,0%	Princípio ativo
Propilenoglicol	2,5%	Solubilizante

Todas as formulações descritas no item 4.4.2 da metodologia apresentaram boa espalhabilidade, emoliência, homogeneidade, brilho e adequadas características físicas, nas condições analisadas. A escolha por

(F12) foi pelo parâmetro físico, viscosidade, a qual se mostrou mais similar à formulação de referência (E).

5.5.1 Avaliação dos Parâmetros de Qualidade das Formulações Não-iônicas Simuladas no Laboratório

A Tabela 15 relaciona os resultados encontrados quanto aos parâmetros de qualidade para as formulações não-iônicas desenvolvidas no laboratório.

Tabela 15 Parâmetros de qualidade das formulações não iônicas simuladas no laboratório

Formulações	Características organolépticas			Características físicas		Teor (%)
	Cor	Aspecto	Odor	pH	Viscosidade	
	A1	Branca,brilhante	Homogêneo	Característico	6,82	
A2	Branca,brilhante	Homogêneo	Característico	6,55	4132cP	100,40 ± 0,58
A3	Branca,brilhante	Homogêneo	Característico	6,31	3125cP	101,64 ± 1,26
A4	Branca,brilhante	Homogêneo	Característico	6,34	4375cP	101,24 ± 0,54
B	Branca,brilhante	Homogêneo	Característico	6,74	4453cP	96,13 ± 0,55
C	Branca, opaca	Homogêneo	Característico	7,12	4213cP	101,03 ± 1,25
D	Branca, opaca	Homogêneo	Característico	7,06	4396cP	97,67 ± 0,59

A solubilização do fármaco nas formulações obtidas pelo sistema EHL e com cera autoemulsionante, (A1), (A2), (A3), (A4), (C), parece não interferir na viscosidade.

Nas formulações (B) e (D), o teor encontrado foram os mais baixos, sugerindo que a melhor maneira de incorporar o fármaco seja durante o preparo da emulsão.

O emoliente, vaselina líquida, interferiu na viscosidade da formulação (A3), mais baixa que as demais formulações simuladas no laboratório, seguida da formulação com oleato de decila (A2), miristato de isopropila

(A1) e triglicerídios dos ácidos cáprico e caprílico (A4). As modificações observadas, no entanto, não alteraram a consistência das emulsões.

A composição em emulsionantes elevou o pH para (C) e (D), e também alterou as características organolépticas, sendo estas mais opacas que as demais formulações.

O conhecimento a respeito dos excipientes utilizados e as possíveis interações destes com a pele, a necessidade da verificação da qualidade da emulsão produzida sob várias condições de estresse, são condições importantes para a obtenção de uma forma farmacêutica segura e eficaz além de estável, e os estudos reológicos podem trazer grandes contribuições pois revelam alterações importantes nos parâmetros de qualidade que podem conduzir à investigação dos fatores de instabilidade (TADROS, 2004).

O comportamento reológico de todas as formulações simuladas no laboratório foi do tipo pseudoplástico sendo o esperado para produtos semi-sólidos, e com tixotropia evidente apenas para (A1), (A2), (A3) e (A4).

5.5.2 Comparativo dos Teores de Cetoconazol Obtidos por CLAE Para Todas as Formulações

Utilizando-se a metodologia já descrita no item 4.3.1, realizou-se a quantificação do cetoconazol nas especialidades farmacêuticas do comércio e nas simuladas no laboratório. Os dados estão relatados na Tabela 16.

Houve exatidão do método verificado pela aproximação dos resultados obtidos para o teor em cetoconazol nas formulações com o valor tido como verdadeiro.

Os valores de desvio padrão relativo ou coeficiente de variação abaixo de 2% demonstram uma boa precisão do método.

Tabela 16 Teor em cetoconazol nas formulações

Formulação	Teor esperado* (mg/g)	Teor encontrado (mg/g)	Teor (%)	CV ou DPR (%)
A1	20	19,87	99,36 ± 0,92	0,92
A2	20	20,08	100,40 ± 0,58	0,57
A3	20	20,30	101,64 ± 1,26	1,24
A4	20	20,45	101,24 ± 0,54	0,53
B	20	19,25	96,13 ± 0,55	0,57
C	20	20,21	101,03 ± 1,25	1,24
D	20	19,60	97,67 ± 0,57	0,58
E	20	20,01	100,03 ± 0,92	0,92
F	20	19,89	99,43 ± 0,71	0,71
G	20	19,87	99,31 ± 0,56	0,56
H	20	20,09	100,60 ± 0,70	0,70
I	20	19,41	97,03 ± 0,25	0,26
J	20	20,26	101,28 ± 1,24	1,22
K	20	20,13	100,03 ± 0,28	0,28

Nota: os resultados para o teor representam a média de três determinações por CLAE

5.6 ESTUDO *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA

Para a seleção da solução receptora, foram analisados vários agentes solubilizantes para o cetoconazol como polissorbato 80, polietilenoglicol oleil-éter, e tampões a vários valores de pH. Pela garantia de melhor integridade das colunas nas análises por CLAE, e melhor estabilidade do fármaco, optou-se pela mistura etanólica (etanol: solução tampão fosfato pH 7,4 –90:10).

5.6.1 Elaboração da Curva Analítica do Cetoconazol em Solução Receptora

A Figura 14 evidencia o cromatograma da solução padrão do cetoconazol em solução receptora com concentração 10µg/mL mostrando tempo de retenção entre 4 e 6 minutos, típico do cetoconazol.

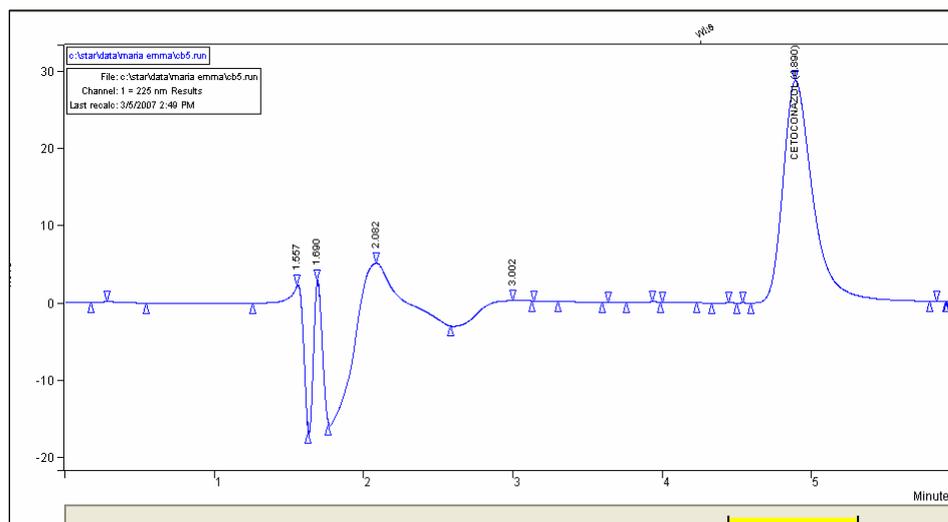


Figura 14 Cromatograma do cetoconazol padrão em solução receptora

A Figura 15 demonstra a série de diluições analisadas em solução receptora realizada segundo o item 4.5.2 da metodologia.

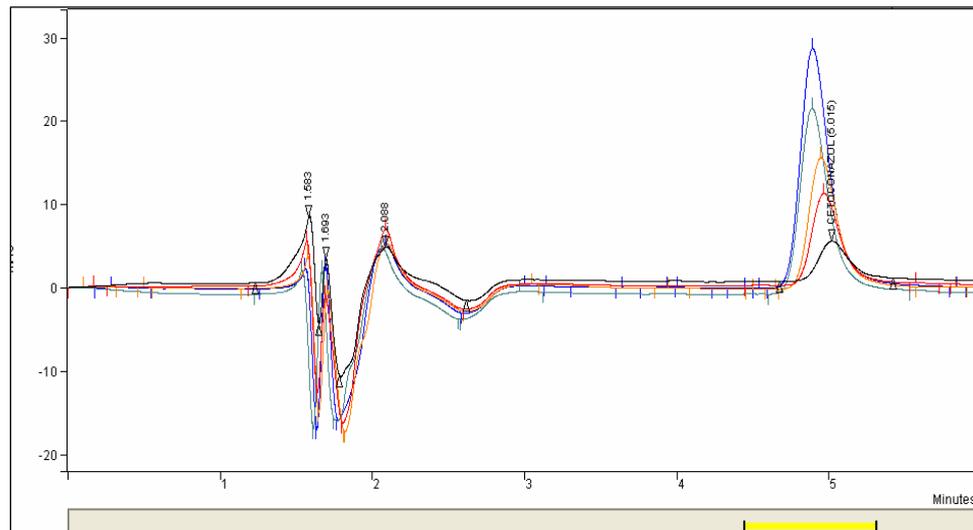


Figura 15 Cromatogramas das concentrações utilizadas na curva analítica do cetozonazol em solução receptora

A Figura 16 representa o trabalho matemático aplicado a esta curva. A curva construída mostrou boa linearidade com coeficiente de determinação $r^2 = 0,995316$ e coeficiente de correlação $r = 0,997655$, com equação de regressão linear $+3,96 \cdot 10^5x - 8,68 \cdot 10^4$.

A solução receptora selecionada foi capaz de solubilizar o fármaco na concentração utilizada, e, portanto adequada para a utilização no ensaio *in vitro* de permeação cutânea do cetozonazol, e a curva analítica construída tornou possível a quantificação do fármaco em diversas concentrações nas amostras de solução receptora, quando coletadas durante a realização do estudo.

5.6.2 Membrana Permeante

As peles de orelhas de porco foram selecionadas para esta pesquisa, por serem de fácil aquisição e manipulação, histológica e bioquimicamente similares à pele humana, e com características de permeabilidade cutâneas bem próximas a estas (ANDEGA; KANIKKANNAN; SINGH, 2001). Foram preparadas segundo item 4.5.3 da metodologia

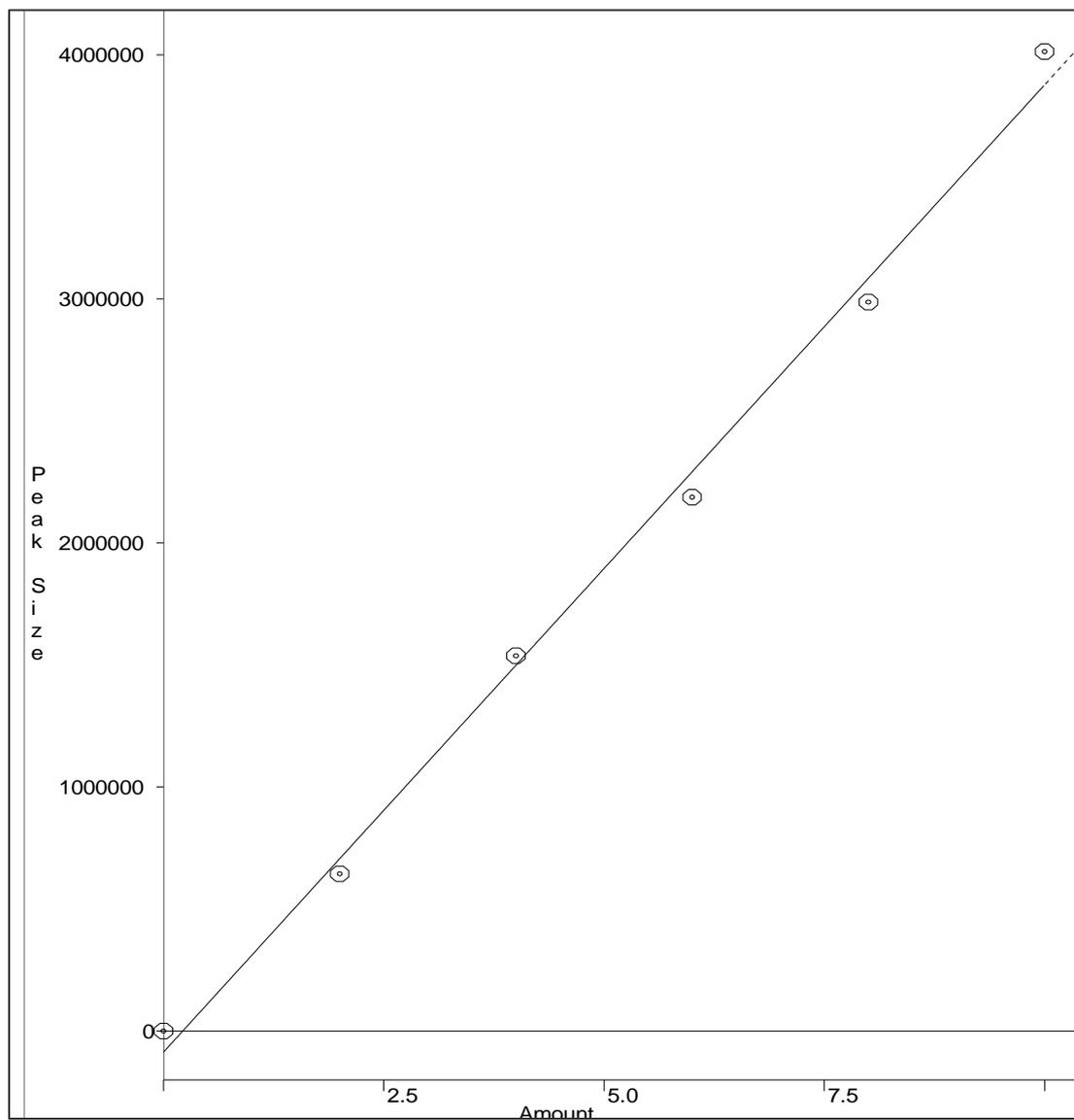


Figura 16 Curva analítica do cetoconazol em solução receptora

5.7 ESTUDO *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

As análises foram conduzidas inicialmente para a formulação de referência e em seguida para todas as outras formulações.

5.7.1 Análise da solução receptora

Ao total, as 14 especialidades farmacêuticas (1 formulação referência, 6 formulações genéricas do comércio e 7 formulações simuladas no laboratório) foram analisadas em duas tomadas de amostra diferentes. As análises, quanto à permeação cutânea, foram feitas nos tempos 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660, 720, 1440 min, conforme o item 4.7.3 da metodologia.

Para os ensaios *in vitro* de permeação cutânea utilizaram-se doses infinitas das formulações de tal forma que a concentração do fármaco no compartimento doador permanecesse em contínuo excesso (OECD, 2004).

Nas análises feitas para a formulação referência, segundo o item 4.5.4 da metodologia, no tempo de retenção entre 4 e 5 min, nada foi observado nas amostras coletadas durante as 24h, conforme demonstra a Figura 17.

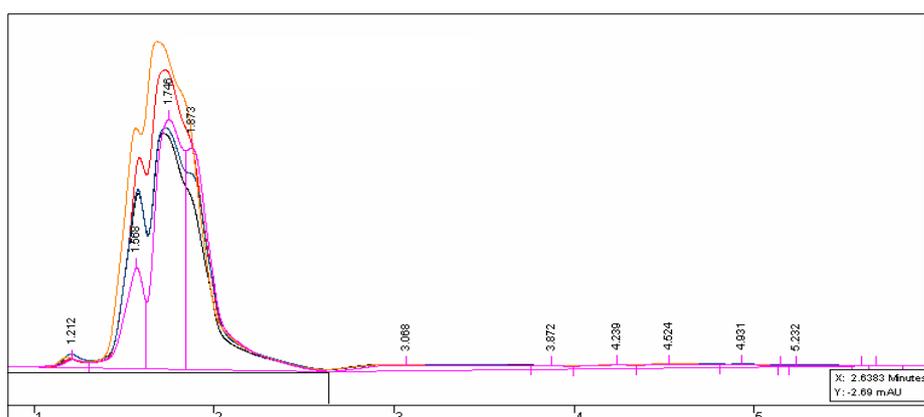


Figura 17 Estudo *in vitro* de permeação cutânea da formulação (E) nas 24h

A Figura 18 ilustra o estudo de permeação cutânea da formulação simulada no laboratório, contendo o fármaco incorporado

durante a preparação da emulsão e contendo o emoliente miristato de isopropila, neste estudo denominada: (A1). Nada se observou no tempo de retenção característico do cetoconazol, demonstrando, portanto não haver permeação cutânea no período de 24h analisado.

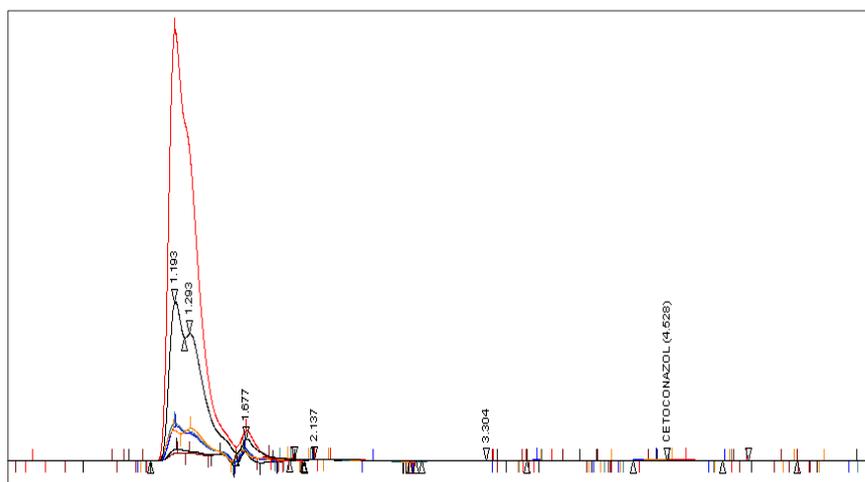


Figura 18 Estudo *in vitro* de permeação cutânea da formulação (A1) nas 24h

Os resultados encontrados para a permeação cutânea do cetoconazol no tempo analisado, são coerentes com a literatura científica, onde é mencionado que a formulação tópica contendo 2% do fármaco, praticamente não é absorvida (KOROLKOVAS, 1995), não tem absorção significativa (FUCHS; WANNMACHER, 1998) através da pele e mucosas, portanto uma ação tópica.

O estudo de permeação cutânea *in vitro* foi realizado com todas as formulações, e todas as soluções permeantes analisadas não mostraram a presença do cetoconazol, no período analisado de 24h.

Segundo a OECD (2004), quando se usam doses infinitas, um período de exposição acima de 24h é mais apropriado quando se deseja atingir o estado de equilíbrio dinâmico e desta maneira conhecer o respectivo coeficiente de permeabilidade do produto analisado. Ao presente trabalho interessa estimar os valores para a retenção cutânea dentro das 24h, e estes foram calculados, pela quantificação do fármaco na área da membrana que foi exposta à permeação, e também pelo doseamento da formulação

restante após cada intervalo de tempo (1, 3, 6, 12 e 24 h, conforme item 4.5.5 da metodologia. A soma do valor permeado com o valor retido deve ser igual a quantidade do fármaco adicionado inicialmente.

5.7.2 Análise da Membrana Permeante

Cada uma das tomadas de amostra de cada uma das formulações, quanto à retenção cutânea, foi verificada nos tempos de 1, 3, 6, 12 e 24 h, na epiderme total mais a derme. As soluções das lavagens das peles após a permeação foram analisadas por CLAE conforme descrito na metodologia nos itens 4.5.4 e 4.5.5, e nestas não se verificou a presença do cetoconazol.

As Tabelas 17a e 17b demonstram os valores obtidos para as formulações (A1), (A2), (A3) (A4), (B) (C) e (D) e formulação de referência (E) e percebe-se, embora não de maneira significativa, haver aumento (%) na retenção cutânea com a tomada de amostra menor (0,2g), em todas as análises.

Tabela 17a Resultados do estudo de retenção cutânea do cetoconazol nas formulações simuladas no laboratório

Tempo (h)		FORMULAÇÕES							
		A1		A2		A3		A4	
		R ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	R (%)						
Amostra 1	1	8.851 \pm 0,04	22,13	9.489 \pm 013	23,72	10.206 \pm 0,03	25,52	8.985 \pm 0,04	22,46
	3	9.993 \pm 0,12	24,98	12.308 \pm 010	30,77	16.277 \pm 0,02	40,69	10.111 \pm ,07	25,28
	6	17.025 \pm 0,21	42,56	20.404 \pm 0,13	51,01	22.979 \pm 0,03	57,45	14.198 \pm 0,12	35,50
	12	21.183 \pm 0,22	52,96	23.365 \pm 0,13	58,41	25168 \pm 0,03	62,92	18.632 \pm 0,06	46,58
	24	22.183 \pm 0,09	55,46	25.105 \pm 0,32	62,76	26.751 \pm 0,03	66,88	20.656 \pm 0,03	51,64
Amostra 2	1	968 \pm 0,04	24,22	1.118 \pm 0,06	27,96	1.260 \pm 0,03	31,50	1.055 \pm 0,02	26,38
	3	1.149 \pm 0,04	28,74	1.378 \pm 0,05	34,45	1.858 \pm 0,04	46,46	1.197 \pm 0,03	29,93
	6	1.858 \pm 0,02	46,46	2.094 \pm 0,03	52,37	2.331 \pm 0,04	58,28	1.575 \pm 0,02	39,38
	12	2.142 \pm 0,02	53,55	2.338 \pm 0,10	58,47	2.606 \pm 0,03	65,17	1.929 \pm 0,03	48,23
	24	2.252 \pm 0,02	56,31	2.543 \pm 0,10	63,59	2.787 \pm 0,04	69,69	2.157 \pm 0,03	53,94

Tabela 17b Resultados do estudo de retenção cutânea do cetoconazol na formulação de referência (E) e nas formulações simuladas no laboratório

	Tempo (hs)	FORMULAÇÕES							
		B		C		D		E	
		R ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	R (%)						
Amostra 1	1	2.945 \pm 0,08	7,36	4.803 \pm 0,08	12,01	3.134 \pm 0,06	7,84	7.678 \pm 0,14	19,20
	3	5.646 \pm 0,23	14,12	11.552 \pm 0,04	28,88	7.009 \pm 0,05	17,52	11.175 \pm 0,11	27,94
	6	11.859 \pm 0,18	29,65	18.041 \pm 0,05	45,10	11.891 \pm 0,07	29,73	17.427 \pm 0,04	43,57
	12	16.277 \pm 0,47	40,69	21.286 \pm 0,06	53,22	18.561 \pm 0,10	46,40	21.215 \pm 0,11	53,04
	24	18.270 \pm 0,71	45,68	23.428 \pm 0,08	58,57	20.136 \pm 0,04	50,34	22.609 \pm 0,04	56,52
Amostra 2	1	457 \pm 0,02	11,42	929 \pm 0,06	23,23	457 \pm 0,04	11,42	961 \pm 0,03	24,02
	3	788 \pm 0,02	19,69	1.339 \pm 0,03	33,47	890 \pm 0,04	22,25	1.252 \pm 0,06	31,30
	6	1.362 \pm 0,03	34,06	1.874 \pm 0,04	46,86	1.473 \pm 0,02	36,82	1.859 \pm 0,03	46,46
	12	1.670 \pm 0,02	41,74	2.307 \pm 0,01	57,68	1.945 \pm 0,02	48,63	2.213 \pm 0,04	55,32
	24	1.874 \pm 0,04	46,86	2.473 \pm 0,02	61,82	2.024 \pm 0,08	50,60	2.378 \pm 0,02	59,46

Nota: R = quantidade retida na pele, média de três determinações
Em destaque, os resultados obtidos para a formulação de referência (E)

A utilização de controles contendo a mesma matriz a ser analisada em todas as formulações elaboradas no laboratório, permitiu de maneira simplificada verificar a existência de seletividade do método proposto, parâmetro que foi também observado pela não interferência dos excipientes em nenhuma das formulações testadas.

Como controles utilizaram-se formulações sem o fármaco exceto no caso das formulações genéricas, onde se usou como controle um fragmento de pele. Em todos estes controles, procedeu-se o estudo *in vitro* nas mesmas condições que nas formulações estudadas.

A Figura 19 ilustra os cromatogramas referentes ao estudo de retenção cutânea para a formulação (A1) e a Figura 20, para a formulação referência (E), respectivamente nas duas tomadas de amostra (2,0g, tomada de amostra 1; e 0,2g, tomada de amostra 2).

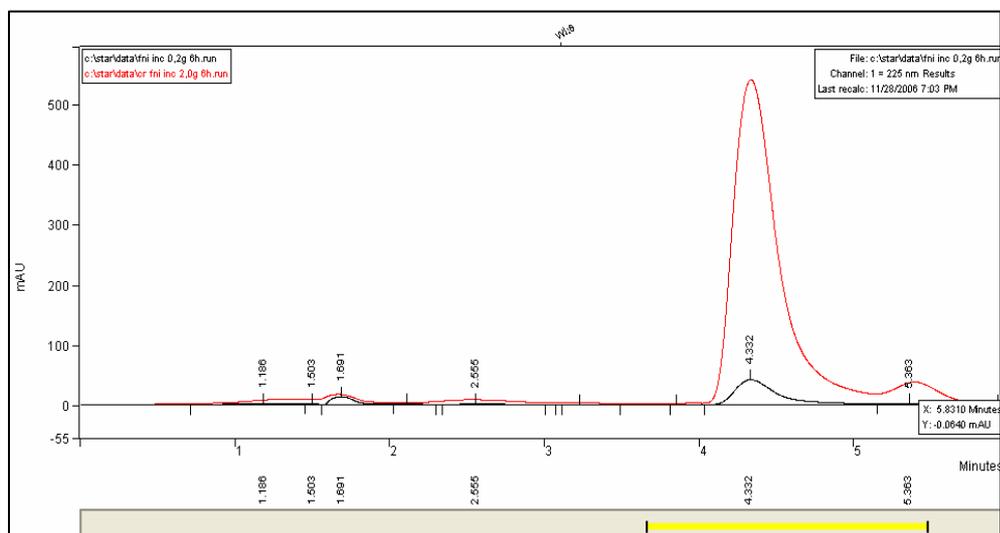


Figura 19 Estudo *in vitro* de retenção cutânea do cetoconazol na formulação (A1) nas 24h

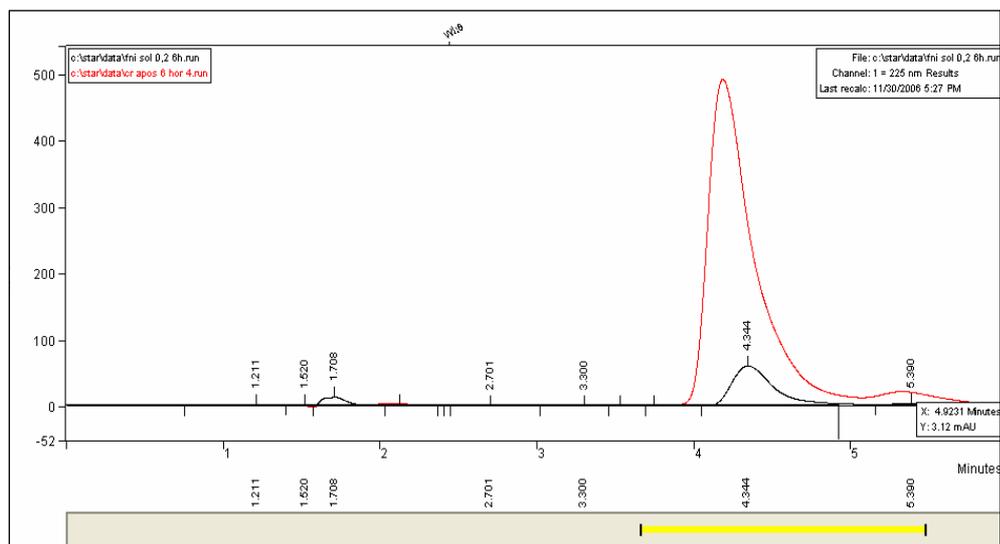


Figura 20 Estudo *in vitro* de retenção cutânea do cetoconazol da formulação (E) nas 24h

Nota: tomada de amostra 1 no tempo de 6 h
tomada de amostra 2 no tempo de 6 h



A Figura 21 mostra os cromatogramas obtidos nos estudos de retenção cutânea do cetoconazol nas formulações simuladas no laboratório e referência.

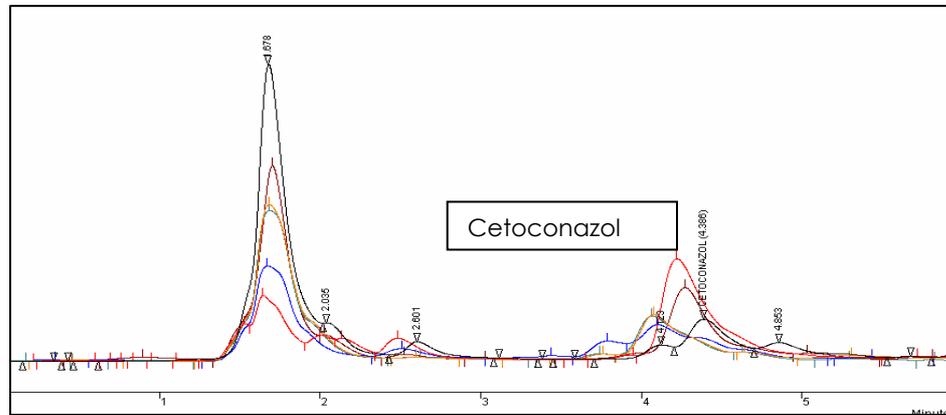


Figura 21 Cromatogramas característicos da retenção cutânea do cetoconazol nas formulações não-iônicas simuladas no laboratório

Nota: → (A3), → (A2), → (C), → (E), → (A1), → (A4), → (D), → (B), no tempo 24 h

A formulação com o fármaco apenas incorporado a formulação já pronta (B), e elaborada segundo o sistema EHL, mostrou mais baixa retenção que (E) e mais baixa que as formulações (A1), (A2), (A3) e (A4).

A formulação referência (E) e a formulação (A1) tiveram resultados bem próximos na retenção cutânea total, 56,52% e 55,46% respectivamente nas 24 h, em relação a amostra 1, e 59,46% e 56,31% em relação a amostra 2, respectivamente. Estes resultados eram esperados, uma vez que se procurou seguir a formulação referência como modelo de composição qualitativa, modo de elaboração e incorporação do fármaco.

As formulações (E), (A1) e (B), possuem a mesma composição qualitativa, o mesmo emoliente e o mesmo teor do fármaco. Entre as formulações (A1) e (B) a diferença está presente no modo de incorporação do fármaco. Assim os resultados de retenção cutânea obtidos sugerem que o fármaco adicionado durante a preparação da emulsão, como em (A1) tenha possibilitado um aumento da retenção cutânea. Este fato fica também evidenciado pelos resultados observados para as formulações (C) e

(D), que foram elaboradas não pelo sistema EHL, mas sim, com ceras auto emulsionantes, então não o modo de elaboração, mas a maneira de incorporação do fármaco parece ser neste caso o fator principal responsável pelo aumento da retenção cutânea verificado para a formulação (C).

Emulsionantes não-iônicos como álcool cetosteárilico etoxilado, álcool cetílico, álcool estearílico, álcool cetosteárilico, podem ser utilizados isoladamente como emulsificantes primários e secundários fazendo parte da fase oleosa da formulação, aumentando a viscosidade e contribuindo para a estabilidade do sistema (JATO, 1997). Podem também fazer parte da constituição de ceras auto emulsionantes como é o caso da cera utilizada na preparação das formulações (C) e (D), o Polawax® NF, (que contém álcool cetosteárilico com ésteres de sorbitano polioxietilênicos).

A base auto emulsionante Polawax®NF, forma rede de cristais líquidos, pela formação de uma série de bicamadas lamelares de moléculas de emulsificante, e desta maneira evita a coalescência das gotículas melhorando a estabilidade do produto. Este comportamento provavelmente aconteça devido a uma diminuição da atração de Van der Waals entre duas gotículas de óleo, além disto, os cristais líquidos conferem poder hidratante às formulações por mimetizar as bicamadas celulares das membranas celulares. Pode ser estabelecido que com o crescimento da cadeia polioxietilênica, a capacidade de retenção de água interlamelar de uma emulsão O/A também aumenta (CRODA; 2006).

A água interlamelar está em equilíbrio dinâmico com a água do sistema, ou seja, quando a água do sistema evapora a água ligada interlamelamente se transforma em água do sistema, isto prolonga a hidrofília das formulações, com conseqüências benéficas para o consumidor (AULTON, 2005).

Houve variação na retenção cutânea total (24 horas) em relação ao tipo de emoliente, e os valores crescentes observados foram (A4) < (A1) < (A2) < (A3), percebendo-se então que para a mesma composição de excipientes, a melhor retenção cutânea foi obtida quando o emoliente

usado foi a vaselina líquida, seguido do oleato de decila, miristato de isopropila, e triglicerídios dos ácidos cáprico e caprílico.

A mistura de triglicerídios de cadeia média, principalmente ácidos cáprico e caprílico foi usada na elaboração da formulação (A4). Com importantes propriedades de espalhabilidade, lubrificação, diluente de ativos e emoliência, são uma alternativa aos óleos minerais e vegetais, com vantagem destes últimos, por possuírem semelhança a composição lipídica da pele humana (SANCTIS, 2000), reforçando a importância do emprego deste nas formulações tópicas. Este agente promotor mostrou poder de penetração cutânea semelhante ao do miristato de isopropila, do oleato de decila e da vaselina líquida, sendo este fato verificado pelos resultados obtidos na retenção cutânea das formulações (A1), (A2) e (A3) respectivamente, comparativamente a (A4).

Todos estes componentes podem agir como modificadores da penetração cutânea, os quais aumentam a habilidade da pele para absorver fármacos por alterarem o domínio lipídico do estrato córneo e os elementos protéicos do tecido, ou por aumentar a partição do fármaco através do estrato córneo.

Compostos constituídos de álcoois graxos, úteis como cosolventes, têm se mostrado efetivo como facilitadores da penetração cutânea (ANDEGA; KANIKKANNAN; SINGH, 2001).

A literatura preconiza que em muitos casos a velocidade de liberação de um fármaco é muito mais rápida a partir de emulsões formadas em seu EHL ótimo (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007, JATO, 1997).

Observa-se este fato pelos resultados obtidos para as formulações elaboradas ou presumivelmente elaboradas pelo sistema EHL, na primeira hora do estudo de retenção cutânea, em ambas as tomadas de amostra (2,0g e 0,2g).

As Tabelas 18a e 18b mostram os resultados obtidos nos estudos de retenção cutânea das formulações genéricas.

Tabela 18a Resultados do estudo de retenção cutânea do cetoconazol nas especialidades farmacêuticas genéricas do comércio

Tempo (hs)		FORMULAÇÕES					
		F		G		H	
		R ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	R (%)	R ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	R (%)	R ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	R (%)
Amostra 1	1	6.599 \pm 0,03	16,50	5.544 \pm 0,08	13,86	7.151 \pm 0,05	17,88
	3	12624 \pm 0,06	31,56	11.860 \pm 0,06	29,65	9.277 \pm 0,08	23,19
	6	20.759 \pm 0,09	51,90	18.774 \pm 0,08	46,94	16.593 \pm 0,13	41,48
	12	26.862 \pm 0,36	67,15	19.152 \pm 0,09	47,88	19.806 \pm 0,03	49,51
	24	31.004 \pm 0,15	77,51	25.641 \pm 0,10	64,10	22.223 \pm 0,06	55,56
Amostra 2	1	899 \pm 0,05	22,25	780 \pm 0,08	19,49	921 \pm 0,04	23,03
	3	1.528 \pm 0,04	38,19	1.386 \pm 0,04	34,65	1.221 \pm 0,03	30,52
	6	2.244 \pm 0,03	56,11	1.914 \pm 0,03	47,84	1.764 \pm 0,07	44,10
	12	2.961 \pm 0,03	74,03	2.063 \pm 0,04	51,58	2.158 \pm 0,05	53,94
	24	3.371 \pm 0,05	84,26	2.646 \pm 0,03	66,15	2.252 \pm 0,08	56,31

Tabela 18b Resultados do estudo de retenção cutânea do cetoconazol nas especialidades farmacêuticas genéricas do comércio

Tempo (hs)		FORMULAÇÕES					
		I		J		K	
		R ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	R (%)	R ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	R (%)	R ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	R (%)
Amostra 1	1	6.402 \pm 0,18	16,01	7.343 \pm 0,18	18,37	4.292 \pm 0,04	10,73
	3	11.765 \pm 0,26	29,41	10.214 \pm 0,21	25,53	6.465 \pm 0,17	16,16
	6	18.869 \pm 0,35	47,17	17.175 \pm 0,17	42,94	11.773 \pm 0,05	29,43
	12	25.036 \pm 0,40	64,34	20.144 \pm 0,22	50,36	13.868 \pm 0,04	34,67
	24	27.192 \pm 0,08	67,98	22.389 \pm 0,43	55,97	16.120 \pm 0,08	40,30
Amostra 2	1	1.323 \pm 0,03	33,08	977 \pm 0,06	24,41	551 \pm 0,06	13,78
	3	1.733 \pm 0,15	43,31	1.205 \pm 0,04	30,12	890 \pm 0,31	22,25
	6	2.418 \pm 0,05	60,44	1.874 \pm 0,05	46,86	1.315 \pm 0,08	32,88
	12	2.788 \pm 0,02	69,69	2.071 \pm 0,05	51,78	1.465 \pm 0,04	36,62
	24	2.851 \pm 0,02	71,27	2.268 \pm 0,08	56,70	1.677 \pm 0,02	41,93

Nota:*R = quantidade retida na pele

A Figura 22 ilustra os cromatogramas obtidos no estudo de retenção cutânea realizado com as especialidades farmacêuticas genéricas do comércio, nas 24h.

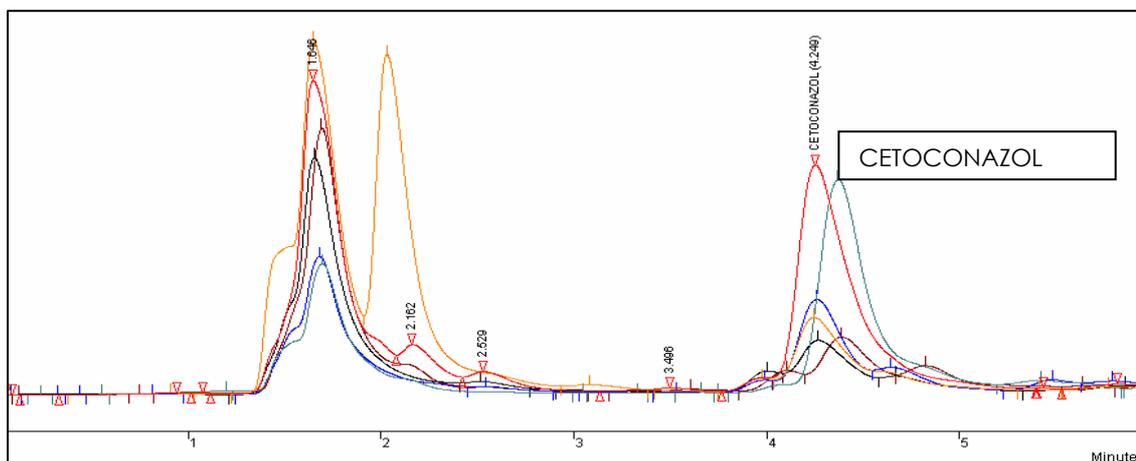


Figura 22 Cromatogramas característicos da retenção cutânea das especialidades farmacêuticas do comércio

Nota: No tempo 24 horas, → (F), → (I) → (G), → (J), → (H), → (K)

Pela observação das características organolépticas e físicas da formulação (K) e fazendo-se a relação com os dados da retenção cutânea, pode-se sugerir que a viscosidade muito maior que a da formulação referência, possa ter contribuído para a diminuição da capacidade de retenção cutânea desta formulação.

A formulação (K), apesar de possuir a mesma composição qualitativa que (E), proporcionou nas mesmas condições de análise, valor de retenção cutânea total, abaixo desta. Isto poderia ser explicado pelo fato de que na prática o valor de EHL ótimo requerido para uma emulsão, calculado empiricamente, é dependente de diversos fatores como, o procedimento de preparação, a temperatura de elaboração e a forma de resfriamento. Também a adição de aditivos, principalmente de eletrólitos a uma emulsão, pode modificar o EHL ótimo.

A concentração total da mistura emulsificante é muito importante, se ela variar, o valor de EHL crítico também irá variar. Com concentrações muito baixas se torna inviável a obtenção de emulsões estáveis e, em concentrações muito altas não se obtém emulsões verdadeiras, mas outro tipo de estruturas mais complexas (JATO, 1997).

Em relação aos emolientes, o oleato de decila, presente na formulação (G) e também na formulação simulada no laboratório (A2), ambas as formulações com semelhante viscosidade, parece ter sido o agente promotor da retenção cutânea, uma vez que as duas formulações possuindo diferentes excipientes em suas composições, apresentaram valores semelhantes de retenção cutânea.

Entre as formulações genéricas, elaboradas no sistema EHL e com o emoliente miristato de isopropila, os valores percentuais de retenção cutânea obtidos para as formulações (K), (H) e (J) foram 40,30%, 55,56% e 55,94% respectivamente, nas 24 h e na tomada de amostra 1. Os valores de (H) e (J) são próximos e coerentes com (E) 56,52% para as mesmas 24 h na tomada de amostra 1. Isso era esperado devido as três formulações apresentarem semelhança na composição qualitativa dos excipientes e provavelmente deva existir proximidade também na composição quantitativa e modo de elaboração.

5.7.3 Análise das Formulações Após o Término do Estudo *In Vitro*

O excesso de emulsão (de cada formulação) que restou sobre a membrana após o tempo total de permeação, foi retirado com auxílio de espátula e analisado conforme descrito no item 4.5.4 e 4.5.5, por CLAE.

Os valores da Tabela 19 foram usados para aferir os dados obtidos na retenção cutânea, especialmente onde foram detectados uma quantidade muito pequena de cetoconazol.

Ao final do tempo estipulado (1, 3, 6, 12 e 24 h), para o estudo *in vitro*, os valores obtidos das permeações através da pele, somados aos da concentração do fármaco retido na pele e ainda a quantidade deste que

permaneceu na formulação e não foi liberado, permitiu estimar o total de recuperação do cetoconazol, que foi em torno de 100% para todas as formulações e nas duas tomadas de amostra. Segundo a OECD (2004), a recuperação deve ser $100 \pm 10\%$.

Tabela 19a Resultados do estudo das formulações após o término do estudo *in vitro* (%)

		FORMULAÇÕES							
		A1	A2	A3	A4	B	C	E	
Amostra 1	Tempo (hs)	NR(%)							
	1	77,18 ± 0,51	76,19 ± 0,12	74,45 ± 0,13	77,50 ± 0,10	92,02 ± 0,08	87,03 ± 0,28	80,71 ± 0,29	
	3	74,61 ± 0,58	68,78 ± 0,23	59,19 ± 0,11	74,39 ± 0,17	85,84 ± 0,23	71,04 ± 0,16	71,51 ± 1,62	
	6	57,18 ± 0,74	48,96 ± 0,03	42,50 ± 0,11	64,42 ± 0,24	70,25 ± 0,18	54,82 ± 0,02	56,41 ± 0,02	
	12	46,88 ± 0,07	41,37 ± 0,38	37,04 ± 0,06	53,24 ± 0,19	49,14 ± 0,47	45,99 ± 0,77	46,87 ± 0,02	
	24	43,80 ± 0,19	36,81 ± 0,03	33,07 ± 0,11	47,81 ± 0,30	54,06 ± 0,71	41,04 ± 0,03	43,36 ± 0,34	
	Amostra 2	1	75,69 ± 0,04	71,60 ± 0,08	67,65 ± 0,23	73,31 ± 0,22	88,52 ± 0,10	76,75 ± 0,24	24,02 ± 0,03
		3	70,92 ± 0,02	65,17 ± 0,09	52,71 ± 0,19	69,29 ± 0,11	80,13 ± 0,06	66,02 ± 0,04	68,65 ± 0,03
		6	52,96 ± 0,06	47,04 ± 0,06	41,46 ± 0,05	59,98 ± 0,14	65,60 ± 0,15	53,02 ± 0,06	53,17 ± 0,02
		12	45,85 ± 0,06	41,17 ± 0,24	34,10 ± 0,21	51,02 ± 0,13	58,04 ± 0,04	41,98 ± 0,03	44,23 ± 0,06
24		42,88 ± 0,06	35,19 ± 0,05	29,69 ± 0,01	45,46 ± 0,20	52,19 ± 0,15	37,75 ± 0,07	40,13 ± 0,04	

Tabela 19b Resultados do estudo das formulações após o término do estudo *in vitro* (%)

		FORMULAÇÕES							
		D	F	G	H	I	J	K	
Amostra 1	Tempo (hs)	NR(%)							
	1	91,8 ± 0,81	83,36 ± 0,60	85,88 ± 0,41	81,66 ± 0,88	83,82 ± 0,22	81,38 ± 0,68	89,05 ± 0,34	
	3	82,01 ± 0,50	68,17 ± 0,40	70,29 ± 0,50	76,44 ± 0,50	70,40 ± 0,28	74,31 ± 0,12	83,41 ± 0,38	
	6	70,15 ± 0,24	47,61 ± 0,67	52,69 ± 0,32	58,38 ± 0,51	52,63 ± 0,31	56,65 ± 1,14	70,41 ± 0,28	
	12	53,52 ± 0,48	32,66 ± 0,60	51,73 ± 0,34	50,20 ± 0,07	35,50 ± 0,25	49,36 ± 0,43	65,18 ± 0,26	
	24	49,24 ± 1,20	22,46 ± 0,09	36,81 ± 0,25	44,31 ± 0,21	31,90 ± 0,95	43,77 ± 0,33	59,33 ± 0,51	
	Amostra 2	1	87,23 ± 0,07	77,04 ± 0,32	80,42 ± 0,02	75,35 ± 0,23	66,67 ± 0,06	74,42 ± 0,25	85,85 ± 0,13
		3	77,35 ± 0,06	60,50 ± 0,27	64,92 ± 0,04	68,83 ± 0,04	56,56 ± 0,05	68,42 ± 0,28	77,42 ± 0,15
		6	62,81 ± 0,14	43,67 ± 0,02	51,98 ± 0,26	55,52 ± 0,08	39,33 ± 0,09	51,73 ± 0,23	66,83 ± 0,11
		12	50,71 ± 0,21	25,81 ± 0,05	48,40 ± 0,14	44,73 ± 0,17	30,17 ± 0,03	47,54 ± 0,35	63,17 ± 0,12
24		48,63 ± 0,11	15,52 ± 0,02	32,98 ± 0,31	43,42 ± 0,14	28,50 ± 0,02	40,81 ± 0,37	57,94 ± 0,02	

Nota: NR = quantidade do fármaco não retido na pele, e que restou na formulação sem ser liberado

As Figuras 23 e 24 demonstram as porcentagens de retenção e não retenção nas duas tomadas de amostra, durante o tempo proposto (24 h).

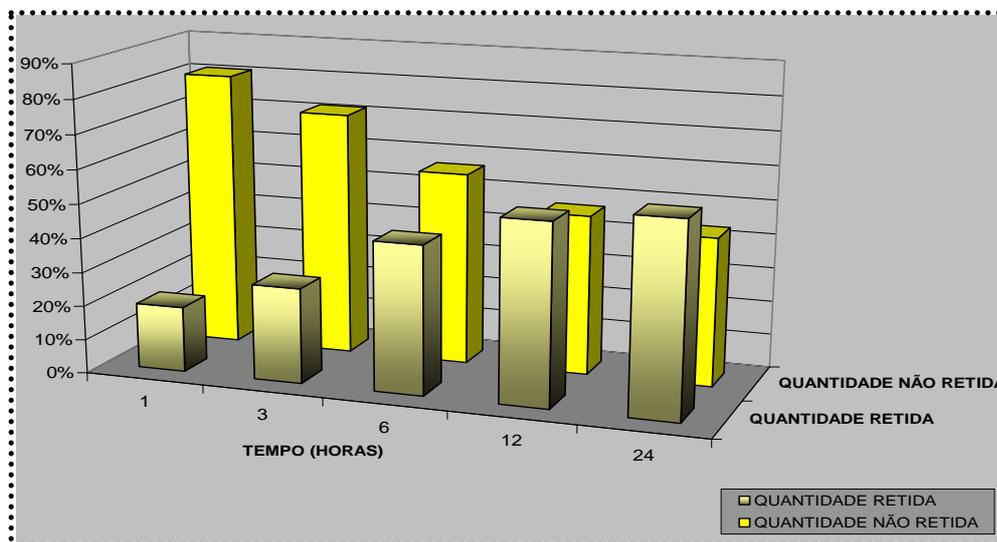


Figura 23 Comparativo entre a quantidade retida e não retida de cetoconazol (%) na formulação (E) amostra 1- 24h

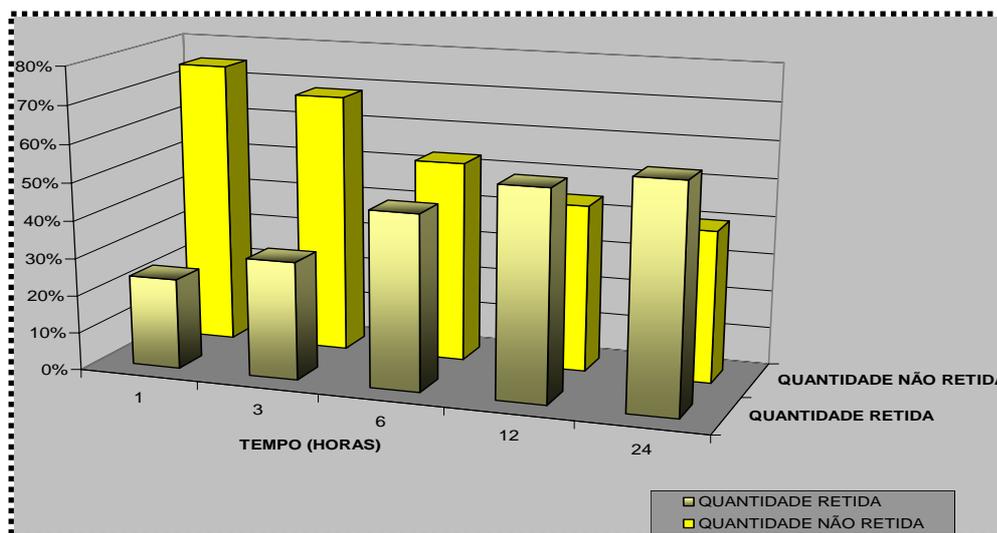


Figura 24 Comparativo entre a quantidade retida e não retida de cetoconazol (%) na formulação (E)- amostra 2 - 24h

As Figuras 25 e 26 comparam as retenções cutâneas de 24 h de estudo *in vitro*, das duas tomadas de amostra, nas formulações (E) e (A1) respectivamente.

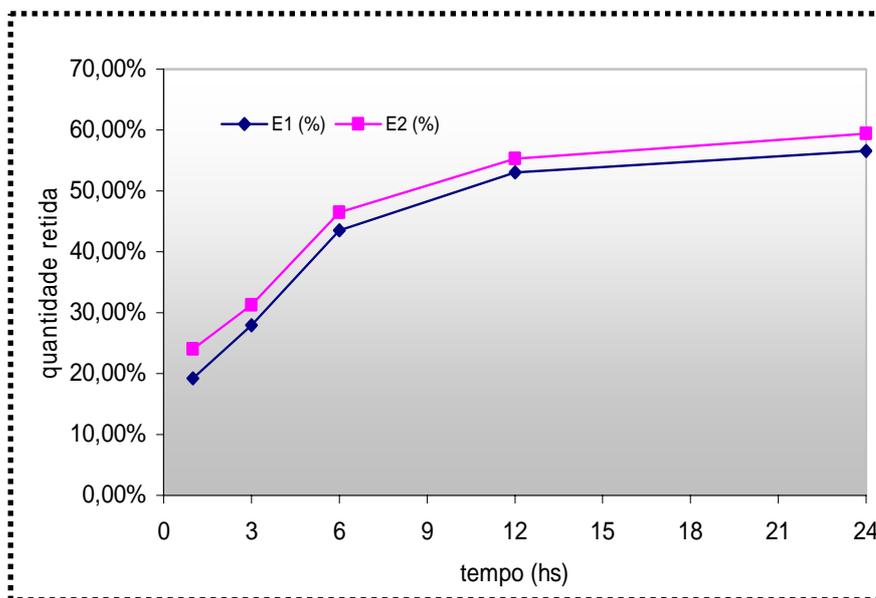


Figura 25 Perfil de retenção cutânea (%) nas tomadas de amostra 1 e 2 - formulação (E)

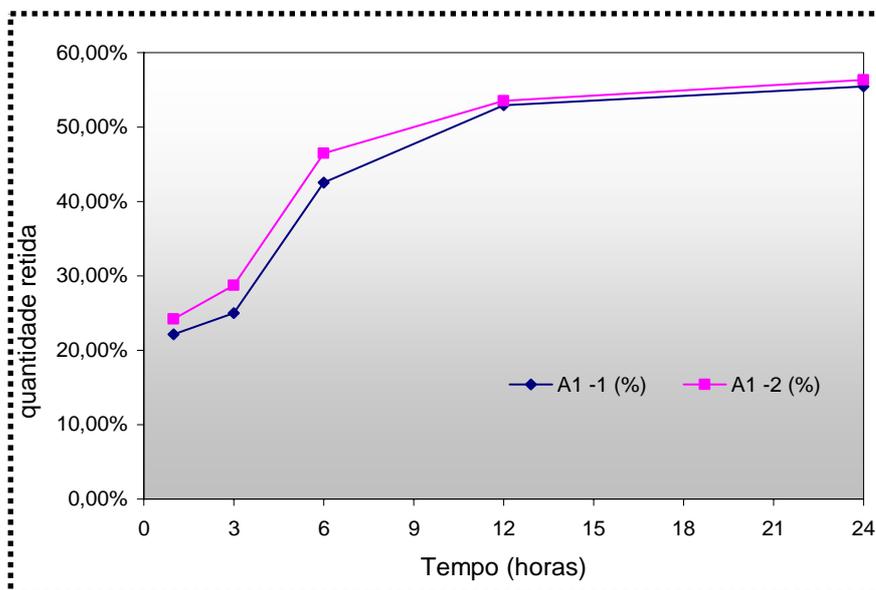


Figura 26 Perfil de retenção cutânea (%) nas tomadas de amostra 1 e 2-formulação (A1)

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DE RETENÇÃO CUTÂNEA

Os resultados após tratamento estatístico, são relatados a seguir.

5.8.1 Cálculo da Cinética de Retenção Cutânea

Em geral o estudo cinético começa com a medida da concentração do fármaco em intervalos determinados, sob um conjunto específico de parâmetros. Os dados coletados no estudo cinético podem servir para calcular a velocidade da reação e a constante da velocidade que é a velocidade com que o fármaco se degrada nas condições da experiência. Os dados podem ser ainda utilizados, para determinar a meia-vida experimental do fármaco, que é definida como o tempo no qual ocorre a degradação de 50% de sua concentração inicial. A meia-vida é expressa em $t_{1/2}$ ou t meio, e neste estudo foi calculada como o tempo médio que cada formulação, em cada tomada de amostra, levou para ter uma retenção cutânea de 50% no tempo de 24 h.

As Figuras 27 e 28, ilustram o método estatístico da regressão linear para o cálculo do $t_{1/2}$ para a formulação (E) nas tomadas de amostra 1 e 2.

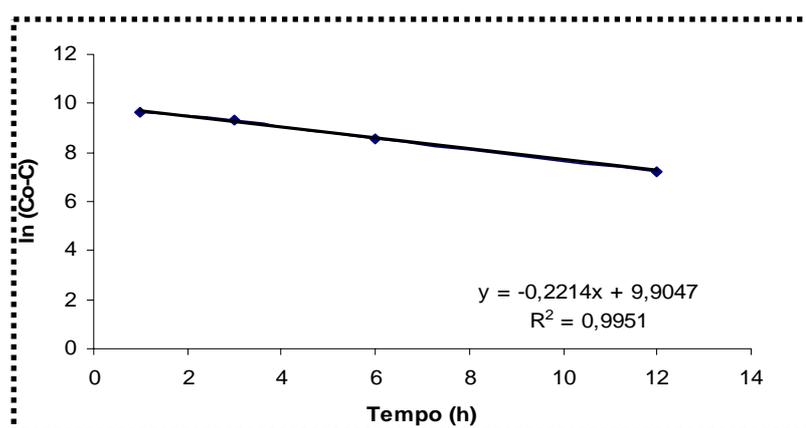


Figura 27 Cálculo da equação da reta para a obtenção do tempo de meia-vida da formulação (E) – tomada de amostra 1

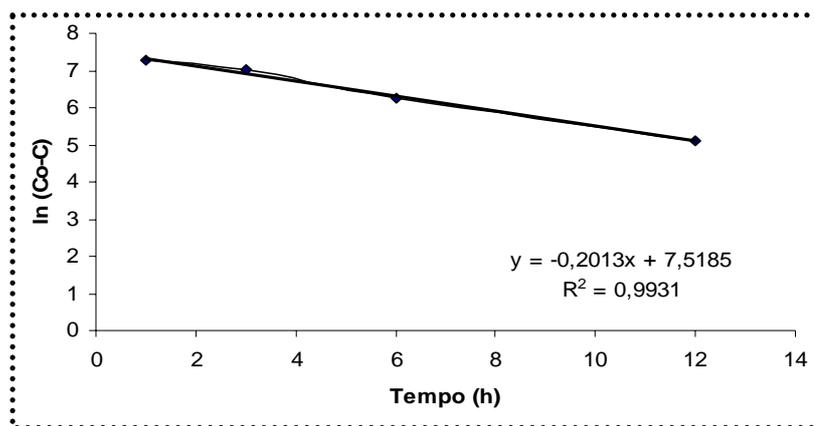


Figura 28 Cálculo da equação da reta para a obtenção do tempo de meia-vida da formulação (E) – tomada de amostra 2

Cálculos semelhantes aos praticados para a formulação (E) foram feitos para todas as demais formulações nas duas tomadas de amostra nas 24 horas totais. Desta maneira, obteve-se o t-meio de todas as formulações listados na Tabela 20, sendo designado $t_{1/2}$ (1) o tempo de meia-vida para a tomada de amostra 1, e $t_{1/2}$ (2) o tempo de meia-vida para a amostra 2 (EDGINTON; SHERMAN,1971).

Tabela 20 Valores dos $t_{1/2}$ (1) e $t_{1/2}$ (2) para todas as formulações

Formulações	$t_{1/2}$ (1)	h:min	$t_{1/2}$ (2)	h:min
E	3,130081	03:11:00	3,442623	03:26:00
A1	2,798869	02:48:00	2,957746	02:57:00
A2	3,32853	03:20:00	3,768352	03:46:00
A3	3,22026	03:13:00	3,61691	03:36:00
A4	4,182257	04:10:00	3,130081	03:08:00
B	3,618799	03:37:00	3,85	03:51:00
C	3,528513	03:31:00	3,362445	03:21:00
D	3,15	03:09:00	2,496398	02:30:00
F	4,248927	04:15:00	4,210207	04:12:00
G	6,888668	06:53:00	6,780822	06:46:00
H	3,982759	04:00:00	2,803398	02:48:00
I	2,814785	02:48:00	2,323944	02:20:00
J	3,867188	03:51:00	3,875839	03:52:00
K	4,439462	04:26:00	4,55023	04:33:00
MÉDIA	3,799936		3,654928	
MÉDIA $t_{1/2}$ (1) e $t_{1/2}$ (2)	3,799936	3,654928	3,727432	43,644
				03:44

Os cálculos do tempo de meia-vida foram obtidos a partir dos valores ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de retenção cutânea apresentados anteriormente, nas Tabelas 17 e 18 deste capítulo.

AS Figuras 29 e 30 demonstram os resultados obtidos para as duas tomadas de amostra de todas as formulações em relação ao t-meio.

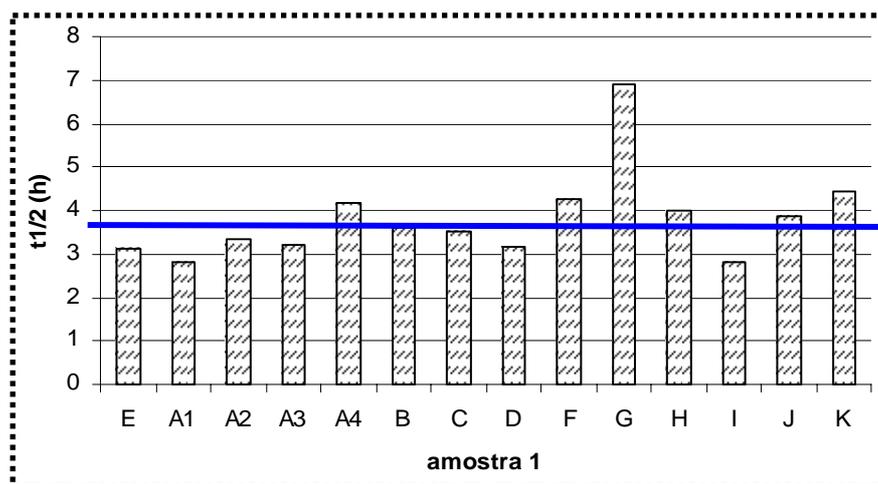


Figura 29 Valores de $t_{1/2}$ para todas as formulações na tomada de amostra 1 nas 24 h

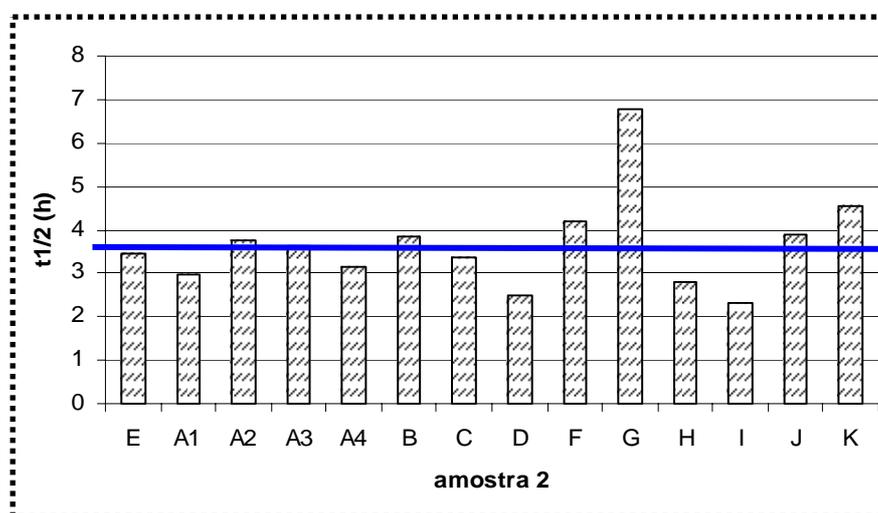


Figura 30 Valores dos $t_{1/2}$ para todas as formulações na tomada de amostra 2 nas 24 h

Nota: Os resultados representam a média de três determinações independentes, sendo a linha azul central o tempo de meia vida médio de retenção cutânea

Pelos valores exacerbados obtidos para a formulação (G), para o tempo de meia-vida, os quais diferiram muito dos valores encontrados para as demais formulações, optou-se por eliminá-los para os cálculos seguintes.

A Tabela 21 traz o cálculo dos tempos de meia-vida médios para cada uma das tomadas de amostra, após ter sido eliminado os valores de (G).

Tabela 21 Valores dos $t_{1/2}$ (1) e $t_{1/2}$ (2) para todas as formulações, exceto (G)

Formulações	$t_{1/2}$ (1)	h:min	$t_{1/2}$ (2)	h:min
E	3,130081	03:11:00	3,442623	03:26:00
A1	2,798869	02:48:00	2,957746	02:57:00
A2	3,32853	03:20:00	3,768352	03:46:00
A3	3,22026	03:13:00	3,61691	03:36:00
A4	4,182257	04:10:00	3,130081	03:08:00
B	3,618799	03:37:00	3,85	03:51:00
C	3,528513	03:31:00	3,362445	03:21:00
D	3,15	03:09:00	2,496398	02:30:00
F	4,248927	04:15:00	4,210207	04:12:00
H	3,982759	04:00:00	2,803398	02:48:00
I	2,814785	02:48:00	2,323944	02:20:00
J	3,867188	03:51:00	3,875839	03:52:00
K	4,439462	04:26:00	4,55023	04:33:00
MÉDIA	3,56		3,53	
MÉDIA $t_{1/2}$ (1) e $t_{1/2}$ (2)	3,56 e 3,53 = 3,55			03:33

Pelo valor médio obtido para o tempo de meia-vida de 3 h e 33 min, entende-se que as formulações levam em torno deste tempo para terem o fármaco retido em 50 %, na pele.

Embora haja diferenças como para a formulação (K), tempo de meia-vida em torno de 4h e 30min, e para a formulação (I) em torno de 2h e 40min, elas não são significativas, e apresentam correlação com os dados obtidos para a retenção cutânea.

A formulação (K), no tempo de meia-vida obtido, apresenta cerca de 20% da retenção cutânea total que foi de 40,3%, e a formulação (I), no tempo de meia-vida obtido apresenta em torno de 30% da retenção cutânea total que foi de 68%.

Esta correlação foi obtida para as demais formulações, demonstrando o tempo de meia-vida pode ser um dado importante no estudo da

interferência dos excipientes e das variáveis tecnológicas envolvidas no processo de elaboração das emulsões.

Os resultados apresentados anteriormente nas Figuras 29 e 30, ficam sem a formulação (G), caracterizados conforme as Figuras 31 e 32.

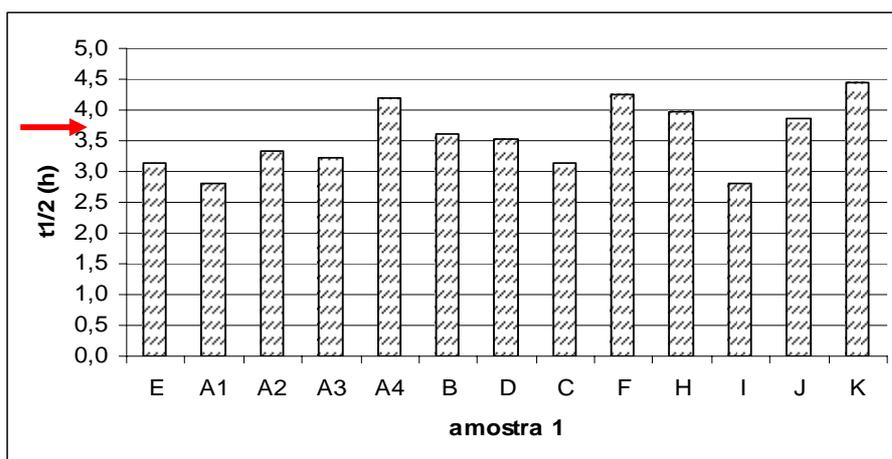


Figura 31 Valores dos $t_{1/2}$ para as formulações em estudo na tomada de amostra 1 nas 24 h

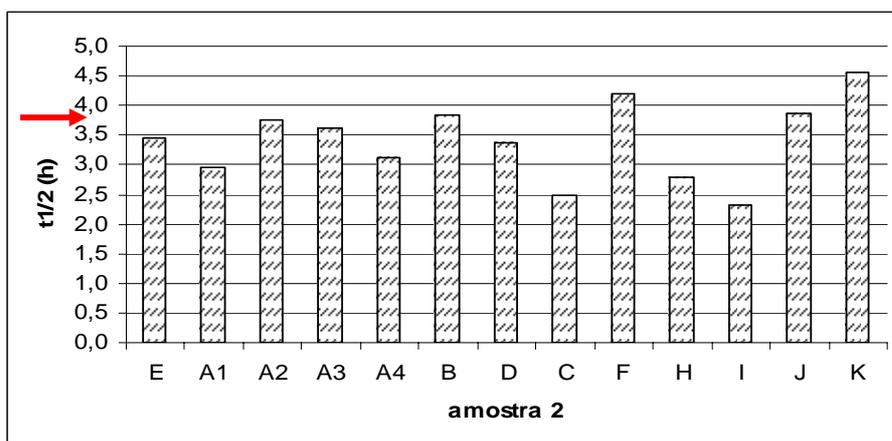


Figura 32 Valores dos $t_{1/2}$ para as formulações em estudo na tomada de amostra 2 nas 24 h

Nota: Os resultados representam a média de três determinações independentes, e a flecha vermelha indica o tempo de meia vida médio de retenção cutânea

Para as diversas formulações as duas tomadas de amostra não mostraram diferenças significativas em relação à cinética, ou seja, para as duas tomadas de amostra o tempo de meia-vida não diferiu significativamente, como demonstrado na Figura 33.

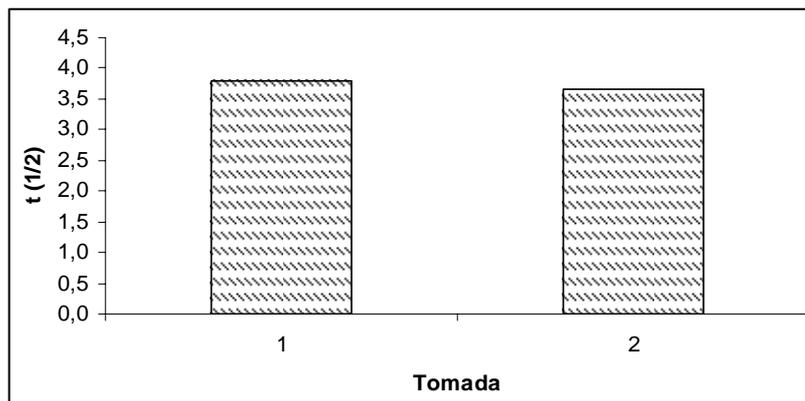


Figura 33 Interferência da tomada de amostra no tempo de meia-vida

Analisando-se a Figura 34, em relação aos diferentes emolientes utilizados nas formulações, percebe-se que o tempo de meia-vida sofre interferência da composição da formulação.

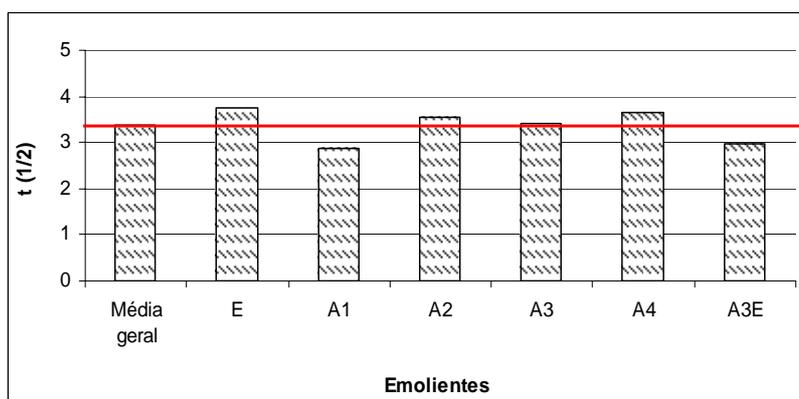


Figura 34 Interferência dos emolientes no tempo de meia-vida

A Figura 35 mostra as formulações simuladas no laboratório e as especialidades farmacêuticas do comércio em relação ao tipo de emolientes, comparativamente a formulação de referência (E) e ainda em relação as duas tomadas de amostra sendo A1, as formulações que contém miristato de isopropila, A2, as formulações que contém oleato de decila, A3, as formulações que contém vaselina líquida e A3E, as formulações que possuem a combinação miristato de isopropila e vaselina líquida.

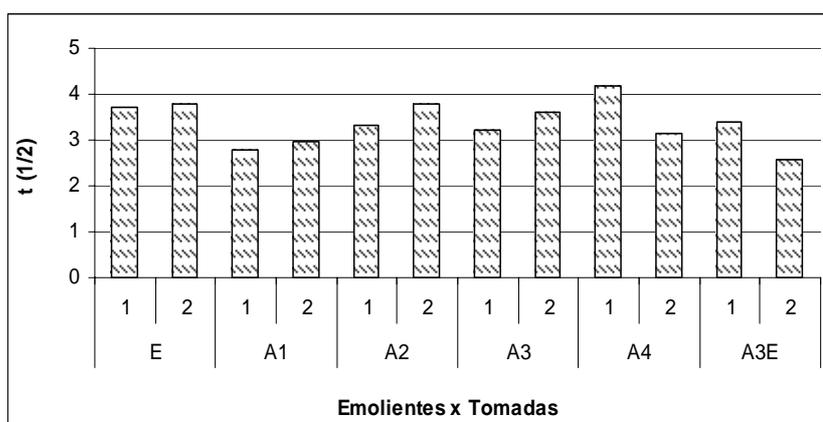


Figura 35 Interferência dos emolientes, tomada de amostra e tempo de meia-vida

A Figura 36 ilustra o comportamento das formulações quanto ao modo de elaboração da emulsão.

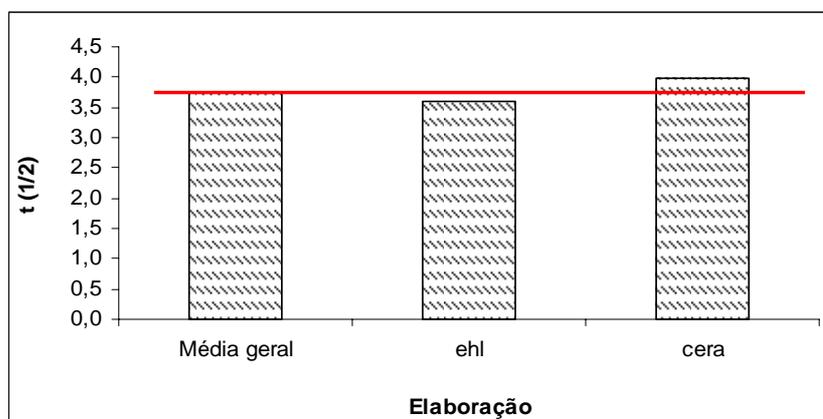


Figura 36 Interferência do modo de elaboração das emulsões no tempo de meia-vida

Nota: A linha vermelha central representa o tempo de meia vida médio.

A Figura 37 relaciona modo de elaboração e as tomadas de amostra ao tempo de meia-vida.

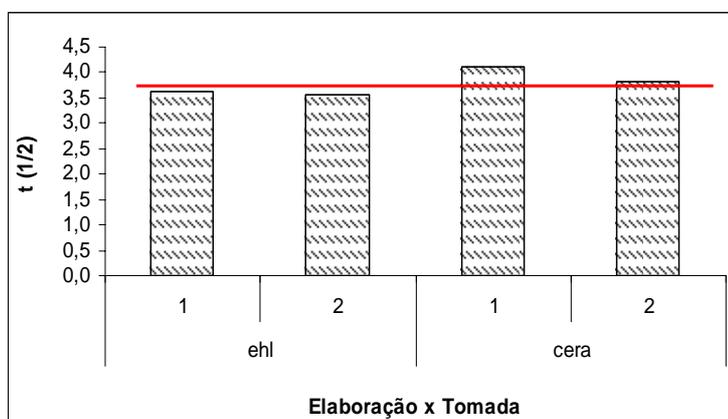


Figura 37 Interferência do modo de elaboração e tomada de amostra no tempo de meia-vida

Nota: A linha vermelha central representa o tempo de meia vida médio.

A Figura 38 mostra a relação do tempo de meia-vida com a incorporação do fármaco, para a formulação de referência e as demais formulações.

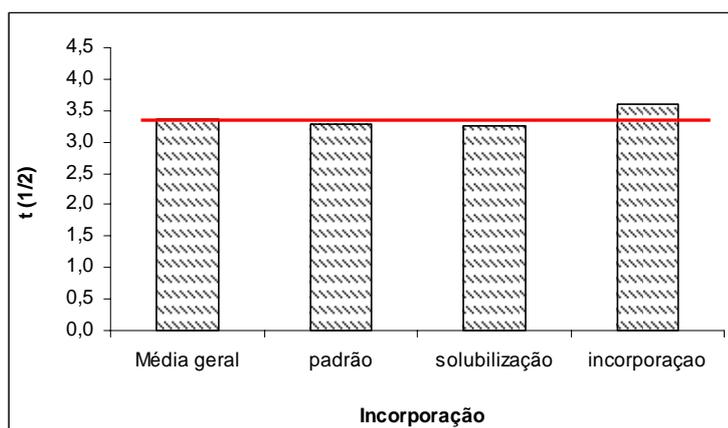


Figura 38 Interferência do modo de incorporação do fármaco no tempo de meia-vida

Nota: A linha vermelha central representa o tempo de meia vida médio.

A Figura 39 mostra a relação do tempo de meia-vida e a incorporação do fármaco, considerando o padrão nas duas tomadas de amostra.

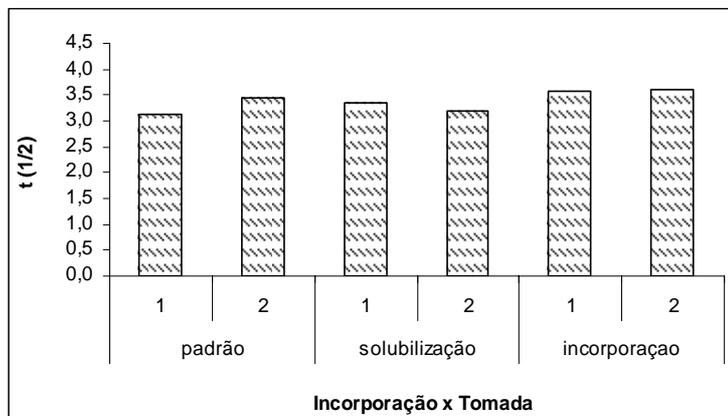


Figura 39 Interferência do modo de incorporação e tomada de amostra no tempo de meia-vida

Os componentes da formulação, a maneira de sua elaboração, a maneira de incorporação do fármaco o tipo de emoliente ou a combinação de emolientes empregados são fatores que em maior ou menor proporção parecem interferir no comportamento do fármaco quando administrado topicamente quanto ao tempo de meia-vida, e os emolientes parecem ter maior influência.

5.8.2 Análise da Quantidade Total de Fármaco Retido na Pele nas 24 horas

O valor da retenção total (VT) para cada formulação durante todo o período analisado, ou seja, nas 5 determinações para cada tomada de amostra, é apresentado na Tabela 22, calculando-se em seguida a média destas retenções.

Tabela 22 Média das retenções cutâneas nas tomadas de amostras 1 e 2

Formulações	Número de análises	Média($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
E	10	16020,90
A	10	15847,65
A2	10	18134,55
A3	10	20276,55
A4	10	14516,78
B	10	10999,80
C	10	15822,45
D	10	12146,40
F	10	19569,38
G	10	16194,15
H	10	15009,75
I	10	17992,80
J	10	15453,90
K	10	10503,68
média		15606,34

A Figura 40 ilustra estes dados, mostrando haver diferenças significativas entre as formulações quando se considera o valor médio total das retenções, nas 5 determinações feitas durante as 24 h para cada tomada de amostra, o que justifica uma análise das retenções médias nas formulações em separado.

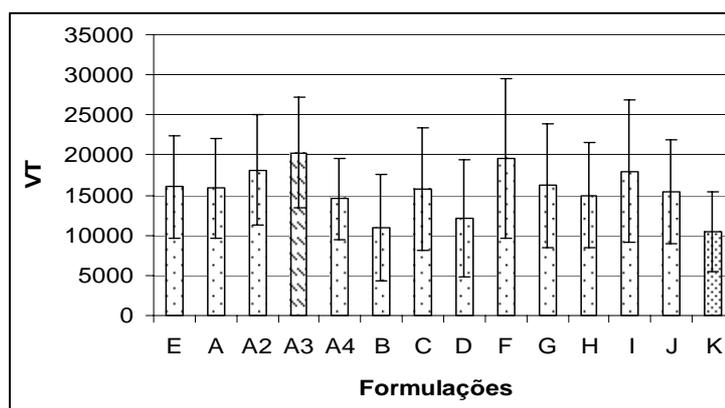


Figura 40 Valor Total (VT) da retenção cutânea média ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Nota 1: Média de 10 determinações.

Nota 2: A barra de erros representa o desvio padrão.

5.8.3 Cálculo do Percentual de Retenção Cutânea por Regressão Linear das Diferentes Formulações em Função da Referência (E)

A análise por regressão linear tem sido preconizada como instrumento de cálculo para utilização em controle de qualidade, e neste trabalho mostrou resultados significativos (EDGINTON; SHERMAN, 1971).

Todas as formulações tiveram seus cálculos realizados da mesma maneira que a apresentada para a formulação (A1), e comparados com a formulação de referência.

A Figura 41 ilustra o método da regressão linear utilizado para obtenção das estimativas estatísticas.

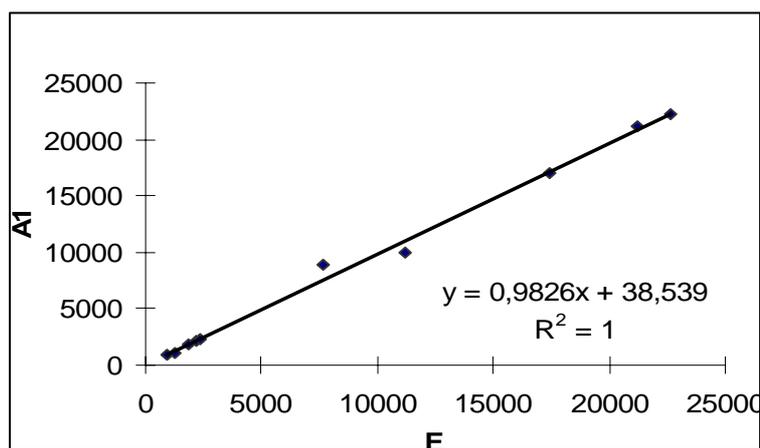


Figura 41 Análise por regressão linear da formulação (A1) em relação à formulação referência (E) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

A declividade (b) significa o valor de y, para o valor unitário de x. Em porcentagem, significa, a porcentagem de y quando x for 100%.

Portanto, podem-se avaliar quanto os valores das retenções das diversas formulações são maiores ou menores que a referência (E), pela análise do percentual da declividade. A Tabela 23 apresenta estes dados. Notem-se os valores de "R" obtidos, todos próximos da unidade, mostrando boa correlação entre os dados analisados (LANÇAS, 2004). Da tabela

também se salienta os valores de “b”, obtidos para as declividades das diversas formulações.

Tabela 23 Análise da retenção cutânea por regressão linear

Amostra	Codificação	Incorporação	Elaboração	Emolientes	R	b	eb	a	ea
A1	simulada	sol	EHL	E	0,998	0,98	0,02	38,54	275,56
A2	simulada	sol	EHL	A2	0,999	1,12	0,02	77,51	220,98
A3	simulada	sol	EHL	A3	0,995	1,22	0,04	429,50	531,24
A4	simulada	sol	EHL	A4	0,994	0,87	0,03	291,31	415,56
B	simulada	inc	EHL	E	0,981	0,77	0,05	-701,13	650,73
C	simulada	inc	cera	E	0,994	1,03	0,04	-334,32	489,06
D	simulada	sol	cera	E	0,979	0,85	0,06	-753,61	757,82
F	genéricas		cera	E	0,992	1,30	0,06	-644,81	692,41
G	genéricas		cera	A2	0,987	1,05	0,06	-308,45	715,04
H	genéricas		EHL	A3E	0,998	0,95	0,02	-131,90	254,32
I	genéricas		cera	A3E	0,994	1,17	0,05	-296,76	557,89
J	genéricas		EHL	E	0,999	0,97	0,01	-68,84	152,75
K	genéricas		EHL	E	0,996	0,68	0,02	-210,59	268,28

Notas: sol – fármaco solubilizado

Inc – fármaco incorporado após a formulação pronta

EHL – formulação elaborada no sistema EHL

E – emoliente miristato de isopropila

A2 – emoliente oleato de decila

A3 – emoliente vaselina líquida

A4 – emoliente triglicerídios dos ácidos cáprico e caprílico

A3E – combinação dos emolientes vaselina líquida e miristato de Isopropila

R – coeficiente de correlação

b – declividade da reta

eb – erro em relação a declividade (coeficiente angular da reta)

a – coeficiente linear da reta

ea – erro em relação ao coeficiente linear

Calculando os dados da declividade (b) em porcentagem, obtiveram-se os valores encontrados na Tabela 24, com os quais as formulações puderam ser organizadas em três grupos, onde valores próximos a 100%, (valor de declividade igual a unidade) com desvios para mais ou menos 5%, representam o grupo de formulações que se aproximam do comportamento da formulação de referência em relação a % de retenção cutânea. Valores superiores e inferiores em 10% do valor do grupo 100% demonstram que

nestes dois grupos de formulações, a retenção cutânea foi significativamente maior ou menor respectivamente, que a demonstrada pela formulação de referência.

Tabela 24 Porcentuais de retenção do cetoconazol na pele nas diversas formulações

Formulação	Tipo da formulação	Tipo de incorporação do fármaco	Modo de elaboração	Tipo de emolientes	Declividade (%)	Observado
F	genéricas	=	cera	E	130	>10%
A3	formulação	solubilizado	EHL	A3	122	>10%
I	genéricas	=	EHLa	A3E	117	>10%
A2	formulação	solubilizado	EHL	A2	112	>10%
G	genéricas	=	cera	A2	105	entre +5 e -5%
C	formulação	incorporado	cera	E	103	entre +5 e -5%
A1	formulação	solubilizado	EHL	E	98	entre +5 e -5%
J	genéricas	=	EHL	E	97	entre +5 e -5%
H	genéricas	=	EHL	A3E	95	entre +5 e -5%
A4	formulação	solubilizado	EHL	A4	87	<10%
D	formulação	solubilizado	cera	E	85	<10%
B	formulação	incorporado	EHL	E	77	<10%
K	genéricas	=	EHL	E	68	<10%
E	padrao	padrão	EHL	E		

Como se observa o grupo de formulações (G), (C), (A1), (J), (H) obteve comportamento semelhante ao padrão (formulação de referência), ou seja, a porcentagem de retenção cutânea observada no estudo *in vitro* por estas formulações, mostrou por análise de regressão linear ser em acordo com o medicamento de referência. Da mesma maneira, as formulações (F), (A3), (I) e (A2), apresentarem valores superiores, e as formulações (A4), (D), (B), e (K) valores inferiores a 10% em relação ao medicamento referência.

Os resultados expressivos acima justificam a realização deste trabalho, onde se observa que todas as variáveis buscadas como incorporação do fármaco, modo de elaboração, tipo de emulsificantes e emolientes, além de variáveis no processo de preparação da emulsão, são importantes, e que a mudança de um destes parâmetros pode ocasionar um comportamento diferente. A mudança do comportamento do medicamento é muitas vezes indesejado o que justifica a realização dos estudos *in vitro*.

6 CONCLUSÕES

As definições e atribuições da legislação vigente em relação aos medicamentos genéricos e, as bases técnico científicas da intercambiabilidade de medicamentos, levaram-nos ao desenvolvimento deste trabalho, e pelos resultados alcançados obtivemos a comprovação da hipótese formulada para esta pesquisa, pois o ensaio *in vitro* realizado confirmou que os procedimentos metodológicos adotados podem detectar desvios no comportamento da penetração percutânea entre modelos de referência disponíveis e medicamentos fabricados por vários laboratórios farmacêuticos, decorrentes das inúmeras variáveis tecnológicas adotadas.

A relevância deste estudo está centrada na ampliação de métodos para a gestão da qualidade dos medicamentos, introduzindo um processo *in vitro*, que pela eficiência e praticidade na utilização, implica em ampla aplicabilidade. Cabendo comentar, porém que esta consideração não elimina a necessidade de estudos mais aprofundados visando o aperfeiçoamento dos referenciais teórico-conceituais e metodológicos.

Os objetivos específicos, que uma vez alcançados tornaram possível alcançar a finalidade geral desta pesquisa, podem ser expressos nas considerações feitas a seguir:

Características organolépticas químicas, físicas e comportamento reológico, semelhantes ao medicamento referência puderam ser obtidos em formulações desenvolvidas no laboratório, pela combinação dos componentes da forma farmacêutica emulsionadas.

Os ensaios de permeação cutânea *in vitro* das formulações referência, genéricas e simuladas no laboratório, demonstraram haver uma relação direta entre a viscosidade, o teor do fármaco, e a retenção e que pela variação dos emolientes e emulsionantes, assim como outras variáveis do processo de fabricação, também são verificadas alterações na retenção cutânea.

Variações significativas na quantidade de fármaco retido pela pele foram observadas entre os medicamentos genéricos e o referência por análise de regressão linear, estabelecendo-se desvios, para mais ou menos 10% na retenção cutânea em relação ao medicamento de referência.

Cabendo notar que a formulação (A1) que objetivou simular o medicamento referência nos aspectos possíveis analisados, obteve comportamento similar a este no ensaio *in vitro* de permeação e retenção cutânea, ressaltando a importância desta metodologia na avaliação do comportamento dos medicamentos genéricos.

Os resultados obtidos nos permitem externar a preocupação para com os medicamentos genéricos na forma semi-sólida, especialmente pelo grande número destes freqüentemente lançados no mercado brasileiro, para os quais não há exigência legal em relação aos testes para a averiguação da eficácia.

A resolução vigente exige apenas a equivalência farmacêutica e o emprego de excipientes com a mesma função, mas pelos resultados obtidos percebe-se que alterações na composição, técnicas de preparo, teor e outras variáveis, resultam em diferenças na permeação cutânea *in vitro*.

Pelo exposto acima, realçamos a importância dos estudos *in vitro*, para a averiguação da qualidade dos medicamentos genéricos em relação ao medicamento referência, a fim de atender às expectativas da população usuária de tais medicamentos.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MOETY.; KHATTAB, E. M.; KELANI, K. M.; ABOUAL-ALAMEIN, A. M. Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. **Farmaco**. Pavia. v 57, n. 11, p. 931-938, 2002.

ABDULMAJED, K; HEARD, C. M. Topical delivery of retinol ascorbate co-drug 1. Synthesis, penetration into and permeation across human skin. **International Journal of Pharmaceutics**. Cardiff, v. 280, n. 1-2, may, p. 113-124, 2004.

ALENCASTRE, J. B.; BENTLEY, M.V.L.B.; GARCIA, F. S.; MORAGAS, M. de; VILADOT, J. L.; MARCHETTI, J. M. A study of the characteristics and in vitro permeation of CMC/Chitosam microparticles as a skin delivery system for vitamin E. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Spain, v. 42, n. 1, jan/mar, p. 60-76, 2006.

ANDEGA, S.; KANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Comparison of the fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. **Journal of Controlled Release**. USA, v.77, n. 1, p.17-25, 2001.

ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8° ed, São Paulo: Artmed, 775 p, 2007.

ALVAREZ-ÑUNEZ, F. A.; YALKOWSKY, S. H. Relationship between Poysorbate 80 solubilization descriptors and octanol-water partition coefficients of drugs. USA, v. 200, n. 2, p. 217-222, 2000.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6° ed., São Paulo: Editorial Premier, p. 398-400, 2000.

AULTON, M. E. **Pharmaceutics: The science of dosage form design**. 1° ed, New York: Churchill Livingstone, 724p, 1988.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2° ed., Porto Alegre: Artemd, 677p, 2005.

BARRY, B.W. **Dermatological Formulations: Percutaneous absorption**. England: Marcel Dekker, INC, p.1-233, 351-407, 1983.

BRASIL. **Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999**. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 de fev. de 1999. Disponível em: <http://www.cff.org.br/Legisla%C3%A7%C3%A3o/Leis/lei_9787_99.html>. Acesso em : 25 fev.2007.

BRASIL. **Resolução RDC nº 84, de 19 de março de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 20 de março de 2002. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=25960&word>>. Acesso em: 10 dez. 2006.

BRASIL. **Resolução RDC nº 135, de 29 de maio de 2003**. Revoga a Resolução RDC nº 84, de 19 de março de 2002, aprova Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=7909>>. Acesso em: 10 dez. 2006.

BRASIL. **Resolução RDC nº 16, de 02 de março de 2007**. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos, anexo I. Acompanha esse Regulamento o Anexo II, intitulado "Folha de rosto do processo de registro e pós-registro de medicamentos genéricos". Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 05 de março 2007. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=25960&word>>. Acesso em:10 mar. 2007.

BRONAUGH,R. L.; FRANZ, T. J. Vehicle effects on percutaneous absorption in vivo and in vitro comparisons with human skin. **Br. J. Dermatol.** v. 115, n. 1, p. 1-11, 1986.

BRUMMER, R.; GODERSKY, S. Rheological studies to objectify sensations occurring when cosmetic emulsions are applied to the skin. **Colloids and Surfactants: Physicochemical and Engineering Aspects**. Germany, v.1-2, n.152, p. 89-94, 1999.

CAMPOS, P. M. B. G. **Bases dermocosméticas: Cosmiatria e Medicina Estética**, v.2, n.2, p. 32-35, 1994.

CESCHEL, G. C.; MAFFEI, P.; MORETTI, M. D. L.; DEMONTIS, S.; PEANA, A. T. In vitro permeation trough porcine buccal mucosa of *Salvia desoleana* Atzei & Picci essential oil from topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. Italy, v. 1-2, n. 195, p.171-177, 2000.

CHIVERS, R. A. Easy removal of pressure sensitive adhesives for skin applications. **International Journal of Adhesion & Adhesives**. v. 21, n. 1. p. 381-388, 2001.

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**. 2° ed, New York: Marcel Dekker, Inc, p. 300-375, 2001.

CIENFRUGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. p. 286-334, 2002.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho HPLC**. 1° ed., São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 179p, 1998.

CRODA DO BRASIL, Polawax® NF. Campinas. 2006, [Catálogo]. Disponível em <<http://www.croda.com.br/prodf.php>>. Acesso em: 10 dezembro de 2006.

DELANGE, J.; VANECK, P.; BRUIJNZEEL, P. et al. The rate of percutaneous permeation of xylene, measured using the "perfused pig ear" model, is dependent on the effective protein concentration in the perfusing medium. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 127, n. 2, 1994. p. 298-305.

EDGINTON, J. A.; SHERMAN, H. I. **Physical Science for Biologists**. London: Hutchinson University Library, 1971.

FANG, J. Y.; WU, P. C.; HUANG, Y. B.; TSAI, Y. H. In vitro permeation study of capsaicin and its synthetic derivatives from ointment bases using various skin types. **International Journal of Pharmaceutics**. Taiwan, v.1-2, n. 126, p. 119-128, 1995.

FANG, J. Y.; HWANG, T. L.; LEU, Y. L. Effect of enhancers and retarders on percutaneous absorption of flurbiprofen from hydrogels. **International Journal of Pharmaceutics**. Taiwan, v. 250, n. 2, p. 313-325, 2003.

FEMENÍA-FONT, A.; BALAGUER-FERNÁNDEZ, C.; MERINO, V.; RODILLA, V.; LÓPEZ-CASTELLANO, A. Effect of chemical enhancers on the in vitro percutaneous absorption of sumatriptan succinate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Spain, v.61, n. 1-2, p. 50-55, 2005.

FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K. F. **Dermatología en Medicina General**. 4° ed., Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 1997. p. 2519 -2545.

FORSLIND, B.; ENGSTRÖM, S.; ENGBLOM, J.; NORLÉN, L. A novel approach to the understanding of human skin barrier function. **Journal of Dermatological Science**. Sweden, v. 14, n. 2, p. 115-125, 1997.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **J. Invest. Dermatol.** v. 64, n. 3, p. 190-195, 1975.

FRANZ, T. J. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. **Curr. Probl. Dermatol.** v. 7, p. 58-68, 1978.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional**, 2° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 281-288.

GALIA, E.; NICOLAIDES, E.; HÖRTER, D.; LÖBENBERG, R.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J. B. Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting *In Vivo* Performance of Class I and II Drugs. **Pharmaceutical Research**. Germany, v. 15, n.5, p. 699-705, 1998.

<http://www.pluryquimica.com.br/pdf/Metabissulfito%20de%20S%F3dio.pdf>

http://www.dequfpe.br/disciplinas/MecFluidos/REOLOGIA_DE_FLUIDOS.pdf

[http://www.setor1.com.br/analises/reologia/curva inde htm](http://www.setor1.com.br/analises/reologia/curva%20inde%20htm)

HUANG, Y. B.; WU, P.C.; KO, H. M.; TSAI, Y. H. Cardamom oil as a skin permeation enhancer for indomethacin, piroxicam and diclofenac. **International Journal of Pharmaceutics**. China, v. 126, n. 1, p.111-117, 1995.

JATO, J. L. V. **Tecnologia Farmaceutica: Aspectos Fundamentais de los Sistemas farmacéuticos y operaciones basicas**, Madrid: Editorial Sintesis. v. I, p. 1-362, 1997.

JATO, J. L. V. **Tecnologia Farmaceutica: Formas Farmaceuticas**, Madrid: Editorial Sintesis. v. II, p. 304-346, 1997.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 6° ed. Guanabara Koogan, p.551-555/20-42, 1998.

KEDOR-HACKMANN, E. R. M.; NERY, M. F.; SANTORO, M. I. R. M. Determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations by ultraviolet spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. **Analytical Letters**. São Paulo, v. 27, n. 2, p. 363-376, 1994.

KEDOR-HACKMANN, E. R. M.; SANTORO, M. I. R. M.; SINGH, A. K.; PERARO, A. C. First-derivative ultraviolet spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of ketoconazole in pharmaceutical emulsions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v. 42, n. 1, p. 91-97, 2006.

KHAN, G. M.; FRUM, Y.; SARHEED, O.; ECCLESTON, G. M.; MEIDAN, V. M. Assessment of drug permeability distributions in two different model skins. **International Journal of Pharmaceutics**. Scotland, v. 303, n. 1-2, p. 81-87, 2005.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. São Paulo: Guanabara Koogan, p.18.16, 1988.

KLEIN, K. Formulando Emulsões Cosméticas. **Cosmet. Toiletries**. v. 17, 2005.

LABA, D. **Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries**. New York: Marcel Dekker, Inc., p.1-55/313-418,1993.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, p. 855-905, 2001.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. 1º ed, São Carlos: RiMa, 45p, 2004.

LEE, B. J.; LEE, T. S.; CHA, B. J.; KIM, S. H.; KIM, W. B. Percutaneous absorption and histopathology of a polaxamer-based formulation of capsaicin analog. **International Journal of Pharmaceutics**. South Korea, v. 159, n. 1, p. 105-114, 1997.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, sept/oct, 2002.

LEVEQUE, N.; MAKKI, S.; HAFGRAFT, J.; HUMBERT, Ph. Comparidon of Franz cells and midrodialysis for assessing salilylic acid penetration through human skin. **Interantional Journal of Pharmaceutics**. France, v. 269, n. 2, p. 323-328, 2003.

LEVRON, J. C.; TAIEB, A. Transcutaneous absorption of ketoconazole in infant after application of Ketoderm. **Therapie**. v. 46, n. 1, 1991. p. 29-31.

LOPES, L. B.; BENTLEY, M. V. L. B. Cyclosporin A in skin samples from *in vitro* penetration studies may be assayed a simple HPLC method. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v. 41, n. 4, p. 477-482, 2005.

LÓPEZ, A.; FAUS, V.; DIEZ-SALES, O.; HERRÁEZ, M. Skin permeation model of phenyl alcohols: comparison of experimental conditions. **International Journal of Pharmaceutics**. Spain, v.173, n. 1-2, p. 183-191, 1998.

LOYD, V.; ALLEN, Jr; Polisorbatos. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**. v.5, n. 6, novembro/dezembro, 2003.

LOW, A. S.; WANGBOONSKUL, J. An HPLC assay for the determination of ketoconazole in common pharmaceutical preparations. **The analyst**. Thailand, v. 124, n. 11, p. 1589-1793 (November), 1999.

MARTINS, M.R.F.M; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Portugal, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

NOKHODCHI, A.; SHOKRI, J.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; BARZEGAR-JALALI, M. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**. Iran, v. 250, n 2, p. 359-369, 2003.

ÑUNEZ, F. A.; YALKOWSKY, S. H. Relationship between polysorbate 80 solubilization descriptors, and octanol – water partition coefficients of drugs. USA. v. 200, n. 2, p.217-222, 2000.

OECD-EUROPEAN COMMISSION, Health & Consumer Protection Directorate-General. **Guidance Document on Dermal Absorption**. 27 November, 2002.

OECD-ENVIRONMENT DIRECTORATE, JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY. Guidance for the conduct of skin absorption studies, OECD series on testing and assessment. n. 28, 05 mar, 2004.

OTTO,T.; CHORILLI, M.; ZAGUE, V.; RIBEIRO, M. C.; LEONARDI, G. R. Uso da Técnica do Tape Stripping na Quantificação da Benzofenona-4. **Cosmetics & Toiletries**. Piracicaba, v. 17, n. 1, p.83-84, 2005.

PASCUCCI, V. L.; BENNETT, J.; NARANG, P. K.; CHATTERJI, D. C. Quantitation of Ketoconazole in Biological Fluids Using High-Performance Liquid Chromatography **Journal of Pharmaceutical Sciences**. Bethesda, v. 72, n. 12, (December), p.1467-1469, 1983.

PERSHING, L.K.; CORLETT, J.; JORGENSEN, C. In vivo Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Topical Ketoconazole and Miconazole in Human Stratum Corneum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Utah, v. 38, n. 1, p.90-95, 1993.

PHARMACOPEIAL FORUM. In Vitro Release: Collaborative Study Using the Vertical Diffusion Cell. v. 32, n. 5, sept.-oct., p.1590-6, 2006.

PIETRA, A. M. DI; CAVRINI, V.; ANDRISANO, V.; et al. HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v.10, n. 10-12, 1992. p. 873-879.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle Biológico de **Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. Atheneu: São Paulo, USP, 2000. p 205-241.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 5° ed., Lisboa: Calouste Gulbenkian, v. I; II; III, 1995.

REOLOGIA DE FLUÍDOS. Disponível em:< [http:// www. deq.ufpe.br/disciplinas/MecFluidos/REOLOGIA DE FLUÍDOS.pdf](http://www.deq.ufpe.br/disciplinas/MecFluidos/REOLOGIA%20DE%20FLUÍDOS.pdf) > Acesso em: 15 de dezembro de 2006.

REIFENRATH, W. G. Percutaneous penetration in the hairless dog, wealing pig and grafted athymic nude mouse: evaluation of models for predicting skin penetration in man. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 27, p. 123 – 136, 1984.

REYNOLDS, J. E. F. Martindale: The Extra Pharmacopoeia. London: Pharmaceutical Press, 29 ed., 1989. p. 426-429.

RICHARDSON, M.L.; GANGOLLI, S. **The dictionary of substances and their effects**. England, v. 5, p. 197-199, 1994.

RIEGER, M. Teste de estabilidade para microemulsões. **Cosmet. Toiletries**. v. 8, p. 47-55, 2000.

ROUGIER, A.; DUPUIS, D.; LOTTE, C.; ROQUET, R.; SCHAEFER, H. In vivo Correlation Between Stratum Corneum Reservoir Function and Percutaneous Absorption. **The Journal of Investigative Dermatology**. France, v. 81, n. 3, p. 275-278, 1983.

ROYCHOWDTHURY, U.; DAS, S. K. Rapid identification and quantitation of clotrimazole, miconazole, and ketoconazole in pharmaceutical creams and ointments by thin-layer chromatography-densitometry. **J. AOAC Int.** v. 79, n. 3, p. 656-659, 1996.

SAÏD, A.; MAKKI, S.; MURET, P.; HUMBERT, Ph; MILLET, J. Psoralens percutaneous permeation across the human whole skin and the epidermis in respect to their polarity (in vitro study). **Journal of Dermatological Science**. France, v. 14, n. 2, p. 136-144, 1997.

SANCTIS, D. S. Emulsões aspectos técnicos e práticos para o desenvolvimento de formulações. **Racine**, p.5, 2000.

SANTOS, D.; BAHIA, M. F. G. Promotores de Absorção e Penetração. **Cosmetics & Toiletries**. Portugal, v. 7, set/out, p. 43-51, 1995.

SHAR, V. P.; MAIBACH, H. I. **Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence and Penetration**. New York, 1993. 453p.

SHOKRI, J.; NOKHODCHI, A.; DASHBOLAGHI, A.; HASSN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; JALALI, BARZEGAR-JALALI, M. The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. **International Journal of Pharmaceutics**. Iran, v. 228, n. 1, p. 99-107, 2001.

SKIBA, M.; SKIBA-LAHIANI, M.; MARCHAIS, H.; DUCLOS, R.; ARNAUD, P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 198, n. 1, France, p. 1-6, 2000.

STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica: Fundamentos da Biodisponibilidade, Bioequivalência, Dissolução e Intercambialidade de Medicamentos Genéricos**. São Paulo: USP, 1999. p. 1-63.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.1, n. 108-109, p. 227-258, 2004.

THE MERCK INDEX: An encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. USA: 11° ed , Merck & CO., INC. 1989. p. 835.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA United States Pharmacopeia Convention, Inc., 29 ed. Rockville, MD, 2006.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**. Israel, v. 1-3, n. 56, p.7-21, 1998.

TORUAN-PURBA, A. V.; TABIBI, E.; MENDES, R. Isotretinoin liposomes with soluble collagen as a penetration through shed snake skin. **Pharm. Res.**, Suppl, New York, v. 10, n. 5-6, PDD 7277, 1993.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F. **Microbiologia**. 3° ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 365-425.

VENTER, J. P.; MÜLLER, D. G.; PLESSIS, J. Du; GOOSEN, C. A comparative study of an in situ adapted diffusion cell and in vitro Franz diffusion cell method for transdermal absorption of doxylamine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. South Africa, v. 13, n. 2, p. 169-177, 2001.

VELIKINAC, I.; CUDINA, O.; JANKOVIC, I.; AGBABA, D.; VLADMIROV, S. Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations. **Il Fármaco**. Belgrado, v. 59, n. 5, p. 419-424, 2004.

VIGLIOGLIA, P. A.; RUBÍN, J. **Cosmiatria II: Ciência que compreende la atención cosmética de la piel sana o enferma**, Argentina: AP Americana de Publicaciones AS, 1991. p. 1-195.

VISERAS, C.; SALEM, I.; RODRIGUEZ GALAN, I. C.; CEREZO GALAN, A.; LÓPEZ GALINDO, A. The effect of recrystallization on the crystal growth, melting point and solubility of ketoconazole. **Thermochimica Acta**. v. 268, n. 15, p. 143-151, 1995.

VOIGT, R. **Tratado de Tecnologia Farmacêutica**, Espanha: Editorial Acríbia, 1982. p. 367-396.

WATKINSON, A. C.; JOUBIN, H.; GREEN, D. M.; BRAIN, K. R.; HADGRAFT, J. The influence of vehicle on permeation from saturated solutions. **International Journal of Pharmaceutics**. France, v.1, n. 121, p. 27-36, 1995.

WESTER, R. C.; MAIBACH, H. I. *In vitro* testing of topical pharmaceutical formulations. In: BRONAUGH, R. L.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous absorption (Mechanisms, Methodology, Drug Delivery)**, New York: Marcel Dekker, 1989, p. 654-660.

WU, P. C.; HUANG, Y. B.; LIN, H. H.; TSAI, Y. H. In vitro percutaneous absorption of captopril through excised rabbit skin. **International Journal of Pharmaceutics**. Taiwan, v. 1, n. 143, p. 119-123, 1996.

ZECEVIC, R. M.; TOSKIC-RADOJICIC, et al. Therapy of dysseboreic dermatitis with ketoconazole. **Vojnosanit Pregl**. v. 50, n. 1, 1993. p. 61-63.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)