

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO COMPARATIVO DA LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO
CUTÂNEA DE NITRATO DE MICONAZOL DE EMULSÕES TÓPICAS
COMERCIAIS**

Carolina Soares Bemvindo

**Rio de Janeiro
2006**

CAROLINA SOARES BEMVINDO

**ESTUDO COMPARATIVO DA LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO
CUTÂNEA DE NITRATO DE MICONAZOL DE EMULSÕES TÓPICAS
COMERCIAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Nádia Maria Volpato

Rio de Janeiro

2006

CAROLINA SOARES BEMVINDO

**ESTUDO COMPARATIVO DA LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE
NITRATO DE MICONAZOL DE EMULSÕES TÓPICAS COMERCIAIS**

Aprovada em 20 de junho de 2006

Prof^a Dr^a Nádia Maria Volpato – Orientadora

Departamento de Medicamentos - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, RJ

Prof^a Dr^a Renata Fonseca Vianna Lopez

Departamento de Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto - USP-RP, SP

Prof^a Dr^a Maria Bernadete Riemma Pierre

Departamento de Medicamentos - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, RJ

Prof^a Dr^a Elisabete Pereira dos Santos

Departamento de Medicamentos - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, RJ

Aos meus pais, Carlos e Lenita, por possibilitarem a realização de todos meus sonhos, pelo amor e apoio.

Ao meu irmão Bernardo e meu namorado Bruno, meus grandes amigos, por todas as risadas, pelo carinho e pela paciência.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Nádia Maria Volpato, pela brilhante orientação e exemplo profissional, pela confiança sempre depositada em mim e por anos de carinho, amizade e agradável convivência;

Ao LabCQ por toda a estrutura que possibilitou a realização desse projeto;

À CAPES pela bolsa de mestrado;

Às amigas do LabCQ, Ana, Edilene, Vivian, Daniela, Mariana, Tailane, Bianca e outros, em especial a Laís, por momentos de distração entre um experimento e outro, e a Zaida, pela amizade e orientações;

À Eliane, por toda a ajuda, desde o tempo de iniciação científica;

À professora Bete e Carla por participarem da banca de acompanhamento e pelas sugestões;

Ao Laboratório NeoQuímica Comércio e Indústria Ltda., pelo fornecimento dos produtos;

Ao CF (S) Antônio de Jesus Barbosa, pelo imenso apoio na etapa final desse trabalho;

À minha querida avó, meus tios e primos, que formam minha louca e amada família, por todo carinho e apoio; e a Sê e Eduardo, pelo carinho;

Às minhas amigas de graduação Cíntia, Flávia, Simone e Priscila, pelos momentos mais felizes da faculdade, e a todos meus amigos pelos ótimos fins de semana.

RESUMO

BEMVINDO, Carolina Soares. **Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas Comerciais**. Rio de Janeiro, 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

Produtos dermatológicos tratam de doenças nas diferentes camadas da pele ou em apêndices cutâneos, logo sua eficácia dependerá da concentração do fármaco nesses locais. A quantidade de fármaco presente nas camadas da pele dependerá da eficiência relativa dos processos de liberação do fármaco da formulação semi-sólida que o contém e de penetração da substância ativa nas camadas da pele, constituindo tema de interesse da biofarmácia.

A liberação *in vitro* ou cedência de formulações tópicas pode ser determinada por estudos em células de difusão equipadas com membrana sintética. O teste é recomendado pela agência americana, Food and Drug Administration (FDA), para determinação de equivalência entre duas formulações após mudanças específicas, como fornecedor e equipamentos. Sua aplicação na determinação de uniformidade entre lotes e no desenvolvimento de formulações também é amplamente aceita.

Testes para avaliação da penetração e permeação de produtos de aplicação tópica realizados *in vivo* em humanos são os mais relevantes. No entanto, devido ao número de dificuldades associadas aos protocolos *in vivo*, experimentos *in vitro* ou *ex vivo* possuem considerável importância. O modelo mais aceito, em substituição à pele humana, é a pele suína, devido à boa semelhança estrutural e fisiológica reportada por diversos autores.

No presente trabalho foram realizados testes para comparação biofarmacêutica de três formulações semi-sólidas comerciais de nitrato de miconazol (MCZ), sendo o medicamento referência nacional (produto A), um genérico (produto B) e um similar (produto C).

A liberação *in vitro* de três lotes de cada formulação em estudo foi determinada em célula de Franz equipada com membrana sintética de acetato de celulose e de polissulfona.

A quantidade de MCZ na epiderme e na derme após duas e quatro horas de contato das formulações com pele suína *ex vivo* foi determinada por extração direta do fármaco do tecido. A eventual permeação do fármaco através da pele montada em células de Franz também foi determinada.

O estudo dos perfis de liberação das três formulações revelou boa uniformidade entre os três lotes dos produtos A e B. Foi observado um comportamento diferente quanto à liberação de um dos lotes do produto C. O produto A foi aquele que permitiu maior liberação de MCZ da formulação. Os resultados de fluxo e *lag time* obtidos com as membranas de acetato de celulose e polissulfona foram considerados estatisticamente iguais ($\alpha=5\%$).

Quanto à penetração de MCZ em epiderme e derme suína, verificou-se que, de forma geral, o produto A foi o que resultou em menores quantidades de MCZ nas camadas da pele. A permeação do fármaco através todas as camadas da pele foi considerada insignificante, a partir de todas as formulações.

Os resultados obtidos podem ser justificados pela presença de propilenoglicol nas formulações B e C, o que não ocorre na formulação A. Esse excipiente pode causar aumento da solubilidade de MCZ nas formulações B e C, resultando na menor liberação *in vitro* do fármaco. Entretanto, pode agir como promotor de penetração, explicando a maior penetração de MCZ em camadas de pele suína a partir dessas duas formulações.

Com os resultados obtidos *in vitro*, poder-se-ia estimar que, o produto A resultaria em menor quantidade de MCZ no sítio de ação, as camadas da pele, quando comparado com os produtos B e C.

ABSTRACT

BEMVINDO, Carolina Soares. **Comparative Study of the *In vitro* Release and Skin Penetration of Miconazole Nitrate from Comercial Topical Emulsions**. Rio de Janeiro, 2006. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

Dermatological products treat diseases in different layers of skin and its appendages, thus its efficacy depends on the drug concentration on those places. The amount of drug in the skin layers will depend on the relative efficiency of drug release from the topical formulation and of its penetration in the skin layers processes, making this an interesting subject on the biopharmacy field.

The *in vitro* release of topical formulations can be determined by studies in diffusion cells with synthetic membranes. The american agency, Food and Drug Administration, recommends the test for equivalence determination between two products after specific changes, such as suppliers and equipments. The use of this test on inter-batch uniformity determination and formulation development it is also widely accepted.

The penetration and permeation studies performed in humans *in vivo* are the most relevant ones. However, due to difficulties related to *in vivo* protocols, experiments *in vitro* or *ex vivo* gain importance. The most accepted model in replacement of human skin is the pig skin, due to good structural and fisiological resemblance, reported by several authors.

In the present work, comparison tests were performed in three comercial formulation of miconazole nitrate (MCZ), being the reference formulation (product A), a generic formulation (product B) and a similar formulation (product C).

The *in vitro* release of three batches of each product was determined in Franz's diffusion cells with cellulose acetate and polysulfone membranes.

The MCZ amount in the epidermis and in dermis after two and four hours of contact with pig skin was determined by direct extraction of the drug from the skin. The permeation through pig skin on Franz's cells was also determined.

The release profiles of the products revealed good uniformity between the three batches of products A and B. It was observed a different behavior regarding drug release in one batch of product C. The product A showed the higher release of MCZ from formulation. The results of flux and lag time observed with cellulose acetate and polysulfone membranes were statistically the same ($\alpha = 5\%$).

Regarding the MCZ penetration in epidermis and dermis, the product A resulted in the lower amount of the drug in the skin layers, when compared with products B e C. The permeation through all skin layers was considered insignificant, from all formulations.

The obtained results can be explained by the presence of propylene glycol in the formulations B and C, and not in formulation A. This excipient can cause an increase on the solubility of MCZ in formulations B and C, resulting in lower *in vitro* release. However, it can act as penetration enhancer, explaining the higher MCZ penetration from these two formulations.

With the *in vitro* results, one can estimate that product A would result in lower amount of MCZ in the action site, the skin layers, when compared with products B e C.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Atenuação
BD	Biodisponibilidade
BE	Bioequivalência
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DFC	Dermatofarmacocinética
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Etrato Córneo
EE	Estado Estacionário
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fase Móvel
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MCZ	Nitrato de Miconazol
p.a.	Para análise
r	Coefficiente de Correlação
r ²	Coefficiente de Determinação
rpm	Rotações por minuto
SE	Solução Extratora
SNK	Teste de Student – Newman - Keuls
SR	Solução Receptora

STT	Sistemas Terapêuticos Transdérmicos
TR	Tampão Receptor
USP	United States Pharmacopeia
www	World Wide Web

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1	Estrutura molecular do miconazol. 21
Figura 1.2	As três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. 23
Figura 1.3	As rotas de penetração transcelular e intercelular. 31
Figura 1.4	Célula de Difusão de Franz. 34
Figura 3.1	Parte superior da célula de Franz. 54
Figura 3.2	Detalhe do sistema de amostragem da célula de Franz. 55
Figura 3.3	Limpeza de orelha suína. 56
Figura 3.4	Montagem da célula de Franz para estudo de penetração e permeação cutânea. 59
Figura 3.5	Separação entre epiderme e derme. 59
Figura 4.1	Eluição de 3 concentrações de MCZ com a fase móvel escolhida, KH_2PO_4 0,02M : MeOH : CH_3CN (20:40:40). 62
Figura 4.2	Representação gráfica de curvas padrão, obtidas por CLAE, em três dias diferentes. 65
Figura 4.3	Massa de MCZ acumulada na SR de células de Franz equipadas com membrana de acetato de celulose normalizada pela área de contato em função do tempo. 70
Figura 4.4.	Exemplificação do cálculo do lag time. 71

Figura 4.5	Massa de MCZ acumulada na SR de células de Franz equipadas com membrana de polissulfona normalizada pela área de contato em função do tempo.	77
Figura 4.6	Comparação dos valores de fluxo (a) e lag time (b) obtidos com membrana de acetato de celulose (barras claras) e de polissulfona (barras escuras).	80
Figura 4.7	Cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade para o método de extração de MCZ de epiderme e derme suína.	84
Figura 4.8	Massas de epiderme e derme separadas após 2 horas (barras claras) e 4 horas (barras escuras) de contato com a solução receptora em célula de Franz, para uma área de 1,76 cm ² e seus desvios padrão.	85
Figura 4.9	Massas absolutas de MCZ extraídas da epiderme (a) e derme (b) após 2 horas (barras escuras) e 4 horas (barras claras) de contato das formulações com a pele, em uma área de 1,76 cm ² . Massas de MCZ normalizadas por grama de tecido estão apresentadas em (c) epiderme (d) derme.	88

LISTA DE TABELAS

	Página	
Tabela 3.1	Composição qualitativa de loções de nitrato de miconazol 2% de diferentes fabricantes.	47
Tabela 4.1	Fases móveis (FM) testadas para análise de nitrato de miconazol por CLAE.	61
Tabela 4.2	Respostas obtidas para as cinco concentrações de MCZ, preparadas em duplicata, em cada dia de análise, desvio padrão, desvio padrão relativo e parâmetros da curva.	63
Tabela 4.3	Massa de MCZ acumulada na SR de células de Franz equipadas com membrana de acetato de celulose normalizada pela área de difusão e desvios padrão de 6 células para 3 lotes diferentes dos produtos A, B e C.	69
Tabela 4.4	Coefficientes de correlação (r) observados a partir de 60 minutos.	72
Tabela 4.5	Resultados obtidos no estudo de liberação <i>in vitro</i> através de membrana de polissulfona das formulações A, B e C. Massa acumulada de MCZ na SR normalizada pela área de contato em função do tempo e desvio padrão de 3 células.	76
Tabela 4.6	Coefficientes de correlação observados para os três lotes dos produtos A, B e C no estudo com membrana de polissulfona	78
Tabela 4.7	Porcentagem média de recuperação de MCZ em epiderme e derme suína para três níveis do fármaco e seus desvios padrão (n=3).	83

Tabela 4.8	Massas de MCZ obtidas na epiderme e derme suína em uma área de 1,76 cm ² , após 2 e 4 horas de contato com a formulação.	87
Tabela 4.9	Número de células de Franz com pele suína onde foram observadas quantidades detectáveis de MCZ tampão receptor para cada formulação em estudo.	94

SUMÁRIO

1 Introdução	17
1.1 Micoses Superficiais	18
1.1.1 Generalidades	18
1.1.2 Fármacos antifúngicos	18
1.1.3 Nitrato de Miconazol	20
1.2 A administração de fármacos na pele	22
1.2.1 A pele	22
1.2.2 A terapia tópica	26
1.2.3 Penetração Cutânea	28
1.3 Avaliação biofarmacêutica de formulações semi-sólidas	32
1.3.1 Liberação <i>in vitro</i>	32
1.3.2 Quantificação de fármacos na pele	36
1.3.2.1 Testes <i>in vivo</i>	36
1.3.2.2 Testes <i>in vitro</i>	38
2 Objetivos	44
2.1 Objetivos gerais	45
2.2 Objetivos específicos	45
3 Material e Métodos	46
3.1 Materiais	47
3.1.1 Produtos farmacêuticos	47
3.1.1.1 Seleção dos produtos farmacêuticos presentes no mercado nacional	47
3.1.1.2 Produtos farmacêuticos selecionados	48

3.1.2 Equipamentos e Acessórios	49
3.1.3 Reagentes e substâncias químicas de referência	50
3.2 Métodos	50
3.2.1 Condições Analíticas	50
3.2.1.1 Escolha Fase Móvel	50
3.2.1.2 Curva Padrão	51
3.2.2 Liberação <i>In vitro</i> através de membrana sintética	53
3.2.2.1 Preparo das membranas sintéticas	53
3.2.2.2 Escolha e preparo do meio receptor	53
3.2.2.3 Montagem da célula de difusão de Franz	54
3.2.2.4 Retirada de amostra	55
3.2.3 Penetração e permeação cutânea através de pele animal	56
3.2.3.1 Obtenção e limpeza de pele suína	56
3.2.3.2 Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação de MCZ na epiderme e na derme de pele suína.	57
3.2.3.3 Estudos de penetração e permeação cutânea	58
4 Resultados e Discussão	60
4.1 Condições Analíticas	61
4.1.1 Seleção da fase móvel	61
4.1.2 Curva Padrão	63
4.2 Liberação <i>In vitro</i> através de membrana sintética	66
4.2.1 Definição da solução receptora (SR)	67
4.2.2 Liberação <i>in vitro</i> de MCZ através de membrana de acetato de celulose	68
4.2.3 Liberação <i>in vitro</i> de MCZ através de membrana de polissulfona	75

4.2.4 Comparação entre os resultados obtidos com membrana acetato de celulose e polissulfona	79
4.3 Penetração e permeação cutânea em pele animal	83
4.3.1 Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação de MCZ na epiderme e na derme de pele suína.	83
4.3.2 Avaliação do método de separação epiderme-derme	85
4.3.3 Penetração de MCZ em epiderme e derme suína.	87
4.3.4 Permeação de MCZ através de pele suína	94
5 Conclusões	97
6 Referências	100

Introdução

1.1 Micoses Superficiais

1.1.1 1.1.1 Generalidades

Micoses são infecções causadas por fungos parasitas e ocupam lugar de destaque na patologia tropical. As micoses de interesse médico podem ser divididas em superficiais e profundas (LACAZ, 1973).

Micoses superficiais são doenças produzidas por fungos que se localizam preferencialmente na epiderme e/ou seus anexos, podendo, entretanto, em raríssimos casos, invadir a derme e, até mesmo, órgãos internos. O contágio inter-humanos é freqüente (AZULAY & AZULAY, 1999). A anatomia patológica revela apenas processo inflamatório superficial, sem reação do tipo granulomatosa (LACAZ, 1973).

As dermatofitoses são um tipo de micose superficial causada por fungos que, geralmente, em vida parasitária, vivem às custas da queratina da pele, unhas e pêlos. Agrupam-se sob essa denominação fungos do gênero *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, cujas características morfológicas, fisiológicas e antigênicas relacionam-se entre si. As dermatofitoses representam a infecção fúngica mais comum no homem (AZULAY & AZULAY, 1999).

1.1.2 Fármacos antifúngicos

Entre os antibióticos antifúngicos destacam-se a anfotericina, a griseofulvina e a nistatina. Até a descoberta dos azóis, a anfotericina representou a terapia mais utilizada para tratamento de micoses sistêmicas. Ela se liga às membranas celulares e interfere

na permeabilidade e nas funções de transporte. Quando administrada por via oral, é pouco absorvida. A toxicidade renal constitui o efeito indesejável mais comum e mais grave da anfotericina (GHANNOUM & RICE, 1999). A griseofulvina é administrada por via oral e pode ser utilizada para o tratamento das infecções da pele ou unhas, porém devido à sua baixa afinidade por queratina, o tratamento precisa ser muito longo. A nistatina é um antibiótico poliênico semelhante a anfotericina (RANG *et al.*, 2001).

A introdução de compostos azóis em 1980 marcou um avanço importante na terapia antimicótica. Os azóis inibem as enzimas P450 fúngicas responsáveis pela síntese do ergosterol, o principal esterol encontrado na membrana das células fúngicas. A depleção do ergosterol altera a fluidez da membrana, levando à morte do fungo (GHANNOUM & RICE, 1999; TERREL, 1999).

Os azoles antifúngicos utilizados na clínica possuem dois ou três átomos de nitrogênio no anel azólico e são classificados como imidazoles (cetoconazol, miconazol, clotrimazol) e triazoles (itraconazol e fluconazol), respectivamente (SHEEHAM *et al.*, 1999).

O cetoconazol, primeiro composto imidazólico disponível para tratamento oral de micoses foi lançado no início dos anos 80. Por quase uma década, foi o fármaco de escolha para tratamento de micoses sistêmicas. A introdução dos triazóis representou o segundo grande avanço no tratamento de infecções fúngicas. Fluconazol e itraconazol apresentam maior espectro de ação antifúngica e maior segurança que anfotericina e cetoconazol (MAERTENS, 2004). Entre os azóis mais recentes estão o voriconazol e o posaconazol (GUPTA & TOMAS, 2003).

Os agentes antifúngicos tópicos em geral se acumulam na pele, que bloqueia a transferência desses para a circulação sanguínea quase completamente. Portanto, a aplicação tópica é considerada um excelente método de administração de agentes antifúngicos, do ponto de vista de segurança, sendo que sua eficácia terapêutica irá depender de sua concentração no sítio infectado. O tratamento antifúngico tópico é geralmente preferível em relação à terapia sistêmica devido à menor incidência de reações adversas (RANG *et al.*, 2001).

Um agente tópico ideal para infecções fúngicas superficiais deve ter um amplo espectro de atividade, ser eficaz em baixas concentrações, possibilitar esquemas de dosagem convenientes, possuir mais atividade fungicida do que fungistática, ter alta afinidade pelo EC, ser bem tolerado, não ser sensibilizante, proporcionar altas taxas de cura, apresentar baixa incidência de recidivas, evitar o desenvolvimento de resistência fúngica e ter baixo custo (ODOM, 1997).

As principais classes de agentes antifúngicos empregadas no tratamento tópico de infecções superficiais são representadas pelos polienos, como a anfotericina (não ativos contra dermatófitos), os imidazóis e alilaminas, como a terbinafina .

1.1.3 Nitrato de Miconazol

Miconazol é um antifúngico sintético pertencente à classe imidazólica. Possui forma molecular $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$ e peso molecular de 461 g/mol (MERCK INDEX, 2001). O grupo imidazólico presente em sua estrutura está sujeito a protonação, com pka de aproximadamente 6,5. Sua estrutura está representada na Figura 1.1.

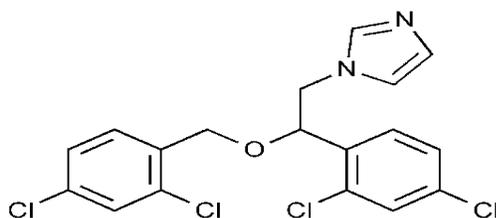


Figura 1.1 Estrutura molecular do miconazol.

O miconazol é administrado por via oral para tratamento das infecções do trato gastrointestinal. Possui meia-vida plasmática curta e deve ser administrado a cada oito horas. Atinge concentrações terapêuticas no osso, nas articulações e no tecido pulmonar, mas não no sistema nervoso central. É inativado pelo fígado. Os efeitos adversos são relativamente raros, e os mais comuns consistem em distúrbios gastrointestinais. Devido à possibilidade de interações adversas, deve-se evitar a administração concomitante de antagonistas dos receptores H1, terfenadina e astemizol (RANG *et al.*, 2001).

O miconazol há muito é na forma de creme a 2% para tratamento de dermatofitoses e candidíase vaginal que não respondem à nistatina tópica (KATZUNG, 1994). Possui atividade contra diversas linhagens de *Candida* (CARRILO-MUNOZ *et al.*, 1996), *Malassezia furfur* (GERVENS & ODDS, 1995) e espécies de *Trichophyton* e *Microsporum* (PERRINS *et al.*, 2005).

Irritação, queimação e maceração são raras após aplicação cutânea. É considerado seguro para uso durante a gestação, entretanto, o uso vaginal deve ser evitado no primeiro trimestre. O nitrato de miconazol também é encontrado para uso tópico sob a forma gel, pó ou loção, e se encontra disponível também sob a forma de creme vaginal e supositório. No tratamento de *tinea pedis*, da *tinea cruris* e da *tinea versicolor*, a taxa de cura pode ultrapassar 90% (GOODMAM & GILMAN, 1996).

1.2 A administração de fármacos na pele

1.2.1 A pele

A pele é um órgão de grande importância, pois visa manter um equilíbrio com o meio externo, no sentido de manutenção vital do meio interior (AZULAY & AZULAY, 1999). Cobre uma área de aproximadamente 2 m² em um homem de estatura média e apresenta espessura variável (1 a 4 mm) conforme a região (DANGELO & FATTINI, 2005). A pele atua como barreira protetora contra ataques físicos, químicos, microbiológicos e de raios ultravioletas, mantém a temperatura corporal, impede a perda de água, além de possuir funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato). Trata-se de um órgão muito complexo, possuindo grande variedade de células (HADGRAFT, 2001).

A pele é formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, da mais externa para a mais profunda, respectivamente (Figura 1.2) (AZULAY & AZULAY, 1999; DANGELO & FATTINI, 2005).

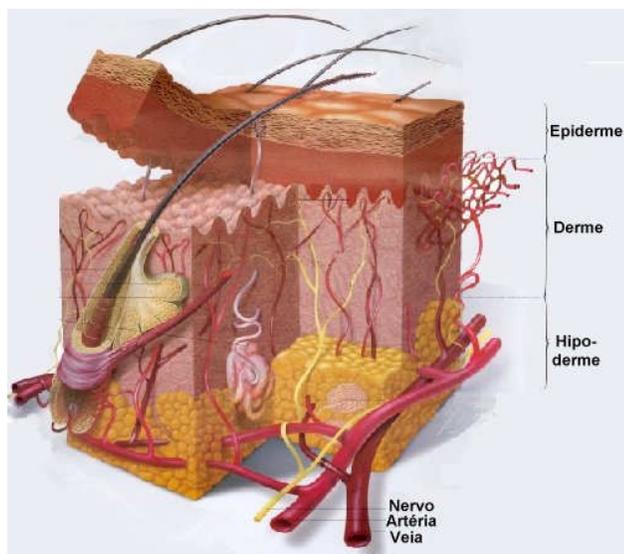


Figura 1.2 As três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.
Fonte: <http://www.saudeparavoce.com.br/pintanapele/anatomia.htm>

A epiderme é a camada mais externa da pele e sua espessura varia de acordo com a região do corpo, sendo entre 15 e 150 μm , e chegando a 0,6 mm nas plantas dos pés (LACAZ, 1973). A epiderme dá origem aos anexos cutâneos: unhas, pêlos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. A abertura dos folículos pilossebáceos (pêlo e glândula sebácea) e das glândulas sudoríparas na pele formam os orifícios conhecidos como poros (ZATZ, 1993).

Suas células não são todas iguais: a camada mais superficial é o estrato ou camada córnea. Mais abaixo se encontram as camadas granulosa, espinhosa e basal. As diferentes camadas mostram as fases pelas quais passam as células, que, produzidas nos estratos mais profundos, sofrem processo de cornificação à medida que atingem os estratos mais superficiais (DANGELO & FATTINI, 2005).

A camada basal, também chamada de camada germinativa, é formada por células jovens, colunares, em multiplicação constante e são responsáveis por renovar as

células da epiderme. As células da camada espinhosa são mais poligonais, e apresentam projeções citoplasmáticas que ancoram as células umas às outras, dando resistência ao atrito. As células da camada granulosa são poligonais, mais achatadas, e têm grânulos de querato-hialina em seu citoplasma, que são precursores da queratina do estrato córneo. O estrato córneo (EC) é a camada mais superficial, composta de células mortas, secas, alongadas, chamadas de corneócitos, produto final da diferenciação das células produzidas na epiderme viável (ZATZ, 1993).

Com uma espessura de até 15 μm , o estrato córneo é a principal barreira física à entrada da maioria das substâncias na pele e à perda de água (ELIAS, 1983; SCHEUPLEIN & BLANK, 1985; BOMMANNAN *et al.*, 1990; POTTS & FRANCOLEN, 1991), embora seja levemente permeável a água. A queratina, depositada nos corneócitos, confere resistência química e física ao tecido (ZATZ, 1993). A hidratação da queratina fornece plasticidade à pele, tornando a função barreira menos vulnerável a estresse mecânico. Quando os corneócitos perdem água, a pele se torna quebradiça, e a impermeabilidade é comprometida (FORSLIND, 1994).

O espaço entre as células é preenchido com lipídios, de forma que é possível observar na barreira da pele dois componentes: o componente hidrofílico, a queratina e o componente hidrofóbico, os lipídios. Elias descreveu, em 1992, a estrutura do EC como uma “parede de tijolos”. Os corneócitos repletos de queratina seriam os tijolos hidrofílicos, enquanto os lipídios intercelulares seriam o cimento hidrofóbico (ELIAS, 1991).

Os lipídeos encontrados no EC são: ácidos graxos, colesterol e esfingolipídeos, como a ceramida (HADGRAFT, 2001). Estão organizados em camadas duplas,

formando estruturas arredondadas (HARATA *et al.*, 1992). Barry demonstrou o elevado ponto de fusão desses lipídios, indicando que essas estruturas na camada córnea estão arranjadas com um alto grau de ordem e alta densidade (BARRY, 1987). Os lipídios são os responsáveis pela função de barreira à perda de água e entrada de substâncias do EC (ELIAS, 1983; BOMMANNAN *et al.*, 1990). Em 1992, Harata e colaboradores removeram o conteúdo lipídico de pele humana e observaram um aumento na permeabilidade de compostos relativamente lipofílicos (HARATA *et al.*, 1992).

A quantidade dos lipídios varia de 3 a 46% nas diferentes áreas do corpo. Diferenças na sua composição são observadas entre diferentes espécies, resultando em diversas permeabilidades. Gray e Yardley demonstraram que peles humana e suína possuem grande semelhança em suas composições lipídicas (GRAY & YARDLEY, 1975).

O estrato córneo e seus componentes estão constantemente expostos à degradação química e física causada pelo ambiente. Para manutenção da função de barreira, é necessária sua constante renovação.

A derme é constituída por tecido conjuntivo (fibras colágenas e elásticas envoltas por substância fundamental), vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas (AZULAY & AZULAY, 1999). As fibras colágenas conferem capacidade de distensão à pele (DANGELO & FATTINI, 2005).

A hipoderme, também chamada de tecido celular subcutâneo, é constituída de lóbulos de lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos. Os lipócitos são arredondados e grandes. A estrutura da hipoderme fornece proteção contra traumas físicos, além de ser um depósito de calorías (AZULAY & AZULAY, 1999).

1.2.2 A terapia tópica

Produtos farmacêuticos aplicados na pele podem ser subdivididos em duas categorias: (i) sistemas transdérmicos, que têm como objetivo a absorção dos fármacos pela circulação sanguínea para tratamento de doenças sistêmicas e (ii) formulações dermatológicas, como cremes, pomadas, loções e geles, para o tratamento local de doenças na pele. Apesar de possuírem características e objetivos distintos, a eficácia de ambos dependerá da liberação do fármaco da formulação que o contém e de sua penetração/difusão pelas camadas da pele (SHAH *et al.*, 1991b).

Observa-se um aumento na popularidade dos sistemas terapêuticos transdérmicos (STT) ou, simplesmente, adesivos transdérmicos, nos últimos anos por uma série de razões, incluindo: (1) grande adesão dos pacientes ao tratamento; (2) níveis plasmáticos constantes, resultado da liberação contínua de fármaco por determinado período; (3) menor incidência de efeitos colaterais, devido à ausência de picos de concentração, (4) eliminação do efeito de primeira passagem e (5) disponibilidade de tecnologia para formulação de adesivos confiáveis e confortáveis ao uso (SHAH *et al.*, 1993). A administração transdérmica de fármacos, entretanto, possui limitações muito específicas que se originam, principalmente, na excelente propriedade de barreira oferecida pelo estrato córneo, camada mais externa da pele. Apenas compostos dotados de certa lipofilia, não ionizados e de baixo peso molecular podem penetrar passivamente a pele, a ponto de sofrerem absorção percutânea. Clonidina, nicotina e estradiol são exemplos de fármacos disponíveis em formulações transdérmicas (AULTON, 2005).

Produtos dermatológicos são comumente relacionados com formulações semi-sólidas, como pomadas, cremes e loções, e tratam de doenças nas diferentes camadas da pele ou em apêndices cutâneos; logo, sua eficácia dependerá da concentração do fármaco nesses locais (PERSHING *et al.*, 1994). O fármaco deve vencer a barreira do EC para atingir as camadas mais profundas, sem que haja permeação e absorção sanguínea. Essas preparações incluem antibióticos, antifúngicos, corticosteróides, retinóides, agentes anti-inflamatórios, anestésicos locais e outros (ANSEL, 1999).

A quantidade de fármaco presente nas camadas da pele dependerá da eficiência relativa dos processos de liberação do fármaco da formulação semi-sólida que o contém e penetração da substância ativa nas camadas da pele (ALBERTI *et al.*, 2001b).

A primeira etapa, conhecida como cedência ou liberação *in vitro* de formulações tópicas, depende do veículo utilizado e do modo de preparo da formulação. A quantidade de fármaco disponível para penetração no EC é determinada nessa fase. Torna-se fácil perceber que a medida de extensão da cedência de uma formulação é fundamental para avaliação de uma formulação dermatológica.

Após liberação da formulação, a penetração através do EC irá determinar a disponibilidade local do fármaco. A determinação da quantidade de fármaco que chega ao local de ação é outra medida importante que pode predizer a eficácia do produto dermatológico. A quantidade necessária para desencadear o efeito farmacológico dependerá da eficácia intrínseca do fármaco.

De um modo geral, formas farmacêuticas semi-sólidas são formulações complexas e que, por sua vez, são constituídas de substâncias cuja estrutura também

apresenta certo grau de complexidade. Frequentemente são compostas de duas fases (aquosa e oleosa), uma das quais sendo contínua – fase externa - e a outra se apresenta sob forma dispersa – fase interna. Na maioria das vezes, as substâncias ativas encontram-se dissolvidas em uma das fases, embora, ocasionalmente, o fármaco não se apresenta completamente solúvel no sistema, encontrando-se disperso em uma ou ambas fases, dando origem assim a um sistema tri-fásico (PRISTA *et al.*, 2003).

As propriedades físicas da formulação dependem de vários fatores, entre os quais a granulometria das partículas dispersas, a tensão interfacial entre as fases, o coeficiente de partição da molécula ativa entre as fases e as características reológicas do produto (PRISTA *et al.*, 2003).

1.2.3 Penetração Cutânea

A penetração cutânea envolve a transferência do fármaco da superfície da pele para o interior do EC, regida, entre outros fatores, pela diferença de concentração. O fármaco pode então atravessar a epiderme, chegar à derme e ser absorvido pelos vasos sanguíneos presentes nessa camada. A denominação permeação cutânea é utilizada quando todos esses processos são realizados (SKELLY *et al.*, 1987).

Difusão em sistemas com multicamadas como a pele tem como etapa limitante a camada com maior resistência à difusão. Logo, a principal resistência à passagem de compostos através da pele reside na estrutura compacta do EC. Essa resistência depende da integridade da camada córnea, além da espessura, que varia de espécie para espécie e também de local para local em um mesmo indivíduo (ZATZ, 1993).

A pele se comporta como uma barreira passiva à difusão de moléculas. Uma evidência desse fato está na manutenção da impermeabilidade da pele mesmo após excisão (ZATZ, 1993).

Na difusão passiva, a matéria se move de uma região do sistema para outro sem que haja influência de outras moléculas e/ou gasto de energia. A hipótese básica é de que a taxa de transferência da substância difundida por unidade de área de uma seção é proporcional ao gradiente de concentração medido perpendicularmente a essa seção (AULTON, 2005). Isso é expresso pela primeira lei de Fick:

$$J = \frac{A \cdot D \cdot K_p (c_1 - c_2)}{h}$$

onde A é a área de contato, D é o coeficiente de difusão, K_p é o coeficiente de partição, c₁-c₂ é a diferença de concentração e h é a espessura da membrana. O fluxo (J) é a taxa de passagem da substância através de uma unidade de superfície de área de pele, em função do tempo (HADGRAFT, 2001).

No entanto, a primeira lei de Fick é aplicável somente para membranas homogêneas, ou seja, que não apresentam variação no coeficiente de permeabilidade ao longo de sua espessura e que o fluxo da passagem de uma substância é constante desde o início. Isso não é observado em membranas biológicas como o EC. Na representação experimental de quantidade de fármaco permeado por área em relação ao tempo, não observamos uma linha reta, como era de se esperar em uma abordagem de estado estacionário (EE) imediato. O que se observa é que em tempos maiores, o gráfico aproxima-se de uma linha reta (EE), no entanto, nos primeiros tempos, é observada uma pequena curvatura, onde o fluxo ainda não é constante com o tempo.

Se a linha do estado estacionário é extrapolada até o eixo do tempo, o intercepto obtido representa o *lag time*, que é definido como o tempo necessário para que a passagem de uma substância através de uma membrana atinja o equilíbrio (AULTON, 2005)

Uma série de fatores biológicos pode alterar a permeabilidade da pele, como o estado da pele (presença de alguma patologia), a idade da pele, o fluxo sangüíneo e o metabolismo. Fatores físico-químicos também apresentam grande influência no processo de passagem de uma substância através da pele. A hidratação do EC é um dos mais importantes fatores para aumentar a velocidade de penetração da maioria das substâncias. A hidratação pode resultar da água difundindo das camadas epidérmicas adjacentes ou da transpiração que se acumula após aplicação de um veículo oclusivo. Entre as características do fármaco que afetam a taxa de penetração estão o coeficiente de partição, o coeficiente de difusão, o tamanho e a forma molecular (AULTON, 2005).

Existem três rotas pelas quais uma substância pode penetrar o EC: a via transcelular, a intercelular e pelos apêndices (POTTS & GUY, 1992; MOSER *et al.*, 2001). A penetração pelos apêndices, sob condições normais, não é significativa, uma vez que pouca área da superfície da pele é ocupada pelos apêndices (EDWARD & LANGER, 1994). Na via transcelular, a molécula atravessa as membranas das células, e encontra um meio essencialmente hidrofílico no interior das células. Na via intercelular, a molécula passa somente pela matriz lipídica, sem penetrar nas células (Figura 1.3).

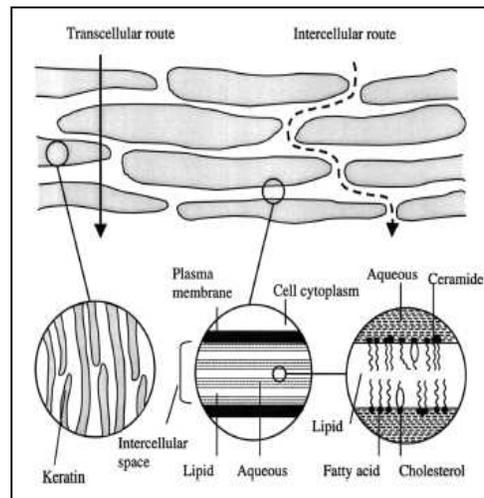


Figura 1.3 As rotas de penetração transcelular e intercelular.
Fonte: Moser *et al.*, 2001

Com o intuito de promover penetração e absorção percutânea, objetivando maiores efeitos locais epidérmicos, dérmicos ou sub-dérmicos e efeitos sistêmicos, diferentes estratégias para superar a barreira oferecida pelo estrato córneo constituem objeto de estudo em várias instituições de pesquisa e laboratórios farmacêuticos. Estas estratégias costumam ser classificadas como sendo de natureza química ou física.

Os promotores de permeação químicos aumentam a permeabilidade por danificar reversivelmente ou por alterar características físico-químicas do EC e reduzir sua resistência à difusão (ANSEL, 1999). Normalmente são solventes (álcoois, pirrolidonas, laurocapram entre outros), tensoativos ou compostos de outra natureza, como uréia, terpenos e até enzimas proteolíticas (WILLIAMS & BARRY, 1992).

Os métodos físicos de promoção da penetração são representados pela ionoforese (emprego de corrente elétrica) (BURNETTE, 1989; GREEN *et al.*, 1993;

SIGH & MAIBACH, 1996) e sonoforese (emprego de ultrassom) (KOST & LANGER, 1993).

1.3 Avaliação biofarmacêutica de formulações semi-sólidas

1.3.1 Liberação *in vitro*

O uso do teste de dissolução *in vitro* para determinar a liberação de fármacos de sólidos orais está descrito nas Farmacopéias e é utilizado rotineiramente no controle de qualidade desses produtos, principalmente para determinação da uniformidade de lotes e na determinação de equivalência farmacêutica (USP 28, 2005, SIEWERT *et al.*, 2003). Para formulações não orais, como as dermatológicas e as transdérmicas, o termo “liberação *in vitro*” é preferido. Os princípios de aplicação do teste de dissolução para sólidos orais também podem ser aplicados em testes de liberação *in vitro*, sendo o objetivo final de ambos a caracterização biofarmacêutica do produto e o controle da sua qualidade (SIEWERT *et al.*, 2003). O teste de liberação *in vitro* para preparações transdérmicas pode ser realizado com os aparatos 5, 6 e 7 da Farmacopéia Americana (USP 28, 2005). No entanto, não existe método oficial para determinação da liberação ou cedência de produtos semi-sólidos (SHAH *et al.*, 1989).

Uma grande quantidade de artigos, assim como *guidelines* do FDA, preconizam o uso de células de difusão como a célula de Franz, equipada com membrana sintética para determinar a liberação *in vitro* de formulações tópicas, como cremes, geles e loções, e também de sistemas transdérmicos (SHAH *et al.*, 1989; U.S.FDA/CDER,

1997; SHAH *et al.*, 1999). A célula de difusão de Franz tornou-se um método popular de estudo da difusão e permeação de substâncias através da pele. Depois de algum tempo foi também utilizada para determinação da liberação *in vitro* de semi-sólidos (SHAH *et al.*, 1989, 1991a, 1992, 1993; CLEMENT *et al.*, 2000).

A célula de Franz segue o modelo bicompartimental das células de difusão, possuindo dois compartimentos, um contendo o fármaco (compartimento doador) e outro contendo uma solução onde o fármaco é solúvel, separados por uma membrana natural ou sintética. No modelo de Franz, a disposição é vertical, mas existem sistemas onde os dois compartimentos estão dispostos lado a lado (FRIEND, 1992).

O produto é colocado na parte acima da membrana, no compartimento doador. A passagem do fármaco pela membrana para o compartimento receptor é monitorada pela análise de amostras do líquido receptor coletadas em diferentes tempos (Figura 1.4).

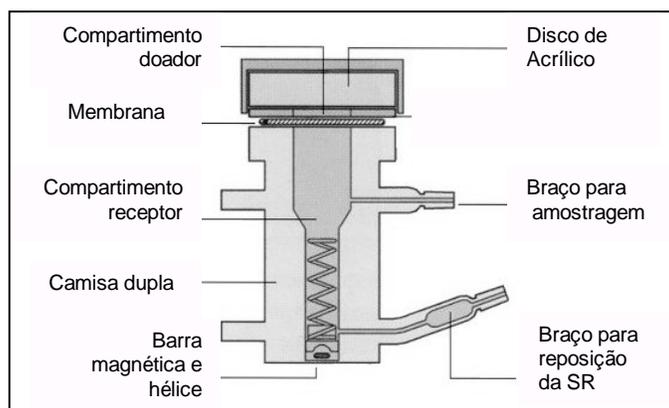


Figura 1.4 Célula de Difusão de Franz.

Fonte: Adaptação do manual da célula - Hanson Research Corp

Os parâmetros que podem influenciar a taxa de liberação *in vitro* são as características da membrana sintética empregada e a composição da solução receptora (SHAH *et al.*, 1999).

O gráfico de quantidade de fármaco acumulado no meio receptor em função do tempo fornece o perfil de liberação, e o fluxo de passagem do fármaco a partir da formulação para a solução receptora é representado pela inclinação da parte reta da curva (SHAH *et al.*, 1989).

A aplicação do teste de liberação *in vitro* de produtos semi-sólidos para determinação de uniformidade entre lotes tem sido amplamente discutida na literatura (SHAH *et al.*, 1999, VAN BUSKIRK *et al.*, 1994). O FDA recomenda o uso desse teste para comprovação de equivalência entre produtos sob mudanças específicas, como mudança de equipamento, fornecedor da matéria prima e outros (U.S.FDA/CDER, 1997). A determinação da taxa de liberação de diferentes formulações também pode

ser útil durante o desenvolvimento galênico e tecnológico de preparações semi-sólidas, sendo um recurso importante para a otimização de formulações.

O teste de liberação *in vitro*, sozinho, não deve ser aplicado na avaliação de biodisponibilidade/bioequivalência (BD/BE) de formulações dermatológicas (U.S.FDA/CDER, 1997). Na verdade, o objetivo do teste não é necessariamente mimetizar o comportamento *in vivo*, e sim avaliar indicadores de performance da formulação (SIEWERT *et al.*, 2003).

A taxa de liberação de um fármaco a partir de determinada formulação depende diretamente das características físico-químicas do veículo e do fármaco (SANTOYO *et al.*, 1996).

A solubilidade do fármaco no veículo representa um papel importante na taxa de liberação *in vivo*. Barry (1983) reportou que para se obter a taxa de liberação máxima, a maior atividade termodinâmica do fármaco na formulação deve ser utilizada.

Em 1996, Santoyo e colaboradores observaram que a liberação *in vitro* de piroxicam diminuía quando a concentração de propilenoglicol na formulação aumentava. O propilenoglicol era um excipiente da formulação que agia como solubilizador. A formulação onde o piroxicam encontrava-se em concentração próxima a saturação (menor quantidade possível de propilenoglicol adicionada), e logo, com maior atividade termodinâmica, foi a que demonstrou maior liberação *in vitro* (SANTOYO *et al.*, 1996).

1.3.2 Quantificação de fármacos na pele

Para desenvolvimento e avaliação de formulações de liberação tópica ou transdérmica, é essencial conhecer o perfil de penetração do fármaco na pele, incluindo a quantidade de substância ativa presente nas diferentes camadas da pele e o fluxo através da pele para a circulação sistêmica (TOUITOU *et al.*, 1998).

1.3.2.1 Testes *in vivo*

Testes para avaliação da penetração e permeação de produtos de aplicação tópica realizados *in vivo* em humanos são os mais relevantes. Como todo teste envolvendo voluntários, esses estudos devem ser submetidos à avaliação ética para aprovação. Geralmente os voluntários são saudáveis, uma vez que a pele com alguma desordem apresenta grandes variações e mudanças durante o tempo (U.S.FDA/CDER, 1998).

Até o momento, a determinação de bioequivalência (BE) e biodisponibilidade (BD) de produtos dermatológicos requer estudos clínicos de eficácia. Entretanto, estudos clínicos são geralmente complicados, demorados, caros e apresentam grande variabilidade (U.S.FDA/CDER, 1997; PERSHING, 2000).

Nos Estados Unidos, produtos dermatológicos candidatos a medicamento genérico são dispensados de testes de BE, desde que os excipientes do produto sejam qualitativamente os mesmos e quantitativamente não difiram em mais de 5% quando comparados com o produto inovador (U.S.FDA/CDER, 1998).

No Brasil as exigências para o registro são ainda mais abrangentes. Medicamentos de uso tópico, não destinados a efeito sistêmico são dispensados de estudos de bioequivalência para registro de medicamento genérico. Deve ser demonstrada apenas a equivalência farmacêutica, ou seja, o candidato a genérico deve apresentar o mesmo fármaco, na mesma concentração em relação ao medicamento de referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis (ANVISA, 2003).

Em 1998, o FDA colocou em consulta pública o guia “Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs – *in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release, and associated studies”, onde discute uma abordagem dermatofarmacocinética (DFC) para determinação de BE/BD de alguns produtos dermatológicos. A DFC pode ser comparada a estudos de farmacocinética realizados em sangue, plasma e urina aplicados ao estrato córneo, permitindo a comparação dos perfis de captação e eliminação do fármaco na pele entre produtos, baseado em curvas de concentração no EC em função do tempo (U.S. FDA/CDER, 1998).

A determinação da concentração de fármaco no EC *in vivo* pode ser realizada por meio da técnica de amostragem denominada *tape-stripping* (U.S. FDA/CDER, 1998; SHAH, 2001). Diversos autores defendem o uso da técnica do *tape-stripping* em estudos de DFC (PERSHING *et al.*, 1994; PELLET *et al.*, 1997; WEIGMANN *et al.*, 1999; ALBERTI *et al.*, 2001a). A técnica também pode ser usada para determinar o perfil de concentração de um fármaco em função da profundidade na pele (ALBERTI *et al.*, 2001c; WAGNER *et al.*, 2001).

A principal limitação do método reside na incapacidade de quantificar o fármaco nas demais camadas da pele *in vivo*. É muito discutida a correlação entre as

quantidades de fármaco no EC e nas camadas mais profundas. Existem atualmente duas correntes quanto à utilização do *tape-stripping* na determinação de BE/BD de produtos dermatológicos. Alguns expressam a opinião de que, uma vez que apenas a quantidade no EC é determinada, apenas produtos para tratamento de doenças cujo sítio de ação seja a camada córnea podem ser avaliados por essa metodologia, como antifúngicos, por exemplo. Outros defendem seu uso para todas as classes de produtos dermatológicos, já que o EC é a barreira que limita a taxa de penetração de substâncias na pele, a quantidade de um fármaco no EC pode fornecer informação relevante para avaliação comparativa de produtos dermatológicos (SHAH *et al.*, 1998).

Outras técnicas utilizadas para quantificação de substâncias na pele são a microdiálise (DAVIES, 1999) e a biópsia da pele (SEUBER *et al.*, 1993; SCHROLNBERGER *et al.*, 2001).

1.3.2.2 Testes *in vitro*

Idealmente, testes para avaliação da penetração e permeação de produtos de aplicação tópica devem ser feitos *in vivo*. No entanto, isso é freqüentemente impossível, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento, quando a toxicidade dos ativos e excipientes ainda não foi documentada. Experimentos *in vitro* ou *ex-vivo* vêm ganhando importância nessa área, devido ao grande número de problemas associados aos protocolos *in vivo*.

Para realização de estudos *in vitro*, a principal premissa é de que o EC é a barreira limitante da taxa de penetração. Dessa forma é possível assumir que, se

tratando de uma camada morta, as funções de barreira não são comprometidas pela remoção da pele do organismo. A penetração de substâncias na pele é um processo passivo, e sua taxa não deve ser apreciavelmente alterada por processos metabólicos locais (BROUNAUGH, 1985). Vários estudos demonstraram que a excisão da pele não altera sua permeabilidade, desde que o EC permaneça intacto, e que a performance do EC como barreira *in vitro* é muito semelhante a *in vivo*, mesmo depois de alguns dias após a retirada do organismo (GALEY *et al.*, 1976; ELIAS *et al.*, 1980; BARRY, 1983).

Estudos em laboratórios requerem o uso de membranas que mimetizem a função de barreira do EC *in vivo*. O tecido humano seria a membrana mais apropriada para utilização em estudos de penetração e permeação cutânea. No entanto, apresenta problemas como baixa disponibilidade, questões éticas e legais, variações quanto ao sexo, idade e região anatômica (HAIGH *et al.*, 1994).

Principalmente devido à baixa disponibilidade de pele humana, modelos animais são bastante utilizados nos estudos de penetração e permeação cutânea. As permeabilidades das peles de alguns animais foram reportadas por uma série de pesquisadores e se apresentam na seguinte ordem crescente: homem, suíno, macaco, cachorro, gato, cavalo, coelho e rato (HAIGH *et al.*, 1994). Os dados *in vitro* são concordantes com a observação experimental de que animais de laboratório comuns, como os roedores, apresentam maior permeabilidade cutânea que o tecido humano, enquanto suínos e macacos apresentam permeabilidade semelhante (BRONAUGH E STEWARD, 1985).

De fato, o modelo animal considerado mais relevante em substituição a pele humana é a pele suína. Obtida facilmente em abatedores, possui propriedades

histológicas e bioquímicas semelhantes à humana. Uma série de estudos demonstram permeabilidade a fármacos bastante similar entre ambas, sendo a pele de orelha de suínos particularmente aplicável a estudos *in vitro*, fornecendo resultados comparáveis aos obtidos com pele humana (MOSER *et al.*, 2001). Em estudo publicado em 2001, Schmook e colaboradores mensuraram a penetração de quatro fármacos com diferentes polaridades (terbinafina, hidrocortisona, clotrimazol e ácido salicílico) em pele humana, pele suína, pele de rato, pele sintética e epiderme humana reconstituída. Os pesquisadores concluíram que a pele suína foi o modelo mais adequado para utilização em substituição a pele humana (SCHMOOK *et al.*, 2001).

Algumas técnicas descritas *in vivo* também podem ser realizadas *in vitro*. Em 2004, Seki e colaboradores utilizaram o flurbiprofeno como fármaco modelo na validação de método de determinação de fármacos na pele por microdiálise, após aplicação tópica em pele suína excisada (SEKI *et al.*, 2004).

A técnica do *tape-stripping in vitro* foi utilizada por Pellett (1997) para avaliar soluções supersaturadas, utilizando o piroxicam como modelo. O autor discute a validade do uso do *tape-stripping in vitro* como alternativa ao estudo *in vivo*, particularmente em estudos preliminares. É importante lembrar que o *tape-stripping in vitro* não é indicado em estudos de dermatofarmacocinética.

Permeação cutânea é a passagem de uma substância pela pele, chegando até suas camadas mais profundas, inclusive circulação sanguínea. Entre os produtos de aplicação tópica, apenas os sistemas transdérmicos possuem o objetivo de produzir concentrações terapêuticas na circulação sistêmica. Dessa forma, testes para determinação da permeação cutânea de formulações transdérmicas são importantes

para determinação de sua eficácia. Já para produtos dermatológicos, o sítio de ação está localizado em uma das camadas pele, portanto, a determinação da quantidade de fármaco capaz de chegar à circulação não tem influência direta no efeito farmacológico. No entanto, a extensão da absorção sistêmica é um dado importante quanto à segurança e possíveis efeitos colaterais de formulações tópicas. Na pesquisa científica, testes de permeação *in vitro* também são feitos para determinação do coeficiente de permeabilidade de membranas, ajudando a estabelecer modelos capazes de substituir a pele humana em todo tipo de investigação cutânea.

Para produtos transdérmicos, a permeação através da pele pode ser medida *in vivo* pela quantificação do fármaco no sangue, plasma ou urina. Para os demais produtos, a quantidade permeada pode não ser mensurável nesses fluídos biológicos (SHAH *et al.*, 1991b; PERSHING *et al.*, 2003). Mesmo para os transdérmicos, as metodologias *in vitro* são preferidas, devido à sua maior simplicidade (BONINA *et al.*, 1993).

Acredita-se que a permeação cutânea observada *in vitro* reflita os aspectos determinantes do processo *in vivo*, na maioria dos casos, e possa ser utilizada para determinar a disponibilidade relativa de produtos dermatológicos (SKELLY *et al.*, 1987).

O teste de permeação *in vitro* é realizado em células de difusão de Franz equipadas com membranas naturais. A montagem da célula é realizada da mesma forma que no teste de liberação *in vitro* (item 1.3.1), sendo que a membrana sintética é substituída por um segmento de pele.

A taxa de permeação do fármaco é determinada pela quantidade permeada em função do tempo. O fluxo de permeação é calculado como a inclinação na porção linear da curva, sendo expresso em quantidade de fármaco por área em função do tempo (KOU *et al.*, 1993; MOSER *et al.*, 2001).

Algumas considerações devem ser feitas em relação ao protocolo de estudo. A solução receptora deve ser escolhida baseada na solubilidade do fármaco, de forma que a condição *sink* seja sempre obedecida. Para fármacos hidrofílicos, é comum o uso de soluções salinas; enquanto para substâncias lipofílicas, o uso de aditivos que aumentem a solubilidade pode ser necessário (SKELLY *et al.*, 1987).

Outra consideração a ser feita é sobre o uso de pele inteira (epiderme e derme) ou somente epiderme. Estudos mostram que a permeação de substâncias lipofílicas ($\log P > 3$) é significativamente diminuída *in vitro* quando usada membrana contendo a derme (MOSER *et al.*, 2001). *In vivo*, não é necessária a passagem por toda a derme, o fármaco é logo captado pelos vasos sanguíneos localizados nessa camada. *In vitro*, esse tecido essencialmente aquoso não possui a irrigação sanguínea presente *in vivo*, funcionando assim como uma barreira à passagem de substâncias com baixa solubilidade em água. Nesses casos, o uso da epiderme isolada seria recomendável (SCHEUPLEIN & BLANK, 1973; BRONAUGH & STEWART, 1985). A separação da epiderme e derme pode ser feita pelo clássico método descrito por Kligman e Christophers em 1963, onde a pele é imersa em água à 60° C por 2 minutos e a epiderme é “descolada” da derme com auxílio de pinça (KLIGMAN & CHRISTOPHERS, 1963). Wester e colaboradores demonstraram, em 1998, que a viabilidade da pele é alterada após imersão em água quente (WESTER *et al.*, 1998). No entanto, em 1993, Peck e colaboradores demonstraram que as propriedades de barreira de epiderme

humana separada por calor são mantidas por até 150 horas, baseados em estudos de permeabilidade de manitol e resistência elétrica. Uma alternativa à separação por calor é a utilização do aparelho denominado dermatômetro, capaz de seccionar a pele em espessuras definidas. Uma espessura de 200 μm corresponde ao estrato córneo mais epiderme (HAIGH E SMITH, 1994).

A determinação da concentração de fármacos na pele por extração direta do tecido requer remoção do excesso de formulação seguida de extração com solvente adequado. Um método analítico adequado, sensível e seletivo deve se empregado para quantificação do fármaco extraído. Separação de epiderme e derme pode ser feita anteriormente à extração, a fim de quantificar o fármaco presente nas diferentes camadas da pele.

A importância da avaliação de fármacos na pele, para controle e desenvolvimento de formulações transdérmicas e dermatológicas é cada vez mais reconhecida. É notado um interesse da comunidade científica para estabelecimento de metodologias validadas e confiáveis que permitam entendimento do comportamento dos fármacos na pele, para otimização dessa via de administração, que pode oferecer algumas vantagens em relação à outras vias, e para comparação do desempenho biofarmacêutico de produtos tópicos dermatológicos.

Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

- Comparar o desempenho de três formulações semi-sólidas dermatológicas de nitrato de miconazol (MCZ) 2%, disponíveis no mercado nacional, quanto à liberação do fármaco através de membrana sintética *in vitro* e quanto à penetração e permeação do antimicótico em pele suína *ex-vivo*.

Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação de nitrato de miconazol nas matrizes em estudo, compreendendo método de extração do fármaco de epiderme e derme suína, a ser aplicada em estudos de penetração.
- Comparar as membranas sintéticas de acetato de celulose e de polissulfona quanto a sua utilização nos ensaios de liberação *in vitro* em células de difusão de Franz.
- Avaliar a homogeneidade entre diferentes lotes de cada produto em estudo, com base nos perfis de liberação *in vitro*.
- Determinar a penetração cutânea das três formulações em estudo em epiderme e derme suína, em dois tempos, duas e quatro horas, após a aplicação dos produtos sobre a pele *ex-vivo*.
- Determinar a eventual permeação de MCZ através de pele suína a partir das três formulações em estudo.

Material e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Produtos farmacêuticos

3.1.1.1. Seleção dos produtos farmacêuticos presentes no mercado nacional

Para seleção de 3 marcas de emulsões (loção) contendo nitrato de miconazol 2%, produtos disponíveis no mercado brasileiro foram analisados quanto aos seus excipientes. Na tabela 3.1, é apresentada a composição qualitativa dos produtos mais disponíveis nos estabelecimentos comerciais, sendo que os excipientes foram classificados de acordo com sua ação/função na formulação.

Tabela 3.1 Composição qualitativa de loções de nitrato de miconazol 2% de diferentes fabricantes. (A água e o nitrato de miconazol são constituintes de todas as formulações não apresentados na tabela).

Fabricantes	Conservante	Antioxidante	Emulsificante	Veículo Lipofílico/Emoliente	Veículo / Promotor de absorção	Espessante	Outros
<i>Janssen – Cilag (Referência Nacional)</i>	Ác. benzóico	BHA	Palmitato-estearato de etilenoglicol e polioxietilenoglicol, glicéridos polioxietilênicos glicosilados	Óleo Mineral	-	-	Perfume primula
<i>Cristália (genérico)</i>	Ác. benzóico	-	Poliétilenoglicol 40 e 25, cera emulsificante	Vaselina Líquida	Propilenoglicol	-	Fragrância primula
<i>Neo-Química (similar)</i>	Metilparabeno, propilparabeno	BHT	Álcool cetosteárico, sorbitano.	Álcool alifático de lanolina, vaselina líquida	Propilenoglicol, álcool etílico 96	Hidroxietil-celulose	Glicerina, silicone antiespumante, essência jasmim, EDTA
<i>Medley (genérico)</i>	Metilparabeno, propilparabeno	-	Cera emulsificante não iônica	Óleo Mineral	Propilenoglicol	-	Ciclometicona
<i>EMS (genérico)</i>	Metilparabeno, propilparabeno	-	Cera emulsificante não iônica	Óleo Mineral	Propilenoglicol, polissorbato 80	-	Cimeticona
<i>Teuto (genérico)</i>	Cloreto de benzalcônio	Galato de propila	Polavax	Vaselina Líquida Miristrato de Isnonrionila	Miristato de isopropila	-	Fosfato de sódio

3.1.1.2 Produtos farmacêuticos selecionados

▪ **PRODUTO A:** Daktarin®. Medicamento Referência Nacional conforme Lei 9.787/99. Fabricados por Jassen-Cilag Farmacêutica Ltda. Frascos com 30 mL de loção contendo 2% de nitrato de miconazol adquiridos no mercado. Lotes:

400674 (lote 1). Fabricação: 03/2004. Validade: 03/2006.

401814 (lote 2). Fabricação: 06/2004. Validade: 06/2006.

GNL 116 (lote 3). Fabricação: 11/2004. Validade: 11/2006.

▪ **PRODUTO B:** Nitrato de miconazol 2%. Medicamento Genérico conforme Lei 9.787/99. Fabricado por Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Frascos com 30 mL de loção contendo 2% de nitrato de miconazol adquiridos no mercado. Lotes:

✓ 4031054 (lote 1). Fabricação: 03/2004. Validade: 03/2006.

✓ 4052333 (lote 2). Fabricação: 05/2004. Validade: 05/2006.

✓ 4105135 (lote 3). Fabricação: 10/2004. Validade: 10/2006.

▪ **PRODUTO C:** Daktazol®. Medicamento Similar. Fabricado por Laboratório NeoQuímica Comércio e Indústria Ltda. Frascos com 30 mL de loção contendo 2% de nitrato de miconazol gentilmente fornecidos pelo fabricante. Lotes:

57570 (lote 1). Fabricação: 03/2005. Validade: 03/2007.

59217 (lote 2). Fabricação: 05/2005. Validade: 05/2007.

59218 (lote 3). Fabricação: 06/2005. Validade: 06/2007.

3.1.2 Equipamentos e Acessórios

- Agitador de tubos (Vortex) PHOENIX AP56;
- Agitador Magnético MARTE – MAG 15;
- Balança analítica METTLER TOLEDO – AG 204;
- Banho termostaticado THERMO HAAKE B3;
- Células de difusão tipo Franz. HANSON RESEARCH CORP. Orifício com 150 mm de diâmetro, resultando em 1,76 cm² de área. 7 mL de capacidade;
- Membrana de Acetato de Celulose SIGMA D – 9527. Retém substâncias com peso molecular maior que 12.000, 150 µm de espessura;
- Membrana de Polissulfona Tuffryn ®. PALL – HT 450. Tamanho de poro 0,45 µm, 165 µm de espessura;
- Membrana filtrante 0,45 µm. MILLIPORE;
- Pipetas automáticas de 20, 200, 1000 e 5000 µL GILSON;
- Placa de aquecimento CORNING;
- Potenciômetro METTLER TOLEDO – MPC 227;
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) isocrático:
 - ✓ Bomba para CLAE WATERS 510
 - ✓ Coluna Nova Pak C18 WATERS
 - ✓ Detector Ultravioleta WATERS 486
 - ✓ Injetor manual RHEODYNE 7725i
 - ✓ Integrador WATERS 746
- Ultrassom THORNTON T14;

- Ultrassom UNIQUE USC 2850;
- Unidade descartável filtrante 0,45 μm de poro. MILLIPORE.

3.1.3 Reagentes e substâncias químicas de referência

- Acetonitrila para CLAE TEDIA;
- Água destilada;
- Etanol p.a TEDIA;
- Fosfato de potássio monobásico p.a. anidro VETEC;
- Metanol para CLAE TEDIA;
- Padrão de trabalho nitrato de miconazol. Lote N107107-3. Potência declarada 100,14 % em base úmida. Gentilmente fornecido por Laboratório Teuto Brasileiro.
- Padrão de nitrato de miconazol da Farmacopéia Brasileira.

3.2 Métodos

3.2.1 Condições Analíticas

3.2.1.1 Escolha Fase Móvel

Após pesquisa na literatura, algumas condições analíticas para determinação do nitrato de miconazol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram

selecionadas e testadas em nosso laboratório. Também foram averiguadas condições empregadas para análise de outros fármacos da mesma categoria, como, por exemplo, o isoconazol, que apresenta grande semelhança estrutural em relação ao miconazol (CRISTÁLIA, 2006). Para escolha da melhor fase móvel, o tempo de retenção, simetria e largura da base do sinal cromatográfico foram avaliados

Um sistema CLAE isocrático, descrito no item 3.1.2, equipado com coluna de fase reversa C18 3,9 x 150 mm, pré coluna C18, *loop* de 20 μL , detector ultravioleta e integrador eletrônico foi utilizado. O comprimento de onda de detecção foi fixado em 234 nm.

3.2.1.2 Curva Padrão

Curvas padrão de MCZ foram preparadas na faixa de concentração de 1 – 20 $\mu\text{g/mL}$. Uma solução estoque contendo 500 $\mu\text{g/mL}$ de MCZ foi preparada por meio da dissolução de cerca de 0,025 g de MCZ (padrão de trabalho), exatamente pesados, em 50,0 mL de etanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições em fase móvel de modo a obter soluções com 1, 2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Cada solução foi preparada em duplicata e a média dessas respostas constituiu um ponto na curva.

A cada dia de análise foi gerada uma curva (com pelo menos 3 pontos) e a equação da reta foi utilizada para cálculo da concentração de MCZ nas amostras.

A condição analítica escolhida foi validada quanto à linearidade e faixa de aplicação, seletividade, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. A linearidade foi avaliada por meio do coeficiente de correlação obtido em três curvas padrão de miconazol realizadas em diferentes dias.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram estimados pela relação sinal:ruído. A altura do ruído da linha de base foi medida por 3 minutos, no valor mínimo de atenuação do equipamento (AT=0,5). A relação de 3:1 foi utilizada no LD e de 10:1 no LQ, para prever a resposta de cada limite em altura e, posteriormente, em concentração em função da inclinação entre altura e concentração de uma solução padrão de MCZ (2 µg/mL), obtida na mesma atenuação anterior.

Assim, o LD e o LQ foram calculados, respectivamente, por:

$$\text{LD } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{altura ruído (cm)} \times 3 \times \text{concentração MCZ } (\mu\text{g/mL})}{\text{altura do sinal MCZ (cm)}}$$

$$\text{LQ } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{altura ruído (cm)} \times 10 \times \text{concentração MCZ } (\mu\text{g/mL})}{\text{altura do sinal MCZ (cm)}}$$

3.2.2 Liberação *In vitro* através de membrana sintética

3.2.2.1 Preparo das membranas sintéticas

a) Membrana de Acetato de Celulose.

Segmentos de aproximadamente 5 cm da membrana de acetato de celulose (membrana de diálise) foram cortados. A membrana teve suas laterais cortadas, foi aberta em água corrente e fervida em cerca de 50 mL de água destilada por 5 minutos, repetindo-se o procedimento por três vezes com novo volume de água destilada (BENTLEY, 2002).

b) Membrana de polissulfona:

As membranas de polissulfona foram imersas em alguns mililitros de solução receptora (SR), para saturação, 30 minutos antes do experimento (HANSON RESEARCH CORP).

3.2.2.2 Escolha e preparo do meio receptor

Segundo recomendação do FDA (U.S. FDA/CDER, 1997), misturas hidroalcoólicas podem ser utilizadas como meio receptor em estudos de liberação *in vitro*, quando o fármaco for muito pouco hidrossolúvel.

A solubilidade do MCZ em uma solução de etanol a 10% foi determinada com o objetivo de verificar se essa solução obedecia à condição *sink*, ou seja, não favoreceria proximidade a saturação para essa massa de fármaco.

O meio receptor escolhido foi preparado, filtrado ($0,45\ \mu\text{m}$) e desgaseificado por meio de ultrassom a cada dia de análise.

3.2.2.3 Montagem da célula de difusão de Franz

As células de difusão foram montadas conforme a Figura 1.1. O compartimento receptor foi preenchido com etanol 10%, ou seja, a solução receptora (SR) filtrada e desgaseificada por sonicação. A membrana foi disposta na célula, evitando a formação de bolhas.

Acima da membrana foi colocado um anel de teflon, de 150 mm de diâmetro interno, que teve seu orifício totalmente preenchido pela formulação em estudo, resultando em aproximadamente 400 mg de loção. A formulação foi ocluída por disco de acrílico e o sistema foi fechado com uma garra metálica (Figura 3.1). O compartimento receptor foi mantido sob agitação (500 rpm) por meio de pequena barra magnética e hélice. As células foram mantidas à temperatura ambiente.

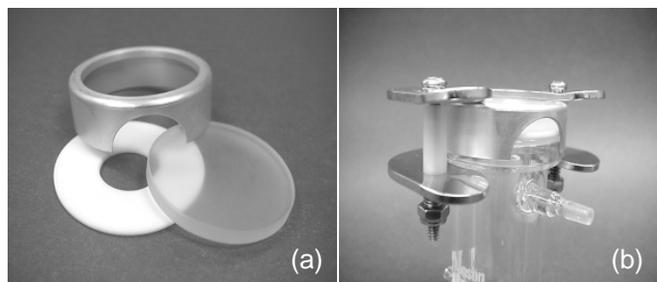


Figura 3.1 Parte superior da célula de Franz. (a) Anel de teflon branco, disco de acrílico e anel metálico para selagem. (b) Célula selada com auxílio de garra metálica.

Fonte: HANSON RESEARCH CORP

3.2.2.4 Retirada de amostra

A retirada de amostra foi realizada por meio de adição de 1 mL de SR fresca, com auxílio de seringa, através da válvula localizada no braço inferior da célula. Dessa forma, igual volume é deslocado através da cânula de amostragem localizada no braço superior da célula (Figura 3.2). Os primeiros 200 μ L recolhidos foram desprezados. Amostras foram retiradas após 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos da aplicação da formulação e submetidas à análise por CLAE, de acordo com as condições estabelecidas.



Figura 3.2 Detalhe do sistema de amostragem da célula de Franz.
Fonte: HANSON RESEARCH CORP

A massa de MCZ acumulada no compartimento receptor, em cada tempo, foi calculada, considerando o volume total da célula, a quantidade de fármaco retirada nas coletas de amostras anteriores e a área efetiva para a liberação na célula. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística empregando-se análise de variância (ANOVA com um fator) com nível de significância (α) de 5%, com auxílio do *software* Sigma Stat for Windows 1.0 (Jandel Corporation, 1994).

3.2.3 Penetração e permeação cutânea através de pele animal

3.2.3.1 Obtenção e limpeza de pele suína

Orelhas retiradas de suínos de até 6 meses de idade foram obtidas em matadouro devidamente fiscalizado pelo Ministério da Agricultura, localizado no município do Rio de Janeiro. Logo após sua obtenção, as orelhas foram lavadas com escova macia e água corrente. A pele da parte externa da orelha foi cuidadosamente descolada com bisturi e o excesso de gordura sub-cutânea foi retirado com auxílio de tesoura e pinça. As peles foram cortadas em pedaços de acordo com o teste a ser realizado, embaladas em filme de polietileno e papel alumínio e os segmentos foram armazenados em freezer (-20° C) por no máximo 60 dias (Figura 3.3).



Figura 3.3 Limpeza de orelha suína. (a) Orelha de suíno lavada. (b) Retirada da pele com auxílio de bisturi. (c) Retirada do excesso de gordura sub-cutânea. (d) Segmento de pele limpo obtido.

3.2.3.2 Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação de MCZ na epiderme e na derme de pele suína.

Com objetivo de promover separação da epiderme e derme, após descongelamento, os segmentos de pele foram imersos em água destilada a 50°C por dois minutos, de acordo com metodologia clássica de separação de epiderme e derme por calor descrita em por Kligman e Christophers (1963). As camadas isoladas foram dispostas separadamente no fundo de tubos tipo Eppendorf. Adicionou-se 10 µL de diferentes soluções padrão de nitrato de miconazol em etanol diretamente sobre cada segmento de pele, de modo a obter 4 níveis de quantidade de MCZ (3; 7,5; 12 e 15 µg). Após três horas de contato para penetração/impregnação do fármaco no tecido, adicionou-se 1,5 mL de fase móvel como solução extratora. Procedeu-se agitação por 10 segundos em vortex, seguido de 12 minutos de banho de ultrassom, e nova agitação. As soluções foram centrifugadas e filtradas (0,45 µm). A análise foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Paralelamente, *spiked solutions* (SS) foram preparadas por adição de 10 µL das diferentes soluções de miconazol (resultando nos mesmos 4 níveis de quantidade de miconazol) ao volume de FM necessário para completar 1,5 mL. As SS foram analisadas por CLAE da mesma forma que as amostras. A recuperação foi investigada pela comparação da área obtida na SS (100%) e a área observada na amostra, sendo o resultado expresso em porcentagem de MCZ recuperada.

A seletividade do método foi investigada por meio da injeção de solução extratora de epiderme e derme sem adição de MCZ e a precisão foi avaliada pelo desvio padrão obtido entre as 3 repetições de cada nível.

3.2.3.3 Estudos de penetração e permeação cutânea

As células de difusão foram montadas da mesma forma que no estudo de liberação *in vitro*, descrito no item 3.2.2.3. A solução receptora utilizada foi uma solução tampão KH_2PO_4 0,02 M pH 4,5, degaseificada e filtrada (0,45 μm). Após descongelamento, segmentos de pele foram adicionados à célula, com EC faceando o compartimento doador e derme em contato com a solução receptora evitando-se sempre a formação de bolhas (Figura 3.5 a). O compartimento doador foi mantido sob agitação (500 rpm) por meio de pequena barra magnética e hélice. A formulação foi aplicada na área delimitada pelo anel de teflon (150 mm de diâmetro), resultando em aproximadamente 400 mg de loção em cada célula (Figura 3.5 b). Imediatamente após a montagem, uma alíquota de 1 mL de solução receptora foi retirada. As células foram mantidas a 37° C pela circulação de água termostaticada pela camisa dupla das mesmas.

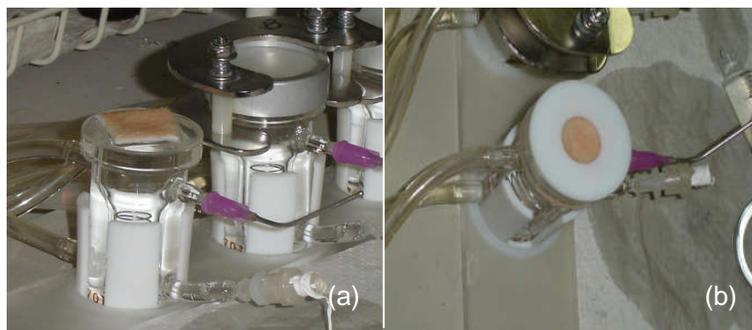


Figura 3.4 Montagem da célula de Franz para estudo de penetração e permeação cutânea. (a) Célula de Franz com pele suína. (b) Área delimitada pelo anel de teflon para a aplicação da formulação (150 mm de diâmetro).

Após duas ou quatro horas de experimento, nova alíquota de 1 mL da solução receptora foi retirada. As células foram desmontadas, o excesso de formulação foi removido da superfície da pele, limpando-a por duas vezes com algodão umedecido e mais uma vez com algodão seco. A epiderme foi separada da derme com auxílio de bisturi (Figura 3.6). As áreas tratadas dos segmentos de pele, devidamente separadas da região circundante não exposta à formulação, foram pesadas e dispostas em tubos distintos (FREITAS, 2005). Adicionou-se 1,5 mL de fase móvel e procedeu-se a extração conforme validado e descrito no item 3.2.3.2. As amostras foram filtradas (0,45 μm) e analisadas por CLAE.



Figura 3.5 Separação entre epiderme e derme. (a) Segmento de pele após ser retirado da célula de Franz. (b) Separação da epiderme da derme com auxílio de bisturi; (c) epiderme separada do restante da pele.

Resultados e Discussão

4.1 Condições Analíticas

A definição das condições analíticas visou adotar método adequado aos objetivos do trabalho, para quantificação de nitrato de miconazol nas matrizes de trabalho, de modo que a validação não foi exaustiva, uma vez que não constituía objeto do projeto.

4.1.1 Seleção da fase móvel

As fases móveis testadas na coluna de fase reversa C18 estão descritas na tabela 4.1, assim como a fonte e o resultado obtido com cada uma delas.

Tabela 4.1 Fases móveis (FM) testadas para análise de nitrato de miconazol por CLAE

FM	Composição	Fonte	Tempo Retenção (min.)	Observação
1	MeOH : H ₂ O (40:60)	AKAY et al, 2002	Fármaco retido na coluna	
2	Acetato de amônio 0,2 N : MeOH : CH ₃ CN (20:40:40)	USP 27 - Ensaio para compostos relacionados	Fármaco retido na coluna	
3	KH ₂ PO ₄ 0,02M : MeOH : CH ₃ CN (20:40:40)	CRISTÁLIA, 2001 - Método para análise de isoconazol	4	Base estreita
4	H ₂ O : MeOH : CH ₃ CN (20:40:40)	Adaptação da condição 3	5,5	Base um pouco alargada
5	KH ₂ PO ₄ 0,02M : MeOH : CH ₃ CN (30:35:35)	Adaptação da condição 3	9,5	Base alargada
6	KH ₂ PO ₄ 0,02M : MeOH : CH ₃ CN (25:35:40)	Adaptação da condição 3	6,4	Base estreita

A fase móvel 3, KH_2PO_4 0,02M : MeOH : CH_3CN (20:40:40), foi escolhida por apresentar base mais estreita e menor tempo de retenção, o que possibilita um maior fluxo de análises no dia. A vazão da fase móvel foi ajustada em 1,2 mL/min.

As fases móveis 4, 5 e 6 foram testadas com o objetivo de promover maior retenção do MCZ, para possibilitar melhor resolução de possíveis interferentes de matrizes futuras, que não foram utilizadas no presente trabalho.

A figura 4.1 apresenta a eluição de soluções padrão de MCZ em três concentrações diferentes, preparadas como descrito em 3.2.1.2, com a fase móvel escolhida, onde é possível observar a boa simetria dos sinais.

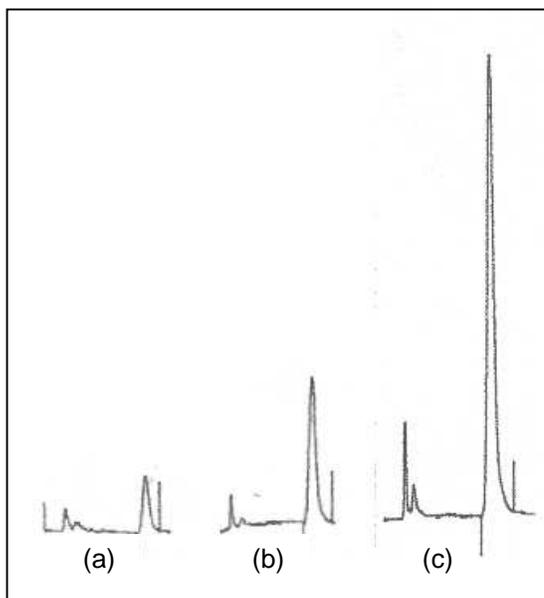


Figura 4.1 Eluição de 3 concentrações de MCZ com a fase móvel escolhida, KH_2PO_4 0,02M : MeOH : CH_3CN (20:40:40). Vazão de 1,2 mL/min, tempo de retenção de 4,0 min. (a) 2 $\mu\text{g/mL}$ (b) 5 $\mu\text{g/mL}$ (c) 10 $\mu\text{g/mL}$.

4.1.2 Curva padrão

Na Tabela 4.2. estão dispostas as respostas obtidas para as cinco concentrações de MCZ, preparadas em duplicata, em cada dia de análise e seus desvios padrão (DP) e desvios padrão relativos (DPR). A análise da regressão linear dos dados foi realizada e os parâmetros da curva: intercepto, inclinação, coeficiente de determinação e de correlação também estão apresentados nesta tabela.

Tabela 4.2 Respostas obtidas para as cinco concentrações de MCZ, preparadas em duplicata, em cada dia de análise, desvio padrão, desvio padrão relativo e parâmetros da curva.

Concentração (ug/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média ^a	DP ^a	DPR % ^a
1	58267	51782	54219	54820	3375	6,2
	56218	50167	58265			
2	89143	89267	88219	88500	1227	1,4
	88533	89617	86219			
5	224951	219863	210934	216896	9066	4,2
	222427	221969	201230			
10	459863	458167	453508	455548	6007	1,3
	463005	446299	452446			
20	879801	891952	875623	880484	10479	1,2
	879937	891556	864037			
Intercepto	9448	2926	4330			
Inclinação	43784	44491	43439			
valor P - intercepto	0,060	0,238	0,473			
Coef de determinação (r^2)	0,9996	0,9999	0,9986			
Coef. de correlação (r)	0,9998	0,9999	0,9993			

^a n = 6

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A legislação vigente recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes, e que o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99 (ANVISA, 2003).

Os coeficientes de correlação obtidos, apresentados na Tabela 4.2, foram adequados, demonstrando boa linearidade do método na faixa de 1 – 20 $\mu\text{g/mL}$ de MCZ.

A análise da regressão linear mostrou intercepto estatisticamente não diferente de zero para os três dias de análise, com nível de significância de 5% (valor de P do intercepto maior do que 0,05).

Com a linearidade comprovada pelo coeficiente de correlação próximo a 1 e pelo intercepto não significativo, nos dias sucessivos de análise, a curva foi preparada com apenas os três pontos intermediários e a regressão linear da curva foi estabelecida com o intercepto em zero.

A representação gráfica dos dados dispostos na Tabela 4.2 está apresentada na Figura 4.2. A média das respostas obtidas para as duas soluções preparadas em cada dia constituiu um ponto na curva.

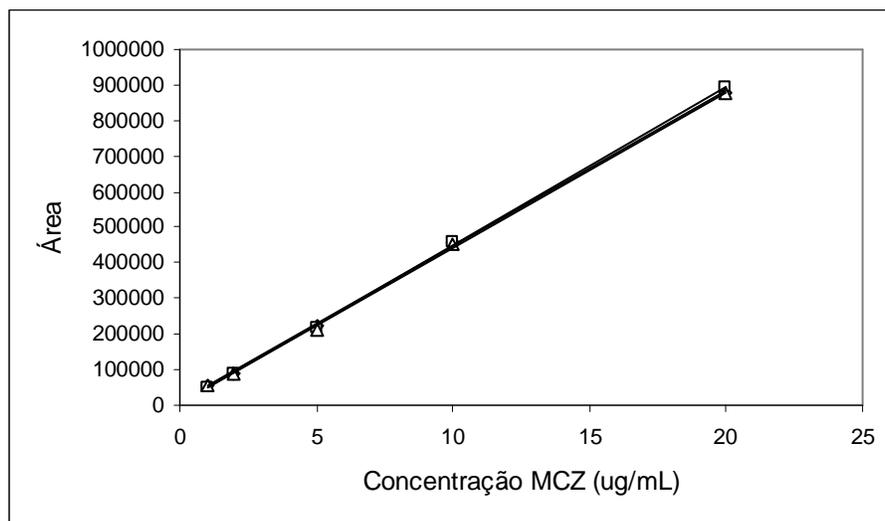


Figura 4.2 Representação gráfica de curvas padrão, obtidas por CLAE, em três dias diferentes.
◇ Dia 1, □ dia 2, △ dia 3.

A precisão de um método é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas repetidas e pode ser expressa como o desvio padrão ou o desvio padrão relativo (ANVISA, 2003). Os valores obtidos, avaliados nos 5 níveis da curva-padrão, foram satisfatórios, (< 5%, ANVISA, 2003), demonstrando boa precisão do método, com exceção da menor concentração da curva. Para cálculo do DP e do DPR, foram utilizadas as áreas, embora as concentrações teóricas não fossem exatamente as mesmas, uma vez que, a cada dia, uma nova solução mãe foi preparada, com uma massa de MCZ ligeiramente diferente (sempre próxima a 0,025 mg).

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Para o cálculo do LD e do LQ, foram utilizadas as equações descritas em 3.2.1.2, considerando a altura do ruído 0,25 cm (medido por 3 minutos) e a altura do pico correspondente à uma solução 2 µg/mL, 14,6 cm. Dessa forma, o LD calculado foi de 0,10 µg/mL e o LQ foi de 0,34 µg/mL

4.2 Liberação *In vitro* através de membrana sintética

Testes de liberação *in vitro* em células de difusão tipo Franz equipadas com membrana sintética têm sido propostos por diversos autores como ferramenta universal para monitoramento da uniformidade entre lotes de formulações semi-sólidas (ZATZ, 1995; GUY & HADGRAFT, 1990; SHAH *et al.*, 1991a).

Na determinação da liberação *in vitro* de MCZ a partir de três lotes das formulações semi-sólidas descritas no item 3.1.1.2 foram empregadas as membranas sintéticas de acetato de celulose e polissulfona. Essas membranas são amplamente empregadas em estudos de liberação *in vitro* e são recomendadas pelo FDA (U.S FDA/CDER, 1997) por atenderem exigências como não reagir com a formulação ou o meio receptor, serem permeáveis ao fármaco e não serem determinantes da taxa de liberação (SHAH *et al.*, 1998).

4.2.1 Definição da solução receptora (SR)

Na avaliação da liberação *in vitro* de produtos farmacêuticos contendo fármacos com baixa solubilidade em água, soluções receptoras contendo surfactantes ou solventes orgânicos podem ser necessárias para garantia de solubilidade adequada para manutenção da condição *sink*. O uso de surfactantes, entretanto, pode resultar em espuma com formação de bolhas de ar durante a agitação da solução receptora (SHAH *et al.*, 1989). Misturas hidroalcoólicas são recomendadas pelo FDA para uso como solução receptora no sistema de células bicompartimentais (CDER / U.S. FDA, 1997) e foram utilizadas no estudo da liberação *in vitro* de cetoconazol (FREITAS, 2005) e diclofenaco (KRIWET *et al.*, 1995), por exemplo.

A solubilidade determinada para o MCZ em uma solução de etanol 10%, à temperatura ambiente, após 4 horas de agitação, foi de 327 $\mu\text{g/mL}$. Estudos preliminares de liberação *in vitro* em células de difusão de Franz equipadas com membrana de acetato de celulose, no tempo máximo de 180 minutos, indicaram que as concentrações observadas de MCZ na solução receptora não ultrapassavam 10 $\mu\text{g/mL}$. Esse valor máximo de MCZ na SR foi confirmado posteriormente para as duas membranas em estudo (acetato de celulose e polissulfona) e para todas as formulações em teste, no período de tempo dos experimentos.

Considerando o valor máximo de MCZ que foi encontrado na SR e a concentração de saturação do mesmo em solução de etanol 10%, pode-se afirmar que a condição *sink* foi obedecida, ou seja, não ocorre aumento apreciável da concentração

de modo que ocasionasse redução no fluxo de difusão do fármaco do compartimento doador ao receptor.

A solução etanol 10% também obedece outras características recomendadas para emprego como solução receptora em estudos de liberação *in vitro*, como não alterar a composição da formulação por difusão inversa do meio receptor através da membrana e ser compatível com o método analítico empregado, possibilitando a injeção direta das amostras no sistema cromatográfico eleito para quantificação do fármaco (SHAH *et al.*, 1999).

4.2.2 Liberação *in vitro* de MCZ através de membrana de acetato de celulose

Na tabela 4.3 estão apresentadas as massas médias de MCZ encontradas em cada tempo de coleta de amostra de SR, normalizadas pela área de contato, para cada lote dos produtos A, B e C. O fluxo foi calculado por regressão linear e corresponde à inclinação dos pontos experimentais a partir do tempo de 60 minutos, assumindo-se que a partir deste ponto o equilíbrio de difusão já estaria alcançado.

Tabela 4.3 Massa de MCZ acumulada na SR de células de Franz equipadas com membrana de acetato de celulose normalizada pela área de difusão e desvios padrão de 6 células para 3 lotes diferentes dos produtos A, B e C.

Produto A			
Massa acumulada de MCZ / área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			
Tempo (min)	Lote 1	Lote 2	Lote 3
15,0	3,32 \pm 0,98	3,74 \pm 0,87	2,73 \pm 1,16
30,0	8,94 \pm 2,49	9,87 \pm 1,32	6,38 \pm 0,97
60,0	21,67 \pm 4,75	26,00 \pm 2,65	19,98 \pm 2,29
90,0	37,26 \pm 5,72	41,19 \pm 3,82	36,90 \pm 3,16
120,0	52,64 \pm 6,76	56,11 \pm 4,49	54,62 \pm 4,46
150,0	65,96 \pm 7,03	69,43 \pm 6,72	65,81 \pm 5,23
180,0	79,60 \pm 8,31	80,04 \pm 6,90	77,15 \pm 5,81
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$)	0,48 \pm 0,04	0,45 \pm 0,04	0,48 \pm 0,03
lag time (min)	13,3 \pm 9,2	-0,04 \pm 2,5	13,4 \pm 3,7

Produto B			
Massa acumulada de MCZ / área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			
Tempo (min)	Lote 1	Lote 2	Lote 3
15	1,83 \pm 0,23	1,97 \pm 0,73	2,50 \pm 0,97
30	5,42 \pm 0,89	4,80 \pm 1,95	5,41 \pm 1,26
60	15,35 \pm 1,92	11,50 \pm 3,12	11,48 \pm 2,87
90	25,61 \pm 2,89	19,13 \pm 6,26	20,54 \pm 3,71
120	35,20 \pm 3,62	27,73 \pm 8,87	30,54 \pm 5,73
150	46,66 \pm 4,76	35,96 \pm 10,23	40,54 \pm 7,60
180	56,81 \pm 5,97	47,44 \pm 12,63	49,92 \pm 9,75
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$)	0,35 \pm 0,03	0,30 \pm 0,08	0,32 \pm 0,06
lag time (min)	16,30 \pm 3,40	23,90 \pm 8,60	24,90 \pm 4,70

Produto C			
Massa acumulada de MCZ / área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			
Tempo (min)	Lote 1	Lote 2	Lote 3
15	0,56 \pm 0,34	0,54 \pm 0,17	0,98 \pm 0,30
30	1,96 \pm 0,46	1,72 \pm 1,22	2,24 \pm 0,87
60	4,84 \pm 0,69	3,82 \pm 0,74	5,95 \pm 1,19
90	7,24 \pm 0,90	6,22 \pm 1,34	10,47 \pm 1,30
120	12,38 \pm 1,14	12,44 \pm 3,15	17,42 \pm 2,79
150	17,13 \pm 2,51	15,32 \pm 2,68	23,16 \pm 3,67
180	23,01 \pm 3,05	21,51 \pm 4,09	31,48 \pm 4,72
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$)	0,15 \pm 0,02	0,15 \pm 0,03	0,21 \pm 0,04
lag time (min)	35,8 \pm 3,5	40,1 \pm 4,3	35,4 \pm 9,6

Na Figura 4.3 observa-se a representação gráfica dos resultados expressos na Tabela 4.3.

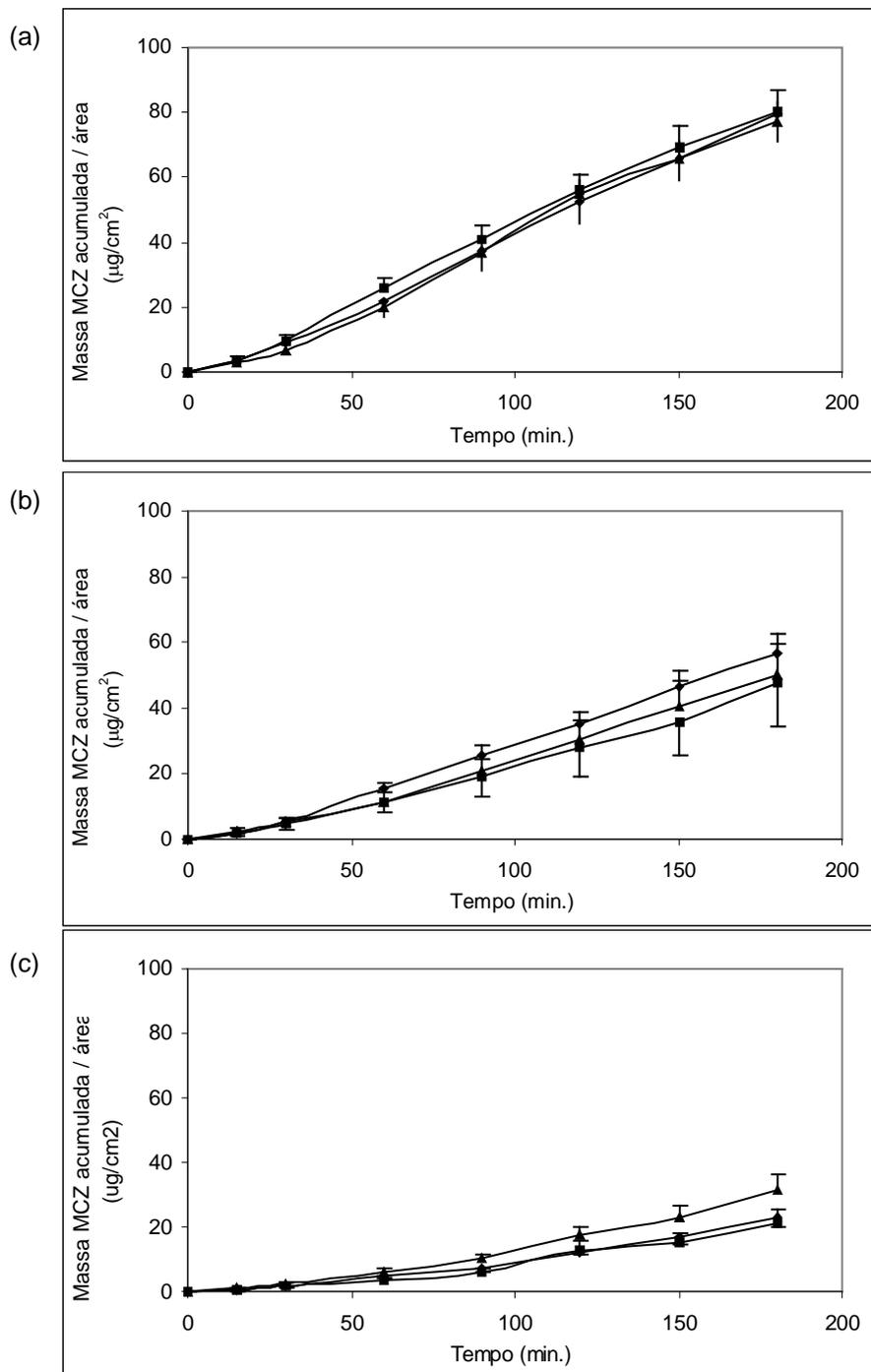


Figura 4.3 Massa de MCZ acumulada na SR de células de Franz equipadas com membrana de acetato de celulose normalizada pela área de contato em função do tempo.

(a) Produto A (b) produto B (c) produto C. ♦ Lote 1, ■ Lote 2, ▲ Lote3. As barras verticais indicam o desvio padrão de 6 células.

Nos gráficos apresentados na Figura 4.3 é possível observar que após pequeno *lag time*, o perfil de liberação permaneceu linear com o tempo (EE).

O *lag time* pode ser definido como o tempo necessário para que o sistema entre em equilíbrio e foi calculado por extrapolação da reta de regressão linear até o eixo do tempo (exemplificado na Figura 4.4). Os resultados estão dispostos na Tabela 4.3 (ZATZ, 1993).

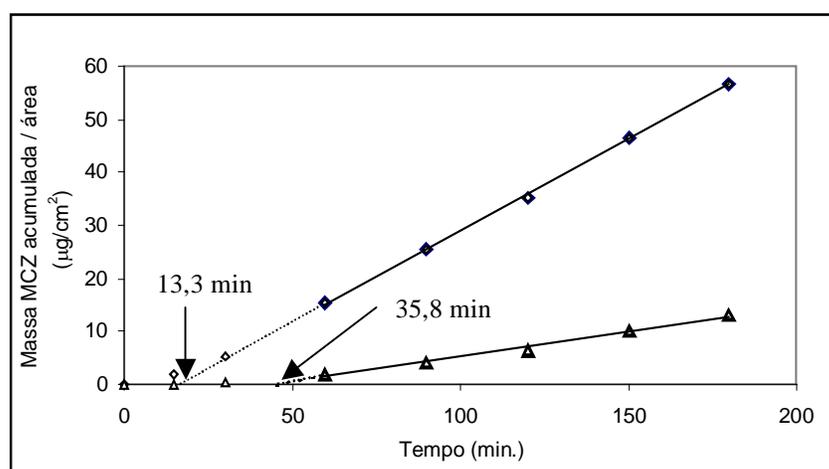


Figura 4.4. Exemplificação do cálculo do *lag time*. A linha cheia representa a regressão linear dos 5 últimos pontos e a linha tracejada representa a extrapolação até o eixo x. Produto A, lote 1 (◇) e produto C, lote 1 (△).

Em geral, o produto A foi o que apresentou um menor *lag time*, enquanto o produto C foi o que necessitou de aproximadamente o triplo do tempo para o estabelecimento do equilíbrio de difusão do MCZ e alcance de uma taxa constante de liberação do fármaco da formulação, a qual, por sua vez, foi a menor quando comparada com os fluxos fornecidos pelos demais produtos.

Para as três formulações o desvio padrão entre as seis células de cada experimento foi adequado, indicando boa precisão do método, ou seja, baixa variabilidade entre as réplicas dos ensaios de liberação.

A boa linearidade observada para os últimos 5 pontos das curvas foi confirmada pelos coeficientes de correlação apresentados na Tabela 4.4 e é garantia de que a taxa de liberação foi constante a partir de 60 minutos, para todos os produtos. Em 1990, Guy e Hadgraft, baseados em estudo publicado por Higuchi (1962), propuseram que o tratamento dos dados de estudos de liberação *in vitro* deveria compreender a adoção de função com base na raiz quadrada do tempo (pontos experimentais dispersos em gráfico de massa de fármaco liberada em função da raiz quadrada do tempo). Segundo os autores, esse procedimento seria necessário para uma linearização dos dados (HIGUCHI, 1962; GUY & HADGRAFT, 1990). No entanto, com pôde ser observado na Tabela 4.4, os resultados obtidos demonstraram boa linearidade para o fluxo, dispensando o modelo de Higuchi para o tratamento dos dados.

Tabela 4.4 Coeficientes de correlação (r) observados a partir de 60 minutos.

	Coeficiente de correlação (r)		
	Produto A	Produto B	Produto C
Lote 1	0,9993	0,9997	0,9956
Lote 2	0,9976	0,9970	0,9911
Lote 3	0,9975	0,9999	0,9999

A análise visual dos gráficos apresentados na figura 4.3 sugere que os perfis de liberação dos três lotes do produto A e do lote B são bastante semelhantes. Para o

produto C, foi possível observar um comportamento diferente do lote 3 em relação à liberação de MCZ.

A comparação entre os fluxos obtidos para os três lotes de cada produto foi feita por análise da variância, ANOVA com um fator. Este método estatístico compara todas as médias (fluxos) em um único teste e visa identificar a existência de ao menos uma diferença entre grupos, se existir alguma. Caso o resultado seja estatisticamente significativo, aplica-se posteriormente uma das várias técnicas existentes de comparação múltiplas entre as médias. Com isso, é possível identificar quais as populações diferentes entre si, mantendo controlado o nível de significância do teste (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

Para os produtos A e B, não houve diferença estatística entre os lotes estudados, para um nível de significância de 5% (o valor de P para o produto A foi de 0,417 e para o produto B foi de 0,392). No entanto, para o produto C, foi detectada uma diferença significativa entre os lotes ($P=0,009$). O teste de Student-Newman-Keuls (SNK) foi realizado, identificando o lote 3 como diferente dos demais. Essa diferença é indicativa de falta de homogeneidade entre os lotes do produto. De um modo geral, formas farmacêuticas semi-sólidas são formulações complexas, e suas propriedades físico-químicas, de liberação e de penetração dependem de vários fatores, entre os quais a granulometria das partículas dispersas, a tensão interfacial entre as fases, o coeficiente de partição da molécula ativa entre as fases e as características reológicas do produto. No processo de fabricação, os pontos críticos são a separação inicial de um sistema de uma fase em duas fases e o momento em que o componente ativo é adicionado.

(U.S.FDA/CDER, 1997). Qualquer alteração em um desses fatores pode resultar em uma mudança nas propriedades da formulação, resultando em uma liberação diferenciada. Alterações na qualidade dos insumos (diversos fornecedores) ou mesmo na composição qualitativa das formulações podem ser evidenciadas em estudos de liberação *in vitro* de semi-sólidos.

O teste de liberação *in vitro* não é indicado para avaliação de bioequivalência entre formulações dermatológicas de diferentes fabricantes (U.S.FDA/CDER, 1997). Isso por que uma maior quantidade de fármaco liberado pela formulação nos experimentos *in vitro* não é garantia de maior disponibilidade de fármaco no local de ação, face às particularidades da penetração cutânea de fármacos de produtos semi-sólidos. As características de penetração de cada formulação irão ditar a quantidade de fármaco presente em cada camada de pele.

No entanto, os valores de fluxo obtidos para liberação de MCZ a partir dos produtos A, B e C através de membrana sintética de acetato de celulose permitem algumas conclusões úteis na avaliação das formulações semi-sólidas.

O produto A possui veículo que possibilita aproximadamente 2 vezes maior partição do MCZ para o meio receptor utilizado, quando comparado aos produtos B e C, respectivamente. Se esse mesmo comportamento ocorrer *in vivo*, pode-se extrapolar que uma maior quantidade de nitrato de miconazol estará disponível para a penetração na pele em um menor tempo a partir do produto A. Para o produto C, a maior afinidade do MCZ pelo veículo resulta em menos de um terço da quantidade liberada pelo produto A, no tempo máximo do experimento (180 minutos).

Uma possível explicação para a diferença de comportamento dos produtos é a presença de propilenoglicol na composição dos produtos B e C (tabela 3.1), que pode acarretar maior solubilidade do fármaco no veículo. Quando a solubilidade do fármaco na base é aumentada pela adição de propilenoglicol, seu coeficiente de partição em relação ao compartimento receptor é reduzido, diminuindo o fluxo (FLORENCE & ATTWOOD, 2003). O produto A, que não possui propilenoglicol em sua composição, apresenta maior atividade termodinâmica, e portanto, maior liberação *in vitro*.

4.2.3 Liberação *in vitro* de MCZ através de membrana de polissulfona

As massas de MCZ encontradas na SR nas células de Franz, equipadas com membrana sintética de polissulfona, normalizadas pela área de contato, em função do tempo estão dispostas na tabela 4.5. O fluxo e o *lag time* foram calculados conforme exposto no item 4.2.2.

Tabela 4.5 Resultados obtidos no estudo de liberação *in vitro* através de membrana de polissulfona das formulações A, B e C. Massa acumulada de MCZ na SR normalizada pela área de contato em função do tempo \pm desvio padrão de 3 células.

Produto A						
Tempo (min)	Massa acumulada de MCZ / área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)					
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
15,0	2,79	\pm 0,52	5,63	\pm 4,14	2,39	\pm 0,41
30,0	10,08	\pm 1,06	11,72	\pm 4,60	7,66	\pm 1,67
60,0	23,86	\pm 2,64	25,50	\pm 5,13	21,89	\pm 0,75
90,0	37,72	\pm 2,18	36,15	\pm 3,27	36,62	\pm 2,29
120,0	52,79	\pm 4,00	48,02	\pm 3,71	49,44	\pm 5,71
150,0	62,07	\pm 5,70	57,59	\pm 3,23	61,89	\pm 9,26
180,0	74,45	\pm 6,02	68,64	\pm 6,38	69,88	\pm 8,50
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min.}$)	0,42	\pm 0,04	0,36	\pm 0,06	0,40	\pm 0,08
lag time (min.)	0,1	3,4	-14,1	24,8	0,1	9,9

Produto B						
Tempo (min)	Massa acumulada de MCZ / área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)					
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
15	4,24	\pm 2,66	3,77	\pm 2,63	3,62	\pm 0,19
30	8,20	\pm 3,70	8,20	\pm 2,51	11,21	\pm 0,27
60	17,43	\pm 3,66	18,14	\pm 1,51	22,10	\pm 1,47
90	26,84	\pm 1,97	29,19	\pm 2,97	35,94	\pm 1,88
120	36,56	\pm 3,34	42,21	\pm 6,71	49,95	\pm 2,65
150	47,14	\pm 3,68	52,39	\pm 9,18	64,44	\pm 0,57
180	56,52	\pm 3,86	66,14	\pm 11,40	77,44	\pm 0,89
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min.}$)	0,33	\pm 0,04	0,40	\pm 0,09	0,46	\pm 0,01
lag time (min.)	6,6	\pm 12,4	14,2	\pm 7,5	12,2	\pm 4,2

Produto C						
Tempo (min)	Massa acumulada de MCZ / área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)					
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
15	0,00	\pm 0,00	0,33	\pm 0,12	0,12	\pm 0,12
30	0,47	\pm 0,41	0,68	\pm 0,14	0,71	\pm 0,10
60	1,85	\pm 0,60	1,60	\pm 0,48	2,59	\pm 0,52
90	4,07	\pm 1,35	4,87	\pm 0,95	7,00	\pm 0,64
120	6,51	\pm 1,23	7,37	\pm 1,29	16,08	\pm 3,19
150	10,27	\pm 2,41	10,18	\pm 1,97	19,26	\pm 4,05
180	13,01	\pm 2,65	15,18	\pm 1,27	26,49	\pm 4,15
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min.}$)	0,10	\pm 0,02	0,11	\pm 0,02	0,20	\pm 0,04
lag time (min.)	45,3	\pm 3,6	47,2	\pm 7,9	50,3	\pm 4,1

A representação gráfica dos resultados expressos na tabela 4.6 está apresentada na Figura 4.5.

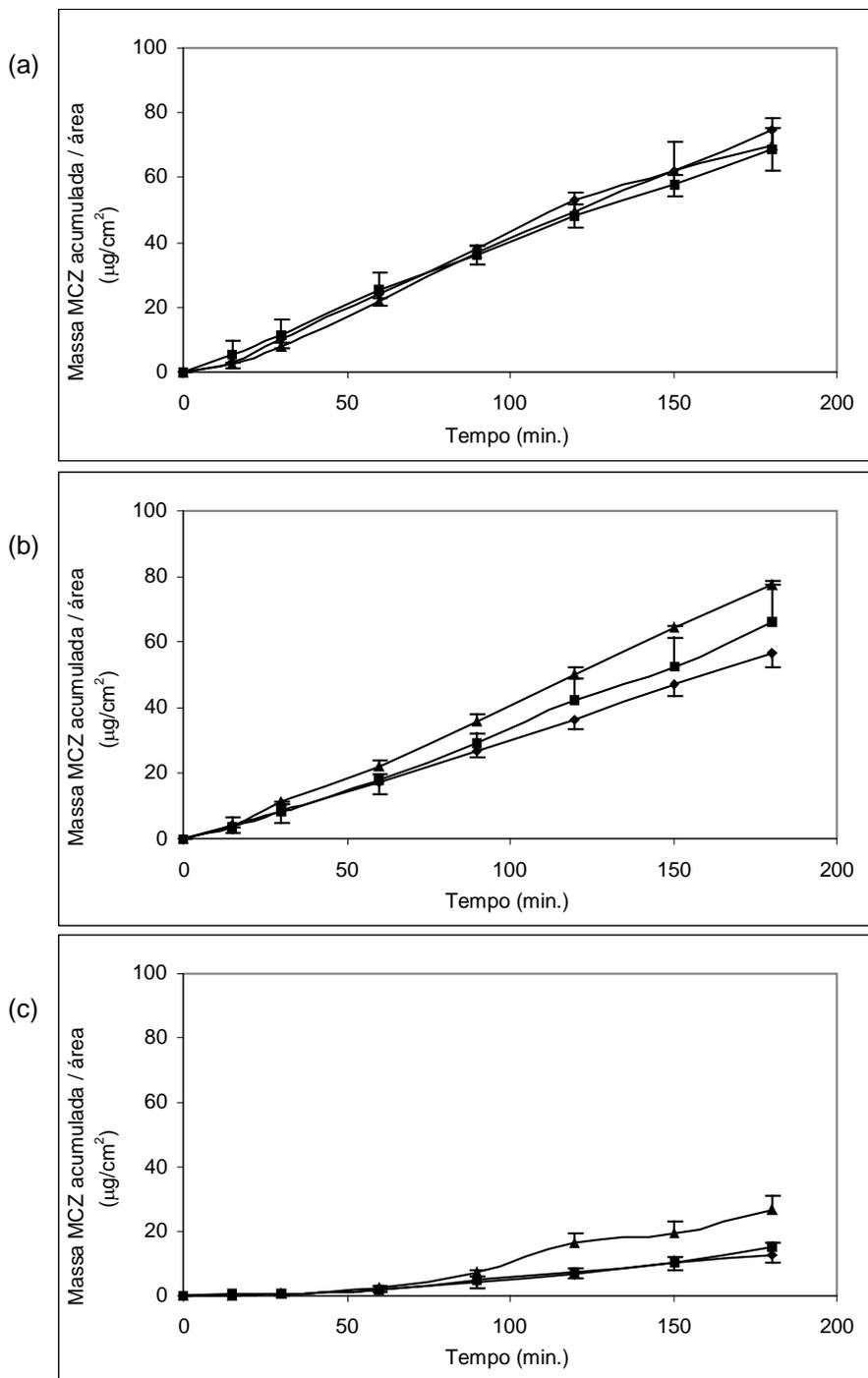


Figura 4.5 Massa de MCZ acumulada na SR de células de Franz equipadas com membrana de polissulfona normalizada pela área de contato em função do tempo. (a) Produto A (b) produto B (c) produto C. ♦ Lote 1, ■ Lote 2, ▲ Lote3. As barras verticais indicam o desvio padrão de 3 células.

Assim como para a membrana de acetato de celulose, foi observada boa linearidade dos dados para os últimos 5 pontos, confirmando taxa de liberação constante de MCZ. Os valores dos coeficientes de correlação estão apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.6 Coeficientes de correlação observados para os três lotes dos produtos A, B e C no estudo com membrana de polissulfona

	Coeficiente de correlação (r)		
	Produto A	Produto B	Produto C
Lote 1	0,9963	0,9959	0,9994
Lote 2	0,9973	0,9946	0,9923
Lote 3	0,9983	0,9985	0,9991

Como é possível observar na figura 4.6, os perfis dos três lotes das formulações A e B são bastante semelhantes, embora o produto B evidencie maior dispersão nos resultados. No entanto, assim como o observado no experimento com membrana de acetato de celulose, o lote 3 do produto C apresentou comportamento um pouco diferente dos demais lotes em relação à liberação de MCZ, principalmente a partir de 60 minutos.

O teste estatístico ANOVA com um fator foi realizado para comparação dos fluxos obtidos. Não foi detectada diferença estatística entre os lotes dos produtos A e B, com um α de 5% ($P= 0,452$ e $0,065$; respectivamente). Para o produto C, foi apontada uma diferença entre os três lotes estudados ($P= 0,009$), e o teste de SNK indicou que o lote 3 diferia dos demais.

Na comparação entre os produtos, foi verificado que os produtos A e B apresentaram valores de fluxo e quantidade máxima de MCZ encontrada na SR bastante próximos. O produto C foi o que apresentou menores fluxos e menores quantidades de fármaco na SR.

4.2.4 Comparação entre os resultados obtidos com membrana acetato de celulose e polissulfona

A análise dos valores de fluxo e *lag time* obtidos com os três lotes de cada formulação nos estudos com as duas membranas está apresentada na Figura 4.6.

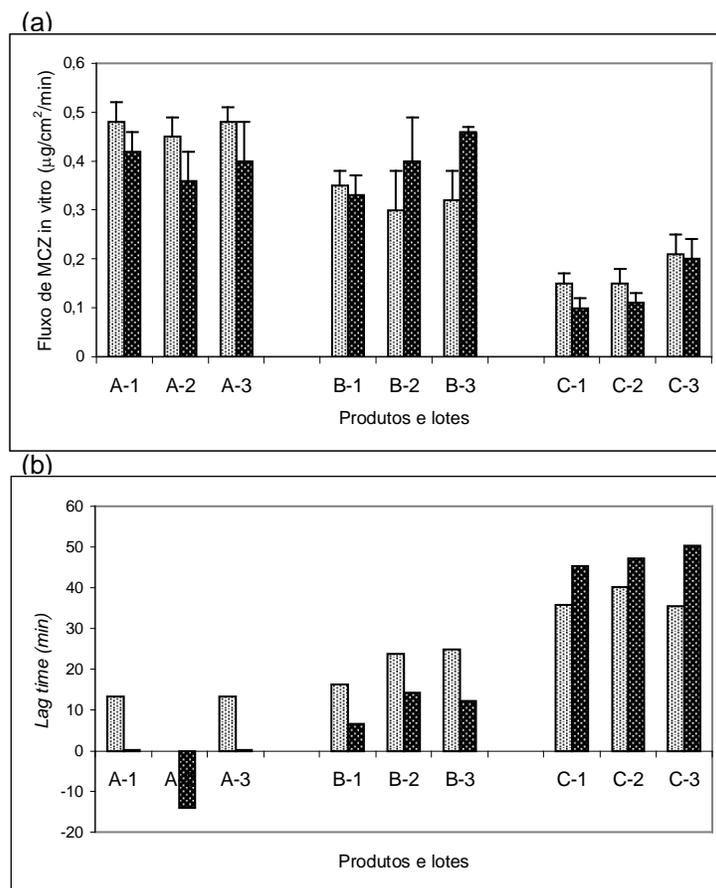


Figura 4.6 Comparação dos valores de fluxo (a) e *lag time* (b) obtidos com membrana de acetato de celulose (barras claras) e de polissulfona (barras escuras).

Os valores de *lag time* obtidos com a membrana de acetato de celulose para os produtos A e B foram consideravelmente superiores aos obtidos com a membrana de polissulfona. No entanto, para o produto C, a membrana de acetato de celulose proporcionou um menor tempo para estabelecimento do equilíbrio.

A análise estatística dos valores médios de fluxo e de *lag time* obtidos com as duas membranas foi realizada pelo teste *t* pareado. Uma vez que a mesma formulação

foi avaliada por dois tratamentos distintos (duas membranas), o pareamento é o indicado por aumentar a eficiência do teste, tornando-o mais sensível a diferenças pequenas entre os tratamentos.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as membranas de acetato de celulose e polissulfona quanto aos valores de fluxo e de *lag time* obtidos para os três lotes dos produtos A, B e C ($P= 0,645$ para os fluxo e $P= 0,426$ para o *lag time*). As membranas foram consideradas estatisticamente iguais para um nível de significância de 5%.

Membranas utilizadas em estudos de liberação possuem poros que são preenchidos com meio receptor de forma que a passagem do fármaco para a solução receptora envolve partição entre a formulação semi-sólida e o meio líquido, em contato devido aos poros (ZATZ, 1995).

Em 1989, Shah e colaboradores investigaram a liberação *in vitro* de hidrocortisona a partir de formulação semi-sólida (creme) com cinco membranas hidrofílicas: membrana de acetato de celulose pura, acetato de celulose com agente molhante (triton), polissulfona, fibra de vidro e membrana silática, e concluíram que o fluxo não foi influenciado pelo tipo de membrana utilizado, exceto para a membrana de fibra de vidro (SHAH *et al.*, 1989).

Em outro trabalho, Shah e colaboradores (1999) avaliaram diferentes parâmetros que poderiam influenciar a liberação *in vitro* de alguns glicocorticóides. Seus estudos indicaram que os fluxos obtidos com membrana de acetato/nitrato de celulose e com membrana de polissulfona foram praticamente os mesmos. Além disso, três diferentes lotes de polissulfona foram testados, e foi observada baixa variabilidade inter e intra-lotes. Os autores concluíram que as características das membranas de modo geral não

contribuem para o fluxo de liberação de fármacos de formulações tópicas, desde que haja porosidade suficiente para criar um microambiente de contato entre formulação e meio receptor (SHAH *et al.*; 1999).

Dessa forma, os fatores físicos que influenciam da cinética do processo de liberação incluem a espessura e porosidade da membrana, a viscosidade do meio receptor e o coeficiente de partição meio receptor/semi-sólido.

Visto que as membranas de acetato de celulose e de polissulfona possuem espessuras e tamanhos de poro semelhantes (item 3.1.2), a observação de que as membranas foram estatisticamente iguais ($\alpha = 0,05$) quanto à liberação de MCZ a partir das formulações semi-sólidas estudadas, mostrou-se coerente com a premissa proposta por estudos anteriores.

4.3 Penetração e permeação cutânea em pele animal

Para os estudos de penetração e permeação de MCZ em pele suína a partir de formulações semi-sólidas foram selecionados o lote 1 do produto A, que foi denominado A1 e o lote 1 do produto B (B1), uma vez que os três lotes de cada formulação foram considerados estatisticamente iguais quanto à liberação de MCZ. Para o produto C foram selecionados o lote 1, (C1) e também o lote 3 (C3), que apresentou uma liberação do fármaco diferente da observada para os demais.

4.3.1 Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação de MCZ na epiderme e na derme de pele suína.

A avaliação da recuperação de MCZ adicionado à segmentos de epiderme e derme suína foi feita por meio da comparação das respostas obtidas nas amostras e nas *spiked solutions* correspondentes a cada nível de massa de MCZ total adicionada. O resultado foi expresso em porcentagem de MCZ recuperada e está apresentado na tabela 4.7.

Tabela 4.7 Porcentagem média de recuperação de MCZ em epiderme e derme suína para quatro níveis do fármaco e seus desvios padrão (n=3).

Nível MCZ (μg)	% de Recuperação de MCZ	
	Epiderme	Derme
3	91,5 \pm 3,7	87,4 \pm 2,4
7,5	109,2 \pm 1,3	87,2 \pm 8,2
12	100,9 \pm 1,9	97,1 \pm 2,0
15	98,6 \pm 5,8	87,2 \pm 5,0

As taxas de recuperação foram bastante satisfatórias, ainda que, no geral, a recuperação na epiderme foi maior do que na derme, face ao maior volume dessa camada e a não homogeneização dos tecidos, o que acarreta em maior dificuldade da solução extratora alcançar o fármaco no interior do mesmo.

Os desvios padrão entre os três experimentos realizados para cada nível também foram considerados aceitáveis para o método bioanalítico (< 15%, SHAH *et al.*, 1992; ANVISA, 2003), caracterizando adequada precisão do mesmo para os objetivos do estudo.

A figura 4.7 apresenta os cromatogramas obtidos para a solução extratora (SE) da epiderme e da derme sem adição de MCZ e para as soluções extratoras com adição do fármaco, resultando em aproximadamente 5 µg/mL. As setas indicam a ausência de sinais interferentes no tempo de retenção do MCZ, que foi de 4,8 minutos.

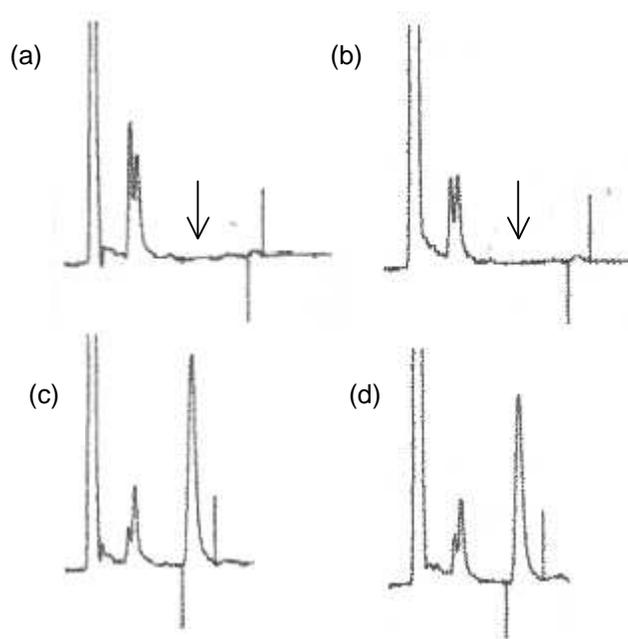


Figura 4.7 Cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade para o método de extração de MCZ de epiderme e derme suína. (a) branco da epiderme (b) branco derme (c) Epiderme adicionada de MCZ. (d) Derme adicionada de MCZ. As setas indicam ausência de sinal no tempo correspondente ao MCZ (4,8 minutos).

Dessa forma, o método desenvolvido para extração de MCZ das camadas de pele suína, utilizando a fase móvel KH_2PO_4 0,02M : MeOH : CH_3CN (20:40:40) como solução extratora, agitação em Vortex e sonicação se mostrou exato, preciso e seletivo e, portanto, adequado para o emprego em estudos de penetração cutânea.

4.3.2 Avaliação do método de separação epiderme-derme

Com o objetivo de avaliar o método de separação epiderme-derme, as massas das camadas de tecido obtidas em cada experimento (total de 32), para uma área de $1,76 \text{ cm}^2$, foram reunidas e o desvio padrão foi calculado (Figura 4.8). As massas obtidas após 2 e 4 horas de contato com a solução receptora foram analisadas em separado, a fim de avaliar a influência do tempo de contato com a solução receptora (KH_2PO_4 0,02 M) na separação das camadas.

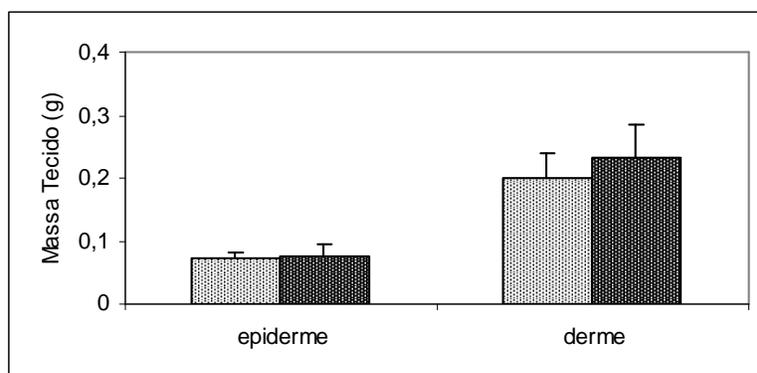


Figura 4.8 Massas de epiderme e derme separadas após 2 (barras claras) e 4 horas (barras escuras) de contato com a solução receptora em célula de Franz, para uma área de $1,76 \text{ cm}^2$ e seus desvios padrão. $n = 32$.

As massas de derme foram cerca de três vezes superiores as massas de epiderme, por se tratar de uma camada mais espessa.

O baixo desvio entre as massas de epiderme obtidas é indicativo que o método de separação foi uniforme, além de evidenciar boa homogeneidade entre os tecidos cutâneos seccionados. Baseados nesses resultados, podemos supor que toda a epiderme foi separada da derme em todos os experimentos. A variabilidade observada é devida, provavelmente, apenas a pequenas diferenças nas espessuras das camadas de epiderme de cada segmento de pele proveniente de diferentes animais. Já o baixo desvio padrão observado para as massas de derme indica que a retirada da gordura subcutânea foi uniforme.

O teste *t* de Student foi realizado para verificar se houve diferença na massa de epiderme obtida na separação após 2 e 4 horas de contato com a solução receptora. Não foi detectada diferença estatística com um nível de significância de 5% entre os tempos de experimento, levando à conclusão de que a separação da epiderme e derme não foi influenciada pelo tempo de contato com a solução receptora.

4.3.3 Penetração de MCZ em epiderme e derme suína.

As massas absolutas de MCZ extraídas da epiderme e derme suína após 2 e 4 horas de contato da formulação com a pele, em uma área de 1,76 cm², estão expostas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 Massas de MCZ obtidas na epiderme e derme suína em uma área de 1,76 cm², após 2 e 4 horas de contato com a formulação.

2 horas

n	Quantidade MCZ Epiderme (µg)				Quantidade MCZ Derme (µg)			
	A1	B1	C1	C3	A1	B1	C1	C3
1	4,0	4,7	18,1	29,6	2,9	10,9	8,8	7,8
2	4,2	3,6	7,3	25,8	6,1	9,5	11,7	6,6
3	9,0	10,3	5,1	16,2	7,4	8,5	8,3	7,0
4	7,5	3,9	8,7	18,5	6,8	5,0	8,7	7,2
5	1,8	3,4	13,1	22,5	4,2	3,4	2,7	10,7
6	1,7	4,2	13,8	5,3	6,8	5,5	12,4	6,3
7	2,3	3,2	8,5	9,3	5,4	4,2	6,1	12,0
8	3,9	9,5	9,4	16,4	8,6	8,0	10,9	17,7
Média	4,3	5,4	10,5	17,9	6,0	6,9	8,7	9,4
DP	2,7	2,9	4,2	8,1	1,8	2,7	3,2	3,9

4 horas

n	Quantidade MCZ Epiderme (µg)				Quantidade MCZ Derme (µg)			
	A1	B1	C1	C3	A1	B1	C1	C3
1	1,8	18,4	9,2		1,5	9,3	6,9	6,5
2	2,6	5,6	16,5	10,5	2,2	3,7	9,1	4,6
3	5,4	20,0	11,0	9,2	3,2	12,4	6,4	8,8
4	2,6	17,6	8,9	6,8	2,2	9,1	6,9	9,4
5	2,2	8,4	16,9	6,5	3,1	7,2	3,9	3,4
6	4,9	11,0	11,3	8,5	3,8	14,9	6,3	2,3
7	3,2	7,5	17,1	11,2	1,8	3,8	5,2	3,9
8	4,6	5,3	14,5	10,2	1,9	4,7	6,1	5,4
Média	3,4	11,7	13,2	9,0	2,5	8,1	6,3	5,5
DP	1,4	6,1	3,5	1,8	0,8	4,1	1,5	2,5

A representação gráfica dos resultados apresentados na Tabela 4.10 está na Figura 4.9. Também estão apresentados os resultados das massas de MCZ normalizadas por grama de tecido em cada experimento.

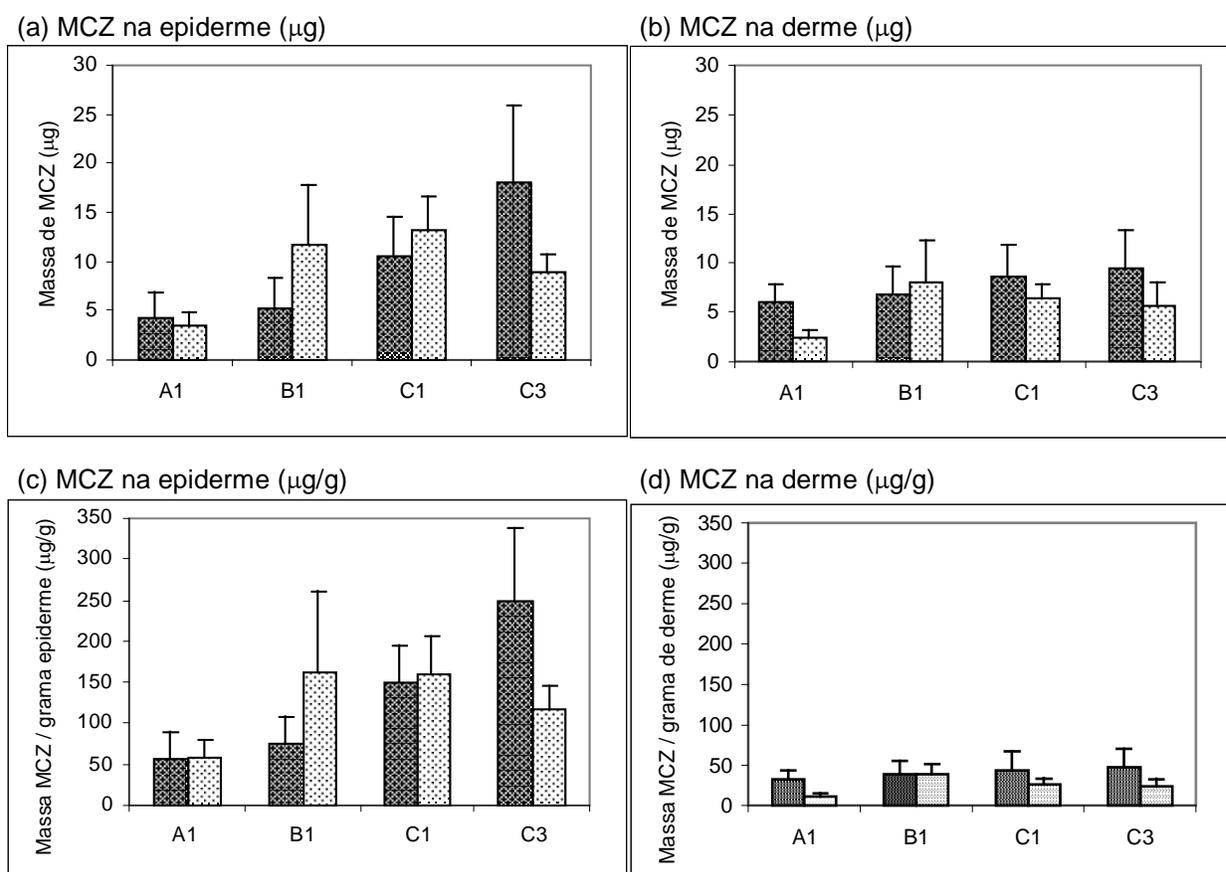


Figura 4.9 Massas absolutas de MCZ extraídas da epiderme (a) e derme (b) após 2 horas (barras escuras) e 4 horas (barras claras) de contato das formulações com a pele, em uma área de $1,76 \text{ cm}^2$. Massas de MCZ normalizadas por grama de tecido estão apresentadas em (c) epiderme (d) derme.

Analisando a Figura 4.9 foi possível concluir que, no geral, uma maior quantidade de MCZ foi detectada na epiderme do que na derme para os dois tempos de experimentos. A diferença é ainda maior quando a quantidade de MCZ é normalizada pela massa de tecido submetida à extração. Como era de se esperar, a normalização

pela massa de tecido não levou a alterações nos perfis de penetração, já que as massas de epiderme e derme analisadas em cada experimento foram razoavelmente constantes (item 4.3.2).

Quanto ao tempo de contato das formulações com a pele *ex-vivo*, na análise estatística dos dados, as massas de MCZ absolutas obtidas nos dois tempos estudados tanto para a formulação A1 quanto para C1, na epiderme, foram consideradas iguais para um α de 5% (teste t). Para o produto B1 foi observado um aumento da quantidade de MCZ com o tempo de contato e para o produto C3, foi observada maior quantidade de MCZ no experimento de 2 horas.

Na derme, para as formulações B1 e C1 não foram detectadas diferenças entre os dois tempos ($\alpha=5\%$). Já para as formulações A1 e C3 foi observado um decréscimo na quantidade de MCZ com o aumento do tempo de contato entre a formulação e a pele.

Concluiu-se que não houve um padrão de crescimento constante da quantidade de MCZ detectada na pele com o tempo de contato com a formulação. De fato, para as formulações A1 e C3, as quantidades obtidas em 2 horas foram maiores do que as obtidas em 4 horas. Isso pode ser creditado a variações das características de penetração dos segmentos de pele utilizados em cada experimento. Por se tratar de um tecido *ex-vivo*, essa variação é esperada. Apesar de utilizarmos suínos com a mesma precedência, com idades e tamanhos semelhantes, existe uma variação das características da pele entre os indivíduos. Além disso, o tempo de armazenagem também pode ser outra fonte de variação. O experimento de 2 horas para a formulação C3 foi realizado com um segmento de pele que estava congelado há 45 dias, enquanto

os demais experimentos foram realizados até 30 dias após obtenção da pele. É possível que esse maior tempo de armazenagem, mesmo que ainda incluído no prazo estipulado (60 dias), tenha contribuído para o resultado anômalo observado para essa formulação.

Quanto aos diferentes produtos, as massas de MCZ capazes de penetrar nas camadas de pele, a partir das formulações em estudo, foram comparadas pelo teste estatístico ANOVA com um fator e quando detectada alguma diferença, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5%.

Na epiderme, após 2 horas de contato das formulações com a pele, os resultados obtidos com as formulações A1 e B1 foram considerados iguais. Observou-se uma maior penetração de MCZ, na epiderme, a partir da formulação C3, seguida da formulação C1 e finalmente das formulações A1 e B1. Já na derme, os resultados foram considerados estatisticamente iguais para as quatro formulações.

Na série de experimentos realizados por 4 horas, a formulação A1 foi considerada diferente das demais quanto à massa de MCZ determinada tanto na epiderme quanto na derme (ver figura 4.8, barras claras nos gráficos (a) e (b)). As formulações B1, C1 e C3 foram consideradas iguais entre si, e apresentaram uma maior quantidade de MCZ em ambos os tecidos quando comparadas com a formulação A1.

De forma geral, a formulação A1 foi a que resultou em menores quantidades de MCZ nas camadas da pele. A principal diferença entre as formulações A, B e C é a presença de propilenoglicol nas formulações B e C. Esse excipiente pode ter ação como promotor de penetração nas doses usualmente utilizadas em produtos dermatológicos (TROTTEY *et al.*, 2004). O mecanismo da ação proposto seria a sua entrada no EC e aumento da solubilidade do penetrante, com conseqüente aumento do fluxo da passagem através do tecido (MOSER *et al.*, 2001). Dessa forma, o propilenoglicol pode ser o responsável pela maior penetração de MCZ a partir das formulações B e C. A ação promotora da penetração do propilenoglicol já foi demonstrada para outros fármacos, como ibuprofeno (IRWIN *et al.*, 1990) e metronidazol (WOTTON *et al.*, 1985).

O produto B, registrado como genérico na ANVISA apresentou comportamento diferente do medicamento referência (produto A), nas condições do presente estudo. Segundo a legislação brasileira, o produto genérico deve conter excipientes qualitativamente de mesma função. Entretanto, vários excipientes utilizados podem apresentar mais de uma função. No caso do propilenoglicol, ele pode ter entrado na formulação B categorizado como veículo, no entanto, apresenta também função de promotor de penetração, causando as diferenças observadas entre o produto referência e o genérico. Podemos concluir que os critérios para aceitação de um produto dermatológico como genérico, adotados atualmente, permitem que formulações possivelmente não bioequivalentes mantenham relação de referência/genérico.

Na comparação dos dois lotes da formulação C (C1 e C3), não foram observadas diferenças na penetração dos dois lotes na epiderme, em quatro horas, nem na derme.

Entretanto, foi observada uma maior penetração de MCZ na epiderme após duas horas de contato da formulação C3 com a pele, sendo as supostas razões já comentadas acima. No teste de liberação *in vitro*, o lote 3 apresentou comportamento distinto dos demais, resultando em uma maior liberação de MCZ através das duas membranas sintéticas testadas (4.2.2 e 4.2.3). No entanto, essa diferença não pôde ser confirmada nos estudos *ex-vivo* realizados.

Os resultados obtidos para a penetração de MCZ em epiderme e derme suína, em ensaios *in vitro* (*ex-vivo*) a partir dos três produtos em estudo poderiam sugerir que a biodisponibilidade do fármaco após administração do produto A seria menor do que com os produtos B e C quando aplicados em humanos. O teste *in vitro*, no entanto não é considerado conclusivo quanto à biodisponibilidade e bioequivalência de produtos tópicos, sendo o teste do tape-stripping em voluntários, a proposta mais defendida por alguns pesquisadores para determinação de BD/DE (US. FDA/CDER, 1998; SHAH *et al.*, 1998; PERSHING *et al.*, 2003).

Ao traçar um paralelo com os resultados de liberação *in vitro*, observou-se que o produto com maior liberação de MCZ não foi aquele que propiciou maior penetração nas camadas da pele.

A liberação do fármaco do veículo que o contém é prerrogativa para a penetração na pele. O fármaco deve estar disponível na superfície da pele para que haja difusão através do estrato córneo. As principais características da formulação que irão governar essa etapa são a solubilidade do fármaco no veículo e a atividade termodinâmica. Entretanto, uma vez disponível para penetração na superfície da pele, a

penetração e permeação irão depender da capacidade do fármaco de atravessar a camada córnea da pele, e de características como lipofilicidade e tamanho da molécula, além de modulação da formulação por meio da adição de promotores de penetração.

4.3.4 Permeação de MCZ através de pele suína

Na avaliação da possível permeação cutânea de MCZ, observou-se que em apenas algumas células quantidade detectável de MCZ foi capaz de atravessar todas as camadas da pele e atingir o tampão receptor (TR), após 2 e 4 horas de contato das formulações com a pele suína. Na maioria dos casos, a quantidade de MCZ encontrada no tampão receptor foi menor do que o limite de quantificação estabelecido para o método cromatográfico (0,34 $\mu\text{g/mL}$). Na Tabela 4.9 está apresentado o número de células que apresentaram MCZ no tampão receptor, das oito réplicas que foram realizadas para cada formulação.

A solubilidade do MCZ no tampão receptor foi de 235 $\mu\text{g/mL}$. Considerando as baixas concentrações de MCZ observadas no TR, concluiu-se que a condição *sink* foi obedecida.

Tabela 4.9 Número de células de Franz com pele suína onde foram observadas quantidades detectáveis de MCZ tampão receptor para cada formulação em estudo.

Número de células que apresentaram quantidades detectáveis de MCZ no TR:	2 HORAS				4 HORAS			
	A1	B1	C1	C3	A1	B1	C1	C3
	2	1	4	8	4	2	0	2

Apenas na série de experimentos realizada para a formulação C3, por duas horas, é que foram determinadas concentrações acima do LQ para o MCZ no TR, em todas as oito células. A massa média de MCZ permeada, nesta condição foi de $4,5 \pm 1,4 \mu\text{g}$. Como discutido no item 4.3.3, os segmentos de pele utilizados nesses

experimentos foram armazenados por período de tempo um pouco maior do que os demais. Levando em consideração os resultados anômalos obtidos tanto na penetração (4.3.3) quanto na permeação, pode-se considerar que esses segmentos de pele estavam com as características de permeabilidade alteradas em relação aos demais, e que isso pode ter sido consequência de um maior tempo de congelamento.

No caso de produtos dermatológicos, como os antifúngicos, cuja ação se desenvolve nas camadas superiores da pele (EC e epiderme vivente), não é desejado que o fármaco atravesse a derme e atinja a circulação sistêmica, o que poderia acarretar efeitos indesejáveis. Dessa forma, o estudo de permeação pode fornecer dados importantes quanto à segurança desse tipo de produto.

Os resultados obtidos para a permeação de MCZ indicam que o fármaco encontrou grande dificuldade em alcançar o tampão receptor. Uma vez que foram encontradas quantidades mensuráveis de MCZ na derme no estudo de penetração, pode-se supor que essa camada acabou retendo esse pouco fármaco pela baixa capacidade de partição do mesmo para o meio receptor aquoso. A derme, que possui características mais hidrofílicas do que a epiderme, também pode representar uma barreira à passagem de substâncias, principalmente as que possuem alto coeficiente de partição e solubilidade em água limitada (KOU et al., 1993). Substâncias muito lipofílicas, portanto, tendem a ficar acumuladas no SC/epiderme, tanto por afinidade por esses tecidos quanto por dificuldade em atravessar a derme.

Experimentos com tempos superiores a quatro horas deverão ser realizados para averiguar se o tempo de lag foi atingido e assegurar que não serão atingidas quantidades plasmáticas consideráveis de MCZ após administração das formulações semi-sólidas estudadas.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

O método analítico desenvolvido para determinação de nitrato de miconazol por CLAE de fase reversa nas matrizes de trabalho demonstrou linearidade, sensibilidade e precisão adequadas aos objetivos do estudo.

A determinação do perfil de liberação *in vitro* em células de Franz equipadas com membrana sintética se mostrou um método adequado para avaliação de homogeneidade entre diferentes lotes dos produtos em estudo. Foi observada boa homogeneidade entre os três lotes dos produtos A e B. Entretanto, para o produto C, um dos lotes apresentou comportamento distinto das demais.

De forma geral, o produto A apresentou maior liberação de MCZ da formulação quando comparado aos demais, nas condições de ensaio. Esse comportamento foi atribuído a presença de propilenoglicol nas formulações B e C.

Os resultados de fluxo e *lag time* obtidos com as membranas de acetato de celulose e polissulfona foram estatisticamente iguais, para um α de 5%.

O método de extração e quantificação de MCZ em epiderme e derme suína se mostrou exato, preciso e seletivo e, portanto, adequado ao emprego em estudos de penetração cutânea.

Não foi possível observar um crescimento substancial da quantidade de MCZ nas camadas da pele com a duplicação do tempo de contato entre a formulação e a pele.

De forma geral, o produto A foi o que resultou em menores quantidades de MCZ nas camadas da pele, sendo a diferença de comportamento entre os produtos novamente explicada pela presença de propilenoglicol nas formulações B e C.

A permeação de MCZ através de pele suína após duas e quatro horas de contato com as formulações em estudo foi considerada insignificante.

Com base nos resultados *in vitro* foi possível constatar que os medicamentos referência nacional e genérico apresentam comportamentos distintos, o que, *in vivo*, poderia resultar em diferenças nas suas biodisponibilidades .

As metodologias *in vitro* aplicadas nesse estudo se mostraram úteis na avaliação e comparação de formulações tópicas semi-sólidas de nitrato de miconazol.

Referências

AKAY, C. *et al.* Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC. **II Farmaco**, v. 57, p. 953-957, 2002.

ALBERTI, I. *et al.* *In vivo* assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. **Journal of Controlled Release**, v. 71, p. 319-327, 2001a.

ALBERTI, I. *et al.* Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum, *in vivo*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 219, p. 11-19, 2001b.

ALBERTI, I. *et al.* Assessment and Prediction of the cutaneous bioavailability of topical terbinafine, *in vivo*, in man. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 10, p. 1472-1475, 2001c.

ANSEL, H.C.; ALLEN, L.V.; POPOVICH, N.G. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 7. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilking, 1999.

ANVISA. Resolução RDC n. 135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 24 maio. 2006.

ANVISA. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 24 maio. 2006.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

AZULAY, R.D.; & AZULAY, D.R. **Dermatologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.

BARRY, B.W. **Dermatological Formulations**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1983.

BARRY, B.W. **Penetration enhancers - Skin Pharmacokinetics**. Basel: Karger, 1987.

BENTLEY, M.V.; LOPEZ, R.F. Apostila. Curso de permeação cutânea *in vitro* II, Ribeirão Preto, 2002.

BOMMANNAN, D.; POTTS, R.O.; GUY, R.H. Examination of stratum corneum barrier function *in vivo* by infrared spectroscopy. **The Journal for Investigative Dermatology**, v.95, n. 4, p. 403-408, 1990.

BONINA, F. P. *et al.* *In vitro* percutaneous absorption evaluation of phenobarbital through hairless mouse, adult and premature human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 98, p. 93-99, 1993.

BORGERS, M.; DEGREEF, H.; CAUWENBERG, G. Fungal infections of the skin: infection process and antimycotic therapy. **Current Drugs Target**, v.6, n.8, p. 849-862, 2005

BRONAUGH, R. L. Determination of percutaneous absorption by *in vitro* techniques. In: BRONAUGH & MAIBACH: percutaneous absorption. 1. Ed. Nova Iorque: Maicel Dekker, 1985. p. 267-279.

BRONAUGH, R.L.; STEWART, R.F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies IV. The flow-through diffusion cell. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 64-67, 1985.

BURNETTE, R.R. Iontophoresis In: Hadgraft, J; Guy. R.H. Transdermal Drug Delivery. New York: Marcel Dekker, 1989.

CARRILO-MUNOZ, A.J., TUR, C., TORRES, J. In-vitro antifungal activity of sertaconazole, bifonazole, ketoconazole, and miconazole against yeasts of the *Candida* genus. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 37, n. 4, p. 815-819, 1996.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística - Princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CLEMENT, P.; LAUGEL, C.; MARTY, J.P. Influence of three synthetic membranes on the release of caffeine from concentrated w/o emulsions, **Journal of Controlled Release**, v. 66, p. 243-254, 2000.

CRISTÁLIA Produtos Químicos e Farmacêuticos. Método VMA009 - Doseamento de Nitrato de Isoconazol. Separata. Pinheiros, SP. Recebido em abril, 2001.

DANGELO, J.G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

DAVIES, M. I. A review of microdialysis sampling for pharmacokinetic applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 379, p. 227-249, 1999.

EDWARDS, D.A.; LANGER, R. A linear theory of transdermal transport phenomena. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 9, p. 1315-1334, 1994.

ELIAS, P.M.; BROWN, B.E.; ZIBOH, V.A.; The permeability barrier in essential fatty acids deficiency: evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 76, p. 297-301, 1980.

ELIAS, P.M. Epidermal lipids, barrier function and desquamation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 44s-49s, 1983.

ELIAS, P.M. Epidermal barrier function: intercellular epidermal lipid structures, origin, composition and metabolism. **Journal of Controlled Release**, v.15, p. 199-208, 1991.

FLORENCE, A.T., ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

FORSLIND, B. A domain mosaic model of the skin barrier. **Acta Dermatologica Venereologica**, v. 74, p. 1-6, 1994.

FREITAS, Z.M.F. Avaliação biofarmacêutica de formulações dermatológicas semi-sólidas de cetoconazol. 2005, 154 f. Tese de Doutorado em Fármacos e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FRIEND D. R. *In vitro* skin permeation techniques. **Journal of Controlled Release**, v. 18, p. 235-248, 1992.

GALEY, W.R.; LONSDALE, H.K.; NACHT, S. The *in vitro* permeability of skin and bucal mucosa to seleted drugs and tritiated water. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 67, p. 713-717, 1976.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L.B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

Goodman e Gilman. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. Nova lorque: Mcgraw-Hill, 1996.

GRAY, G.M.; YARDLEY, H. J. Lipid compositions of cells isolated from pig, human, and rat epiderms. **Journal of Lipid Research**, v. 16, p. 434-440, 1975

GREEN P.G., *et al.* Iontophoretic Drug Delivey. In: Walters K.A. & Hadgraft J. ed. Pharmaceutical skin penetration enhancement. New York: Marcel Dekker, 1993.

GUPTA, A. K.; Tomas, E. New antifungal agents. **Dermatologic clinics**, v. 21, n. 3, p. 565-576, 2003.

GUY, R. H.; HADGRAFT, J. On the determination of drug release rates from topical dosage forms. **Internationa Journal of Pharmaceutics**, v. 60, p. R1-R3, 1990.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1-18, 2001.

HAlGH, J. M.; SMITH, E. W. The selection and use of natural and synthetic membranes for *in vitro* diffusion experiments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 311-330, 1994.

HANSON Research Corp. Vertical Diffusion Cell. Set-Up and manual operation.

HARADA, K. *et al.* Role of intercellular lipids in stratum corneum in the percutaneous permeation of drugs. **The Journal for Investigative Dermatology**, v. 99, n. 3, p. 278-282, 1992.

HIGUCHI, W. I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 8, p. 802-804, 1962.

IRWIN, W.J.; SANDERSON, F.D.; LI WAN PO, A. Percutaneous absorption of ibuprofen: vehicle effects on transport through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 66, p. 193-200, 1990.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogam, 1994.

KLIGMAN, A.M.; CHRISTOPHERS, E. Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. **Archives on Dermatology**, v. 88, p. 702-705, 1963.

KOST, J.; LANGER, R. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery. In: : Shah, V.P. & Maibach, H.I. *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence and Penetration*. New York: Plenum Press, 1993.

KOU, J. H. *et al.* Effect of receiver fluid pH on *in vitro* skin flux of weakly ionizable drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 7, p. 986-990, 1993.

KRIWET, K.; MULLER-GOYMANN, C.C. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, p. 231-245, 1995.

LACAZ, C.S. **Micologia médica**. 5. ed. São Paulo: sarvier, 1973.

MAERTENS, J.A. History of the development ofazole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 1-10, 2004.

MERCK INDEX: An encyclopedia of chemicals, drug and biologicals. 13. ed. Whitehouse Station, N.J.: Merck e Co. Inc., 2001.

MCCLELLAN, K.J.; WISEMAN, L.R.; MARKHAM, A. Terbinafine. An update of its use in superficial mycoses. **Drugs**, v. 58, n. 1, p. 179-202, 1999.

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

ODOM, R.B. Update on topical therapy for superficial therapy for superficial fungal infections: focus on butenafien. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 31, p. 232-234, 1994.

PECK, K.D. *et al.* Improved stability of the human epidermal membrane during successive permeability experiments. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 98, p. 90-95, 1993.

PELLETT, M. A.; ROBERTS, M. S.; HADGRAFT, J. Supersaturated solutions evaluated with an *in vitro* stratum corneum tape stripping technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, p. 91-98, 1997.

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**, v. 38, n. 1, p. 90-95, 1994.

PERSHING, L.K. Dermatopharmacokinetics for assessing bioequivalence of topically applied products in human skin. **Cosmetics & Toiletries**, v. 115, n. 5, p. 43-51, 2000.

PERSHING, L.K. *et al.* Assessment of dermatopharmacokinetic approach in the bioequivalence determination of topical tretinoin gel products. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 5, p. 740-751, 2003.

TERREL, C.L. Antifungal agents. Part II. The azoles. **Mayo Clinic proceedings**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999

POTTS, R.O.; FRANCOEUR, M.L. The influence of stratum corneum morphology on water permeability. **The Journal for Investigative Dermatology**, v. 96, n. 4, p. 495-499, 1991.

POTTS, R.O.; GUY, R.H. Predicting skin permeability. **Pharmaceutical Research**, v. 9, p. 663-669, 1992.

PRISTA, L.N. *et al.*, **Tecnologia Farmacêutica**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SANTOYO, S. *et al.* *In vitro* percutaneous absorption of piroxicam through synthetic membranes and abdominal rat skin. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 71, p. 141-146, 1996.

SCHEUPLEIN, R.J.; BLANK, I.H. Permeability of skin. **Physiology Reviews**, v. 51, p. 702-747, 1985.

SCHMOOK, F. P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epiderms models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 51-56, 2001.

SCHROLNBERGER, C. *et al.* Application os the minimal truma biopsy to trandermal clinical pharmacokinetic studies. **Journal of Controlled Release**, v. 75, p. 197-306, 2001.

SEKI, T. *et al.* Excised porcine skin experimental systems to validate quantitative microdialysis meyhods for dertermination of drugs in skin after topical application. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 181-189, 2004.

SHEEHAN, D.J.; HITCHCOCK, C.A.; SIBLEY, C.M. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999

SHAH, V. P. *et al.* Determination of *in vitro* drug release form hidrocortisone creams. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 53, p. 53-59, 1989.

SHAH, V. P. *et al.* *In vitro* release of hydrocortisone from topical preparations and automated procedure. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 1, p. 55-59, 1991a.

SHAH, V. P. *et al.* *In vivo* percutaneous penetration / absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 74, p. 1-8, 1991b.

SHAH, V. P. *et al.* Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 82, p. 1-7, 1992.

SHAH, V.P. *et al.* Bioavailability and bioequivalence of transdermal drug delivery systems. In Shah e Maibach: Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration. Nova Iorque: Plenum Press, 1993. P. 415-424.

SHAH, V.P. *et al.* Bioequivalence of topical dermatological dosage forms – methods of evaluation of bioequivalence. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 167-171, 1998.

SHAH, V. P.; ELKINS, J.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of the test system used for *in vitro* release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharmaceutical Development Technology**, v. 4, n. 3, p. 377-385, 1999.

SHAH, V.P. Progress in methodologies for evaluating bioequivalence of topical formulations. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 2, n.5, p.175-180, 2001.

SIEWERT, M. *et al.* FIP/AAPS Guidelines to Dissolution/*in vitro* release testing of Novel/Special dosage forms. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2003.

SKELLY, J. P. *et al.* FDA and AAPS Report of the workshop on principles and practices of *in vitro* percutaneous penetration studies: relevance to bioavailability and bioequivalence. **Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 3, p. 265-267, 1987.

SURBER, C. *et al.* *In vivo* skin penetration of acitretin in volunteers using three sampling techniques. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 9, p. 1291-1294, 1993.

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

p. 7-21, 1998.

TROTTEY, L. *et al.* Effect of finite doses of propylene glycol on enhancement of *in vitro* percutaneous permeation of loperamide hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p. 213-219, 2004.

U.S. FDA/CDER. Nonsterile Semisolid Dosage Forms – Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; *In vitro* Release Testing and *In vivo* Bioequivalence Documentation. 1997.

U.S.FDA/CDER. Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs – *in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release, and associated studies, 1998.

UNITED States Pharmacopeia. Official monographs. 27. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004.

UNITED States Pharmacopeia. Official monographs. 28. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005.

VAN BUSKIRK, G.A. *et al.* Workshop Report: Scale up of liquid and semi-solid disperse systems. **Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 1216-1220, 1994.

WAGNER, H. *et al.* Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from *in vitro* experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of Controlled Release**, v. 75, p. 283-295, 2001.

WEIGMANN H. J. *et al.* Bioavailability of clobetasol propionate-quantification of drug concentrations in the stratum corneum by dermatopharmacokinetics using tape stripping. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 12, p. 46-53, 1999.

WESTER, R.C. *et al.* Human cadaver skin viability for *in vitro* percutaneous absorption: Storage and detrimental effects of heat-separation and freezing. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 82-84, 1998.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Skin absorption enhancer, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 9, p. 305-353, 1992.

WOTTON, P.K. *et al.* Vehicle effect on topical drug delivery. 3. Effect azone on the cutaneous permeation of metronidazole and propylene glycol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 24, p. 19-26, 1985.

ZATZ, J. L. Skin Permeation - Fundamentals and Application. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993.

ZATZ, J. L. Drug release from semisolids: effect of membrane permeability on sensitivity to product parameters. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 5, p. 787-789, 1995.