UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Liberação e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos:
um estudo metodológico de aparatos e de condições
experimentais**

Fabíola Silva Garcia Praça

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Liberação e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos:
um estudo metodológico de aparatos e de condições
experimentais**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientado(a): Fabíola Silva Garcia Praça

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Ribeirão Preto
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Praça, Fabíola Silva Garcia

Liberação e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais. Ribeirão Preto, 2010.

84p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Maria Vitória Lopes Badra Bentley

1. Liberação e permeação *in vitro*
2. Transdérmicos.
3. Nicotina
4. Validação intra e inter laboratorial
5. Pás sobre disco
6. Célula de difusão de Franz

RESUMO

PRAÇA, FABIOLA SILVA GARCIA. **Liberação e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais.** 2010. 000f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Liberação transdérmica de fármacos apresenta várias vantagens na terapêutica quando comparada com administração oral ou parenteral. Não existe até o momento nenhum método previsto na Farmacopéia Brasileira para realizar testes de liberação de fármacos em adesivos transdérmicos, outros compêndios oficiais como Farmacopéia Americana, Britânica e Européia, descrevem o aparato de pás sobre disco, o cilindro rotatório e o suporte recíproco. Atualmente a literatura descreve diversos tipos de células de difusão para liberação transdérmica das quais a célula de difusão de Franz tem sido a mais empregada tanto para adesivos transdérmicos como formas semi-sólidas, utilizada no desenvolvimento farmacotécnico, caracterização biofarmacêutica e controle de qualidade. A proposta deste estudo tem por objetivo estipular critérios para a escolha mais adequada do equipamento e metodologias *in vitro* na avaliação da liberação transdérmica de fármacos, utilizando a nicotina como fármaco modelo. Para tal, foram empregados ensaios *in vitro* de liberação e retenção cutânea utilizando métodos de pás sobre disco e método de célula de difusão de Franz modificada em sistema estático e fluxo contínuo. A validação dos fatores que influenciam a taxa de liberação *in vitro* da nicotina foram fundamentais para escolha do meio receptor, escolha da velocidade de agitação que promoveu mais semelhança no perfil de liberação em diferentes equipamentos assim como a escolha da membrana biológica mais adequada para o método proposto. Os resultados mais promissores foram selecionados para os ensaios *in vitro* de liberação, permeação e retenção cutânea. Os dados de liberação, tanto em quantidades de nicotina liberada como seu fluxo, demonstraram semelhança no uso de diferentes equipamentos, indicando possíveis intercambialidades entre os métodos propostos para liberação de nicotina transdérmica. Ensaio *in vitro* de permeação cutânea em célula de difusão vertical de Franz não demonstraram diferenças significativas em diferentes modelos de membranas biológicas utilizadas, as quais foram pele de orelha de porco, pele de camundongo sem pelo e pele de cobra cascavel hidratada por 24 horas. A quantidade de nicotina permeada em até 8 horas, assim como o fluxo de permeação foram significativamente menor para o método de pás sobre disco (FDA) quando comparado com os resultados obtidos utilizando célula de difusão vertical de Franz tanto em sistema estático com em fluxo contínuo. Estes resultados podem estar relacionados com a estrutura física do equipamento de célula de difusão vertical de Franz, uma vez que oferece um sistema oclusivo, dificultando o contato do adesivo com o meio receptor. Desta forma, os resultados deste projeto podem indicar o uso da célula de difusão vertical de Franz para ensaios *in vitro* de liberação e permeação cutânea da nicotina em formas farmacêuticas transdérmicas, podendo ser aplicado em pesquisas de desenvolvimento de formulações, controle da qualidade e testes de Equivalência Farmacêutica para produtos genéricos. Os

resultados desta pesquisa apresentam-se podem ter importante influência nas discussões em torno dos medicamentos genéricos no Brasil, bem como na elaboração de diretrizes para testes de Equivalência Farmacêutica e Controle de Qualidade de medicamentos transdérmicos. Poderão ainda fornecer dados para indicações de protocolos para Farmacopéia Brasileira e pesquisa científica em torno dos sistemas de liberação transdérmicas de fármacos.

Palavras-chave: liberação e permeação *in vitro*; sistemas transdérmicos, nicotina, validação intra e inter laboratorial.

ABSTRACT

PRAÇA, FABIOLA SILVA GARCIA. ***In vitro* release and permeation transdermal products: evaluation of methods and apparatus** 2010. 000f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The aim of this work was to compare *in vitro* release and permeation of nicotine from transdermal patch (TDS) using three different methods such as, FDA paddle method and both Vertical Diffusion Cell (VDC) static and continuous flux. We evaluated different kinds of membrane (hairless mouse, porcine ear skin and snake skin), different composition and pH of acceptor phases (0.01N isotonic phosphate buffer pH 7.4 ($\pm$ 0.2), water, and HCL 0.025N), agitation of acceptor phase and batches of the transdermal patches. Profiles of release and permeation from all methods evaluated were linked statistically using linear regression and one-way ANOVA nonparametric assay. The 0.01N isotonic phosphate buffer pH 7.4 ($\pm$ 0.2) improved greater release rate of nicotine than those obtained using HCL and water as acceptor phase. Cumulative released and permeated amounts of nicotine were almost equal for all methods evaluated and there is not significantly different (one-way ANOVA $p < 0.05$) were observed after 8 h. However nicotine permeated fluxes (J) after 8 h were significantly higher using VDC than those obtained using FDA paddle method. Cumulative permeated amounts (reported to the effective surface area of the cells) were overestimated when skin permeation experiments were prolonged to 12 h, indicating that the actual diffusion surface area of NiQuitinTM exceeded the effective diffusion surface area of the cells. Reducing the trimmed TDS surface area led not only to a reduction of the cumulative permeated amounts, but also to a reduction of the flux at 12 h. In order to evaluate the edge effect on drug release flux studies were performed using static VDC. *In vitro* penetration studies using different membranes showed not significantly difference for ear pig skin, hairless mouse and snake skin at 8 h. However data obtained without membrane were about 1.25 times smaller than those obtained with biological membranes. These results demonstrated that NiQuitinTM TDS had dependent release of membrane at 8 h of permeation. In conclusion there is not significantly different for *in vitro* release and permeation amounts of nicotine from NiQuitinTM using VDC and FDA method. In term of release efficiency all methods released up to 80% of nicotine after 8 h. The results suggested the use of VDC as potential method to evaluate both *in vitro* release and skin permeation of nicotine in transdermal patches.

Keywords: Nicotine; Transdermal delivery system; Franz vertical diffusion cell; FDA paddle over disk method; Skin permeation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EC- Estrato córneo

EP- Epiderme

D- Derme

VDC- célula de difusão vertical

FDA- *Food and Drug Administration*

USP- *UNITED States Pharmacopoeia*

FIP- *International Pharmaceutical Federation*

EMA - *European Medicines Agency*

TTSs - Sistemas terapêuticos transdérmicos

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A PELE

A pele é o revestimento externo do corpo, considerado o maior e mais pesado órgão do corpo humano, é praticamente idêntica em todos os grupos étnicos humanos. Nos indivíduos de pele escura, os melanócitos produzem mais melanina que naqueles de pele clara, porém o seu número é semelhante (**Figura 1**). (BARRY, 1983)

Apresenta-se subdividida em três camadas distintas: a epiderme estratificada e vascularizada, a derme e a hipoderme subcutânea contando ainda com vários órgãos anexos, como folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas. (JUNQUEIRA *et al.*, 1995)

Figura 1. Imagem da pele humana e subdivisões morfológicas (estrato córneo, epiderme e derme), reproduzida do livro *Piel Eudemica: Morfologia y Fisiologia* (Lorenzo Pons Gimier).

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado (células escamosas em várias camadas) onde a célula principal é o queratinócito (ou ceratinócito), que produz a queratina. Existem também ninhos de melanócitos, produtores de melanina, um pigmento castanho que absorve os raios ultravioleta (UV); e células imunitárias, principalmente células de Langerhans, gigantes e com prolongamentos membranares (ABRAHAM *et al.*, 1995).

Nos estudos de permeação cutânea, a epiderme é a camada de pele que mais merece atenção. Podemos subdividir a epiderme em camada basal, a mais profunda e que entra em contato com a derme; a camada espinhosa, composta por células cúbicas ou achatadas com mais queratina que as basais que começam a formar junções celulares umas com as outras, promovendo o aspecto de espinhos; a camada granulosa composta por células achatadas, com grânulos de queratina proeminentes e outros como substância extracelular e outras proteínas; a camada lúcida composta por células achatadas hialinas e eosinófilas devido a grânulos muito numerosos protéicos e ainda a camada córnea denominado estrato córneo (BARRY, 1983).

O estrato córneo (EC) constitui uma das principais barreiras a penetração de fármacos. É constituído de células achatadas eosinófilas sem núcleo com grande quantidade de filamentos, principalmente queratinas. Os lipídeos desta matriz são organizados em estruturas multilamelares, nas quais se alternam domínios hidrofílicos e lipofílicos, que podem servir de caminho para o transporte de fármacos (BARRY, 1983; SINKO 2008).

A derme é um tecido conjuntivo que sustenta a epiderme. É constituída por elementos fibrilares, como o colágeno e a elastina e outros elementos da matriz extracelular, como proteínas estruturais, glicosaminoglicanos, íons e água de solvatação. Está subdividida em duas camadas: a camada papilar em contato com a epiderme, formada por tecido conjuntivo frouxo, e a camada reticular constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam as fibras colagenosas.

É na derme que se localizam os vasos sanguíneos e linfáticos que vascularizam a epiderme e também os nervos e os órgãos sensoriais a eles associados (GAO *et al.*, 1998).

Já a hipoderme é denominada um tecido adiposo que protege o corpo contra o frio. É um tecido conjuntivo frouxo ou adiposo que faz conexão entre a derme e a fáscia muscular sendo esta camada de tecido adiposo variável à pessoa e localização no corpo (JUNQUEIRA *et al.*, 1995).

A pele é responsável pelas funções de termorregulação, pela defesa, pela percepção e proteção do corpo humano, entre outros (ABRAHAM *et al.*, 1995).

O trabalho de Michaels *et al.* (1975) sobre as possíveis rotas de liberação de fármacos, culminou com a analogia da pele a uma parede compostas por tijolos, devido sua função barreira e conseqüentes limitações na penetração.

1.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA

Na década de 50 foi introduzido um novo conceito de liberação de fármacos através da pele, apesar de um crescente avanço da pesquisa científica em cima desta nova descoberta, apenas em 1979 foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) e disponibilizado comercialmente nos Estados Unidos, a primeira geração de medicamentos de aplicação na pele destinados a náuseas, vômitos e angina associados às viagens, principalmente as marítimas (ALLEN *et al.*, 2007).

Todavia foi a comercialização de adesivos transdérmicos de nicotina usados no tratamento antitabagismo que promoveu o impulso necessário para esta tecnologia de liberação de fármacos transdérmicos. (ALLEN *et al.*, 2007)

Os sistemas terapêuticos transdérmicos (TTSs) facilitam a passagem de quantidades terapêuticas de fármacos através da pele, com o objetivo de atingir a circulação sanguínea, para exercer efeitos sistêmicos (ALLEN *et al.*, 2007).

O processo básico envolvido na tecnologia de liberação de fármacos transdérmicos é a absorção percutânea ou transdermal do fármaco (SINKO, 2008). Nem todas as substâncias apresentam características adequadas à administração transdérmica, devido suas propriedades físico químicas, incluindo massa molecular, solubilidade, coeficiente de partição e constante de dissociação (ALLEN *et al.*, 2007). Um exemplo é a difusão de fármacos polares através da pele que ocorre bem mais rápida através do tecido viável da pele, Epiderme e Derme (EP + D) quando comparado com a velocidade que atravessa o EC (ALLEN *et al.*, 2007)

O fluxo de permeação de fármaco através do estrato córneo é expresso através do modelo matemático da lei de Fick, demonstrada na Equação 1 (HIGUCHI, 1960).

(Eq. 1)

$$J = \frac{D_M \times C_{s,m}}{L} \times \frac{C_v}{C_{s,v}}$$

onde, J é o fluxo; D_M representa o coeficiente de difusão do fármaco pela membrana; $C_{s,m}$ é a solubilidade do fármaco na membrana; L representa a extensão de difusão do fármaco pela membrana; C_v é a concentração do fármaco dissolvido no veículo e $C_{s,v}$ é a solubilidade do fármaco no veículo.

Os TTSs são desenvolvidos para induzir a passagem do fármaco por entre todas as camadas da pele até atingirem a corrente sanguínea. Tecnicamente estão divididos em duas classes distintas: sistemas monolíticos e sistemas controlados por membrana. (ALLEN *et al.*, 2007)

Os sistemas monolíticos de liberação transdérmica apresentam o fármaco incorporado em uma camada matricial composta por material polimérico que controla a liberação do fármaco. Este material polimérico geralmente é solubilizado juntamente com o fármaco para formação da matriz e após passar pelo processo de

secagem, esta mistura é incorporada entre a camada anterior e frontal do adesivo transdérmico (ALLEN *et al.*, 2007).

Os sistemas controlados por membrana contêm um reservatório geralmente na forma líquida ou de gel contendo o fármaco, uma membrana que controla a velocidade de liberação e camada adesiva. A vantagem sobre os sistemas monolíticos é que a velocidade de liberação permanece constante, uma vez que a solução do fármaco no reservatório permanece saturada. De uma forma geral, os TTSs são constituídos por diferentes números de camadas, incluindo uma camada externa que protege o sistema do ambiente externo e de perdas, uma camada matricial ou de reservatório que armazena e libera o fármaco para a pele, uma camada adesiva para manter o fármaco em contato com a pele e uma última lâmina protetora que deve ser removível antes do uso (ALLEN *et al.*, 2007).

Allen *et al.* (2007) apresentaram uma Tabela contendo alguns exemplos da estrutura e composição de variados TTSs. Para nicotina, foi demonstrado quatro sistemas comercialmente disponíveis fora do Brasil, Habitrol[®], Nicoderm[®], Nicotrol[®] e Prostep[®]. O Habitrol[®] (Novartis Consumer) é composto por um disco adesivo, camada externa aluminizada, camada de adesivo de acrilato, solução de nicotina em copolímero de ácido metacrilato, camada adesiva de acrilato e revestimento protetor de alumínio descartável que recobre a camada adesiva e deve ser removido antes do uso. O Nicoderm[®] (Smithkline Beecham Consumer) composto por um adesivo retangular, camada externa oclusiva de polietileno, alumínio, poliéster, copolímero acetato de etilenovinila, reservatório de nicotina em matriz de copolímero, membrana de polietileno para controlar a velocidade de liberação, camada adesiva de polissobitileno e revestimento protetor que deve ser removido antes da aplicação. O Nicotrol[®] (McNeil Consumer) composto de adesivo retangular, camada externa do filme laminado de poliéster, adesivo controlador da velocidade de liberação, nicotina e revestimento descartável que deve ser removido antes do uso. Finalmente, o Prostep[®] (Lederle) é um disco adesivo composto por tira de espuma bege, adesivo de acrilato, lâmina externa de gelatina com revestimento de polietileno, matriz de nicotina em gel, lâmina protetora e revestimento descartável que deve ser removido antes do uso.

1.3 VANTAGENS DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS

A liberação transdérmica de fármacos apresenta várias vantagens na terapêutica quando comparada com administração oral ou parenteral (KEMKEN *et al.*, 1991). Entre as vantagens dos sistemas estão (ANSEL *et al.*, 2000):

- ✓ Evitar as dificuldades provocadas por pH gastrointestinal, atividade enzimática, interações medicamentosas e com alimentos, bebidas e medicamentos administrados por via oral.
- ✓ Substituir a administração oral quando esta via é inadequada, como nos casos de vômito e/ou diarreia.
- ✓ Evitar o efeito da primeira passagem, ou seja, passagem inicial do fármaco pelas circulações portal e sistêmica após absorção gastrointestinal, evitando assim sua possível inativação pelas enzimas hepáticas e digestivas.
- ✓ Evitar os riscos e a inconveniência da administração parenteral e o metabolismo e a absorção variáveis, associados à administração oral.
- ✓ Proporcionar várias doses diárias com uma única aplicação, aumentando assim a cooperação do paciente.
- ✓ Ampliar a atividade de fármaco com meia vida curta, devido ao reservatório do sistema e as características de liberação controlada.
- ✓ Permitir a rápida interrupção do efeito dos fármacos, se desejável, com sua remoção.
- ✓ Permitir a administração rápida e fácil da medicação em emergências, por exemplo, em pacientes inconscientes e em coma.

1.4 LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE FÁRMACOS COMO SUPORTE NA PESQUISA CIENTÍFICA E NO CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS TRANSDÉRMICOS

O teste *in vitro* de liberação de fármacos é uma ferramenta muito importante na indústria farmacêutica, tanto no desenvolvimento de produtos quanto no controle de qualidade de rotina. Apesar de ter sido inicialmente desenvolvido para formas

farmacêuticas sólidas, este teste vem sendo aplicado também para formas farmacêuticas não sólidas, como suspensão, adesivos transdérmicos, supositórios e outros (MARCOLONGO & STORPIRTIS, 2003).

Para compreender a liberação *in vitro* de fármacos, devem-se conhecer extensamente alguns dos eventos significativos na realização do ensaio, entre eles podemos destacar (GORDON 1997):

- ✓ A aplicação de uma camada infinita do sistema de liberação, ou seja, da amostra sendo pomada, gel ou creme, sobre a superfície da membrana que se localiza entre a amostra e fluído receptor.
- ✓ Evaporação do veículo quando associado, nas mudanças de atividade do fármaco.
- ✓ Dissolução de fármaco no veículo
- ✓ Partição de fármaco na membrana
- ✓ Difusão de fármaco através da membrana da pele pela rota transepidermal, na qual, a fármaco penetra o estrato córneo, chega a epiderme viável, atinge a derme e os capilares chegando a corrente sanguínea, ou pela rota transfolicular onde a fármaco penetra pelo sebo e folículos pilosos até atingir a derme e os capilares chegando a corrente sanguínea.
- ✓ Depuração sistêmica de fármaco (*clearance*)

A liberação de fármacos pode ser definida de forma simplificada como o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo (CHOWDARY *et al.*, 1987).

Testes de liberação *in vitro* apresentam relevância no controle de qualidade e em diferentes estágios de ciclo de vida de um medicamento. Nos primeiros estágios do desenvolvimento farmacotécnico, eles são úteis para identificar variáveis críticas na produção, escolher entre diferentes formulações, otimizá-las e fazer avaliações de risco, como no caso de formas farmacêuticas de liberação modificada (MARTIN *et al.*, 2003).

Durante a fase de produção são importantes para liberação dos lotes e teste de estabilidade, uma vez que, as características de liberação de um produto devem manter-se constantes durante todo o período de validade do mesmo e também são muito úteis para avaliar o impacto que certas mudanças, como equipamento ou local de fabricação, pode ter sobre o produto (MURTHY *et al.*, 1993., FDA 1996; ABUZARUR *et al.*, 1997; MANADAS *et al.*, 2002 e BRASIL, 2003).

Com o avanço da tecnologia e das pesquisas envolvendo liberação de fármacos, modernização dos testes e mais ênfase na previsibilidade de efeitos terapêuticos por meio dos testes *in vitro*, os testes de liberação de fármacos tem ganhado cada vez mais popularidade. Um dos mais antigos artigos científicos sobre dissolução foi publicado em 1897 e é intitulado “A taxa de solubilidade de substâncias sólidas em suas próprias soluções”. Os autores perceberam a importância do assunto e fizeram experimentos que os levaram a concluir que a velocidade de solubilização, de acordo com a lei de difusão, seria proporcional a concentração do filme de solução saturada que se forma na camada de difusão (NOYES *et al.*, 1897).

De acordo com WAGNER (1971), entre os anos de 1900 a 1903, Brunner e Toloczko mostraram que a constante de proporcionalidade da equação de Noyes-Whitney é dependente da área e da estrutura de superfície exposta, da intensidade de agitação ou fluxo, da temperatura e do aparato experimental (WAGNER, 1971).

Em 1904, Nerst e Brunner utilizaram a lei de difusão de Fick para estabelecer uma nova relação entre a constante de proporcionalidade e o coeficiente de difusão do soluto, permitindo a estimativa da espessura da camada de difusão. Baseado neste fato eles avançavam na idéia de que todas as reações heterogêneas dependem da taxa de difusão do equilíbrio soluto/solução do filme que se forma imediatamente na interface (WAGNER, 1971; ABDOLAH *et al.*, 1989 e BANAKAR 1992).

Entretanto, Klein foi o primeiro pesquisador a determinar a taxa de dissolução de um comprimido em 1932, um ano depois, Elliott, utilizando o aparelho de Klein,

publicou gráficos nos quais mostrava a quantidade de fármaco dissolvido em função do tempo a partir de comprimidos contendo cinco fármacos diferentes (WAGNER, 1971).

Até o início da década de 50, os experimentos envolvendo liberação de fármaco estavam focados nas características físico-químicas do fármaco, não incluindo, necessariamente, as formas farmacêuticas que os continham. A partir de então, o foco da experimentação mudou para a avaliação dos efeitos da liberação do fármaco na atividade biológica do produto. Na década de 60 foram descritos os primeiros aparelhos para realização dos ensaios de liberação para formas farmacêuticas sólidas (WAGNER, 1971).

1.4.1. Aparatos para testes de liberação *in vitro* de preparações tópicas e transdérmicas

Em 1970, a Farmacopéia Americana (Edição XVIII) publica o primeiro teste de dissolução e em 1975 (Edição de XIX) recomenda dois aparelhos de liberação para forma farmacêutica sólida, aparato 1 (cesta) e aparato 2 (pás) que são até hoje os equipamentos mais utilizados. A medida que novos fármacos e sistemas de liberação de fármacos eram estudados, o interesse em estudos de liberação de fármacos se intensificava (WAGNER, 1971). Em 1990, a Farmacopéia Americana (Edição XXII) incorpora três aparelhos para a liberação de formas farmacêuticas transdérmicas: aparato de pás sobre disco, aparato cilindro rotatório e aparato de suporte cilíndrico recíproco (**Figura 2**).

Figura 2. Demonstração esquemática dos aparatos 5, 6 e 7 descritos na Farmacopéia Americana – USP 29).

O aparato de pá sobre disco descrito como aparato 5 da Farmacopéia Americana, está atualmente também descrito nas Farmacopéias Britânica e Européia e aconselhado como método de liberação para transdérmicos pelo FDA (Shah *et al.*, 1988). Ele deve ser utilizado com o aparato da pá e um disco de aço inoxidável para fixação do sistema transdérmico no fundo da cuba. O disco deve manter o sistema transdérmico esticado paralelamente a pá, com a superfície de liberação do fármaco voltada para cima. O pH do meio de dissolução deve estar entre 5,0 e 6,0 para refletir as condições da pele, a mesma razão para utilização da temperatura em 32°C ($\pm 0,5$) e a agitação considerada adequada é em torno de 50 a 100 rpm (SIEWERT *et al.*, 2003).

Outro aparato é o cilindro rotatório, considerado aparato 6 pela Farmacopéia Americana e também previsto pelas Farmacopéias Britânica e Européia, na qual a haste com a pá é substituída por um cilíndrico rotatório onde é colocado, na sua parte externa, a forma farmacêutica. (USP 29, 2006)

O terceiro aparato previsto pela Farmacopéia Americana é o suporte recíproco que utiliza um sistema similar ao dos cilindros recíprocos com modificações para colocação dos sistemas transdérmicos (USP 29). As condições

sugeridas para os aparatos 6 e 7 são as mesmas do aparato 5 (FDA) (SIEWERT *et al.*, 2003).

A evolução no número de monografias na Farmacopéia Americana acompanhou a proposição dos aparatos. Em 1970 a Farmacopéia Americana apresentava testes de liberação de fármacos em apenas 12 monografias, todas para a forma farmacêutica sólida. Esse número foi alterado para 462 em 1990, 630 em 2002 e aproximadamente 787 em 2006, sendo apenas 02 para sistema transdérmico (clonidina e nicotina) (Farmacopéia Americana, 2009). Apesar disto, não existe um consenso sobre qual dos métodos descritos seria adequado para liberação *in vitro* de formas transdérmicas.

A Farmacopéia Brasileira vigente apresenta aproximadamente 116 monografias com ensaios de liberação de fármacos, todas para forma farmacêutica sólida (Farmacopéia Brasileira, 2005).

Durante os anos 90 foram elaborados diversos guias pelo FDA, FIP (*International Pharmaceutical Federation*) e EMEA (*European Medicines Agency*) abrangendo a maioria dos aspectos dos ensaios de liberação de fármacos (MANADAS *et al.*, 2002).

A literatura científican descreve métodos *in vitro* que mimetizam o processo de liberação e penetração transdérmicas *in vivo* (AKAZAWA *et al.*, 1989) com e sem membranas (artificiais ou biológicas) e diferentes tipos de células de difusão (AIACHE, 1992) das quais a *Vertical Diffusion Cell* (VDC) de Franz em sistema estático e fluxo contínuo, tem sido a mais empregada no desenvolvimento farmacotécnico, caracterização biofarmacêutica e controle de qualidade, tanto para adesivos transdérmicos como para formas farmacêuticas semi-sólidas (SHAH *et al.* 1994).

O aparato da célula de difusão em sistema estático consiste em seis células de vidro termoaquecidas, cuba com meio receptor para reposição de meio durante a amostragem, hélice para agitação do meio receptor, coletor automático e suporte

para oclusão da célula de difusão a qual minimiza efeitos de evaporação da amostra (Figura 3).

Figura 3. Imagem do equipamento automatizado de permeação cutânea e VDC de Franz modificada (*Hanson Corporation*).

Figura 4. Imagem esquemática da VDC proposta por *Franz, 1975* (A), imagem esquemática da VDC de Franz Modificada, *Hanson Corporation* (B).

A maioria dos artigos utilizando célula de difusão está baseada nas publicações de Franz em meados de 1970 (Franz, 1975, 1978). A célula de Franz Modificada foi introduzida em 1975 por FRANZ, caracterizada por ser uma célula de difusão estática, de dose finita, onde a pele é montada em VDC e a derme fica em contato com a uma solução receptora (**Figura 4**). Uma quantidade de formulação a ser estudada é aplicada sobre a pele, mimetizando as condições *in vivo* (BRONAUGH, STEWART, 1985). O volume do compartimento receptor é relativamente grande para garantir solução homogênea e diluição da substância permeada (FRANZ, 1975).

A temperatura do sistema é controlada e mantida por um banho termostatzado que circula através de uma jaqueta que envolve a câmara receptora, a distribuição homogênea da temperatura na solução receptora é alcançada pelo emprego de barras magnéticas controladas por agitadores magnéticos externos (SARTORELLI *et al.*, 2000).

A VDC de Franz em sistema estático vem sendo aplicada em vários estudos de permeação na pele, incluindo formulações de liberação transdérmicas e tópica bem como cosméticos, pesticidas e oftálmicos. Conforme *FDA Guideline SUPAC SS*, este sistema é ideal para controle de qualidade de preparações tópicas (FDA, 1997).

A VDC de Franz com fluxo contínuo apresenta uma composição bem semelhante à VDC de Franz com fluxo estático, porém neste sistema a solução receptora é bombeada continuamente a um fluxo constante através de uma bomba de infusão (**Figura 5**).

Figura 5: Representação esquemática da célula de difusão em fluxo contínuo. Composição da célula de vidro com área de permeação de $0,8 \text{ cm}^2$ e volume total de 3 mL.

Bronaugh e Steward, 1985, introduziram o sistema de fluxo contínuo para automatizar o processo de amostragem das células mimetizando o fluxo sanguíneo da pele, o mais próximo ao real, quando comparado com os sistemas estáticos. Assim sendo, foi capaz de monitorar o perfil de liberação de drogas por amostragem em um período de 24 horas, assim como, a manutenção da *sink condition* através do período de experimento (SARTORELLI *et al.*, 2000).

Em setembro de 2009, um fórum da Farmacopeia Americana sugeriu o uso da VDC para ensaios de controle da qualidade dos produtos tópicos e transdérmicos (*The United States Pharmacopeial Convention, Forum 35*, 2009).

Não existe até o momento nenhum método previsto nos compêndios oficiais para realizar testes de liberação de fármacos em adesivos transdérmicos utilizando VDC de Franz Modificada. Entretanto, o *FDA's Guidance for Industry on Scale up*

and Post Approval Changes for Semisolid (SUPAC-SS) dosage forms, descreve o estudo de taxa de liberação *in vitro* utilizando a VDC de Franz para semi-sólidos assim como a Farmacopeia Americana divulgou em 2009 um Forum indicando o uso da VDC para hidrocortisona em forma farmacêutica semi-sólida com determinação analítica por HPLC. (FDA, 1997 e FLYNN et al., 1999; The United States Pharmacopeial Convention, Forum 35, 2009).

Também vem sendo altamente descrito na literatura o uso da VDC de Franz, em desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos (GARCIA *et al.*, 2004; ELVIRA *et al.*, 2003), novos promotores de absorção cutânea (LOPES *et al.*, 2005; JIA-YOU FANG, 2003) e ainda sugerindo novos métodos para compêndios oficiais.

Devido à grande variabilidade de formulações e sua influência na liberação de fármaco, além da diversidade de sítios de aplicação, um único método oficial não seria suscetível para o desenvolvimento, caracterização biofarmacêutica e controle de qualidade para todas as formas farmacêuticas semi-sólidas e transdérmicas comercialmente disponíveis. Todavia, a VDC de Franz pode ser considerada o aparato mais promissor para a investigação de mudanças pós registro de medicamentos (FARE & ZATZ, 1995).

1.4.2. Parâmetros relacionado às metodologias para testes de liberação *in vitro* de preparações tópicas e transdérmicas

A taxa de liberação transdérmica *in vitro* de um fármaco pode sofrer forte influência de parâmetros adicionados a metodologia que está sendo aplicada no ensaio de liberação (SHAH & ELKINS 1995), desta forma se explica o grande número de estudos para validar a metodologia *in vitro* mais eficaz e segura mimetizando os efeitos *in vivo* de liberação de fármaco (ANSEL *et al.*, 2000). Neste sentido, Shah (1999) descreveu a influência de parâmetros referentes à metodologia, tais como, composição do meio receptor, velocidade de agitação do meio receptor e diferença de lote da membrana sintética utilizada nos ensaios de liberação *in vitro* para formulações tópicas. A metodologia e o aparato a serem

utilizados devem conter características que melhor descrevam a liberação de fármaco e os sistemas de liberação a serem ensaiados (SHAH, 1999).

A seleção de um meio receptor apropriado é um fator crítico para o sucesso do experimento de liberação de fármacos (SHAH *et al.*, 1994). A composição do meio receptor deve demonstrar ser capaz de manter a *sink condition* à temperatura de 32 °C ($\pm 0,5$), apresentar-se como solução tampão com pH fisiológico para fármacos solúveis em água ou ainda meio hidro-alcoólico para fármacos lipofílicos. O uso de tensoativos no meio receptor é aceitável desde que justificado (FDA, 1997). Quando a concentração do fármaco dissolvida no meio de liberação é menor que 10% da sua concentração de saturação, diz-se que o sistema está operando sob *sink condition* (SINKO, 2008). As amostras coletadas devem apresentar no mínimo 5 tempos de coletas diferentes durante todo o período para determinação do fluxo da liberação (SHAH *et al.*, 1999).

1.4.3. Membranas para estudos *in vitro* de liberação e permeação cutânea de preparações tópicas e transdérmicas

As peles humanas oriundas de cirurgia plástica seriam modelos ideais para estudos de penetração *in vitro* de fármacos através da pele. Entretanto, a pouca disponibilidade deste tipo de material, a necessidade de submeter o experimento ao Comitê de Ética e as dificuldades e custos de armazenamento, além da viabilidade deste modelo de membrana tornam seu uso limitado (SCHMOOK *et al.*, 2001; RIGG, BARRY, 1990, BABY *et al.*, 2008). Como alternativas de membranas para pele humana, pesquisadores utilizam pele de animais de experimentação, membranas sintéticas e culturas tridimensionais, como a epiderme reconstruída, denominada pele equivalente.

A pele da orelha de porco tem sido recomendada para os estudos de permeação cutânea *in vitro*, pois possui similaridades fisiológicas, histológicas, quanto à densidade de folículos pilosos, bem como bioquímicas, próxima a da pele humana (SARTONELLI *et al.*, 2000; HAIGH e SMITH, 1994).

São encontrados na literatura alguns estudos comparativos de permeação cutânea em pele humana, pele de orelha de porco e outros tecidos incluindo camundongos sem pelos, na qual os resultados indicam a pele de orelha de porco, como o modelo de membrana mais promissor para os ensaios *in vitro* de permeação (FANG *et al.*, 1995).

Schomook, Meingassner e Billich (2001) compararam a propriedade de permeação de fármacos com diferentes polaridades em pele humana, de orelha de porco, de rato e epiderme humana reconstruída (SkineethicTM). Os autores concluíram que a pele de orelha de porco parece ser o modelo mais adequado, na ausência da pele humana, onde o fluxo e a concentração dos fármacos através/na pele de orelha de porco foram na mesma magnitude, quando comparados com a pele humana.

Barbero e Frasc (2009) demonstraram que tanto a pele de porco quanto pele de porco da índia são bons modelos de membrana na substituição da pele humana e apresentam menores valores de variabilidade entre si. Concluíram ainda que a escolha do melhor modelo de membrana dependerá da proposta da investigação a ser realizada.

Na última década cresceu o interesse no uso da muda de pele de cobra como modelos substitutos da pele humana nos ensaios de avaliação *in vitro* da permeação cutânea de fármacos e, assim, pesquisadores tem avaliado sua aplicabilidade, obtendo resultados favoráveis (BABY *et al.*, 2007; ITOH *et al.*, 1990a; ITOH *et al.*, 1990b; RIGG e BARRY, 1990; WIDLER, SIGRIST e GAFNER, 2002). As mudas de pele de cobra são compostas por estrato córneo puro desprovido da epiderme viável e de folículos pilosos (RIGG, BARRY, 1990). Fornece barreira similar ao estrato córneo humano e pode ser obtida abundantemente sem a morte do animal, uma vez que a troca de pele (ou ecdise) ocorre regularmente no animal adulto, em geral a cada 2 a 3 meses. O fato de não conter tecidos vivos, não apresenta tendência à contaminação e degradação microbiológica, o que torna seu armazenamento facilitado (ITOH *et al.*, 1990a,b; WIDLER, SIGRIST, GAFNER, 2002).

WIDLER, SIGRIST E GAFNER (2002) demonstraram que as mudas de pele de cobra possuem similaridades com o estrato córneo humano, como: espessura do tecido (EC humano – 13 a 15 μm ; muda de pele de cobra – 10 a 20 μm); estrutura protéica (queratina do tipo α e β); composição lipídica (estrato córneo humano – 2,0 a 6,5%; muda de pele de cobra – aproximadamente 6,0%, envolvendo a presença de colesterol, ácidos graxos livres, glicoceramidas e fosfolipídeos, entre outros).

Em sua estrutura, a pele de cobra apresenta três camadas distintas, entre elas a camada mais externa composta de beta-queratina, uma camada intermediária também denominada de meso, composta de alfa-queratina intracelular, a qual é considerada similar ao estrato córneo humano e, ainda, uma camada lipídica intercelular denominada camada interna. Itoh e colaboradores (1990a) assim como Takahashi e colaboradores (1993) identificaram que a camada intermediária ou *meso* apresenta-se como o obstáculo principal à permeabilidade de substâncias.

A muda da pele de cobra é composta por duas regiões distintas, a região dorsal e a região ventral (**Figura 6**), na qual as escamas do dorso são menores com relação às escamas presentes na região ventral (HAIG *et al.*, 1988). Itoh *et al.*, 1990a compararam a eficiência de permeação da muda de pele de cobra *Elaphe obsoleta* com a pele humana, eles observaram que, considerando as similaridades entre as peles ensaiadas, a facilidade de estocagem e o manuseio, assim como o baixo custo de obtenção, as mudas de pele de cobra apresentaram-se como uma alternativa para a substituição da pele humana nas pesquisas *in vitro* de produtos transdérmicos.

Figura 6. Imagem das regiões dorsal e ventral da pele de mudas de cobra *Crotalus durissu*, generosamente doada pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto.

Pongjanyakul *et al.* (2002) observaram que o fluxo de evaporação da água das peles de cobra quando comparadas com a pele humana, também apresenta bastante semelhança, embora a permeabilidade da água através da pele de cobra de várias espécies é especialmente dependente das condições de habitat. No entanto, de maneira geral, existe uma grande similaridade na permeabilidade da água entre a muda de pele de cobra e o estrato córneo humano.

Baby *et al.* (2008) avaliaram a estabilidade física, físico-química, química e funcional de uma emulsão cosmética contendo rutina e propilenoglicol, como promotor de penetração cutânea, bem como a avaliação da penetração e da retenção cutânea *in vitro* do referido princípio ativo, empregando como modelo de biomembrana a muda de pele de cobra de *Crotalus durissu*. De acordo com os resultados encontrados, a emulsão não favoreceu a penetração cutânea da rutina, mas apenas sua retenção no estrato córneo da pele *Crotalus durissus*.

Nunes *et al.* (2005) utilizaram como barreira para a permeação *in vitro* da indometacina transdérmica, peles de cobra *Boa constrictor* e pele humana. Os

resultados indicaram estreita variação dos resultados de coeficiente de variação e na reprodutibilidade dos perfis de permeação. As regiões dorsais e ventrais da pele de cobra tem mostrado diferenças nas características de difusão (AIACHE *et al.*, 1998 e TAKAHASHI *et al.*, 2001).

1.5 PERMEACÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

Os ensaios *in vitro* de permeação cutânea tem se tornado um dos mais importantes estudos de administração tópica e transdérmicas de fármacos, tendo por objetivo a caracterização do perfil de permeação de formulações durante o desenvolvimento farmacotécnico, bem como no controle de qualidade lote a lote. (BARRY, 1983).

O procedimento *in vitro* para o estudo de permeação cutânea geralmente ocorre pela difusão do fármaco por gradiente de concentração, através da membrana, para uma solução receptora onde será realizada a determinação analítica do conteúdo de fármaco permeado ao longo do tempo. (ALLEN *et al.*, 2008).

A difusão do fármaco através da pele pode ocorrer por três caminhos distintos, sendo eles, através dos folículos pilosos associados às glândulas sebáceas; através dos ductos das glândulas sudoríparas e através do estrato córneo (**Figura 7**).

Figura 7. Modelo esquemático das vias de penetração cutânea (A) estrato córneo intracelular, (B) estrato córneo intercelular, (C) folículo piloso e (D) ducto sebáceo. (Thomas Spencer, 2009. www.aaps.com).

Estas diferentes rotas para permeação cutânea de fármacos foram debatidas por muitos anos. A contribuição da área de apêndices cutâneos para permeação de fármacos é praticamente negligível uma vez que apresenta 0,1% da área total de permeação cutânea, sendo este caminho importante para moléculas muito polares e para administração específica de fármacos no folículo piloso (BARRY, 2001).

Tregear (1961) and Wahlberg (1968) discutiram a influência do transporte folicular na permeação cutânea de fármacos. Elias *et al.* (1975) sugerem a rota intercelular do estrato córneo como sendo uma estrutura complexa, rica em lipídios, que podem desempenhar um importante papel no transporte percutâneo.

Todavia a penetração através do estrato córneo ocorre principalmente através de duas vias, sendo elas: a via intercelular, onde o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos pela matriz lipídica intercelular; e via transcelular, onde o fármaco atravessa os corneócitos e a matriz lipídica.

Sendo a rota de permeação através dos canais intercelulares significativo para o transporte de fármacos através da pele, pode-se inferir que o empilhamento dos corneócitos no estrato córneo poderá ditar o comprimento do percurso da difusão do ativo pela pele (CHRISTOPHERS *et al.*, 1974). Desta forma, a resistência ao transporte através do estrato córneo depende do arranjo e das propriedades das camadas alternadas hidrofóbicas e hidrofílicas do estrato córneo, bem como de sua espessura, a qual varia de espécie para espécie e de região do corpo em um mesmo indivíduo. Vários relatos da literatura descrevem a influência destes fatores na permeação cutânea. Rothman (1943) apresentou a comunidade científica um artigo de revisão na qual demonstrou que o veículo de apresentação do ativo, assim como os lipídeos da pele, apresenta um significativo impacto nas taxas de absorção e permeação de fármacos. Hadgraft (2005), também em um artigo de revisão da literatura científica, demonstrou que a permeabilidade da pele pode variar de região para região. Smith *et al.* (1961) demonstraram uma maior permeabilidade usando pele da região escrotal quando comparada com pele da região abdominal para uma série de fármacos estudados. A alta permeabilidade desta região tem sido utilizada em sistemas transdérmicos contendo testosterona. Um dos estudos mais abrangentes da variação regional na permeabilidade da pele foi realizada por Feldmann e Maibach (1967), os quais demonstraram a alta permeabilidade da pele escrotal utilizando cortisol como fármaco modelo (FELDMANN e MAIBACH, 1967).

Outros artigos de revisões bibliográficas sobre permeabilidade cutânea receberam destaques durante a década de 50 (DAVIES, 1950; VALLETTE, 1953; HADGRAF & SOMERS, 1956; TREHEME, 1956). Os avanços na pesquisa científica e entendimento do processo de permeação de fármacos através da pele durante a década de 50 e 60 ocorreram devido esforços para compreender as propriedades da composição das barreiras de permeação na pele e como estas propriedades podem ser modificadas de forma sistemática e reversível.

1.5.1. Fatores físico-químicos envolvidos na permeação cutânea

Os conceitos fundamentais que definem o papel da físico-química na difusão de fármacos através da pele e modelos matemáticos para avaliação do processo de permeação cutânea se mantiveram em evidência durante os anos 60 com influentes trabalhos publicados por Higuchi (1960,1961 e1962).

Um princípio físico químico demonstrado por Higuchi (1960) destaca a influência da atividade termodinâmica na permeação cutânea de fármacos. Coldman *et al.* (1969), seguindo estes conceitos, desenvolveram formulações tópicas com solventes voláteis. Com o solvente evaporado, o veículo tornou-se supersaturado e promoveu uma maior atividade transitória termodinâmica (ou potencial químico). Este foi o precursor de muitos dos trabalhos realizados nos anos de 1990.

O avanço crescente na compreensão do processo de permeação transdérmica é resultado de pesquisas com aplicação de técnicas biofísicas sensíveis e sofisticadas. No entanto, é evidente que algumas destas técnicas são aplicadas a mais de 30 anos atrás. Por exemplo, Puttnam (1972) utilizou a técnica de infravermelho (ATR) para examinar a pele *in vivo*. Esta técnica também foi utilizada para verificar a ação de componentes do veículo na superfície da pele (FISCHMEISTER *et al.*, 1975).

No início dos anos 70 foram descritos estudos para medir a condutividade da pele por medidas de impedância (WOOLLEY-HART, 1972a,b) e no final desta mesma década a aplicação da ressonância magnética nuclear (RMN) com sonda de difusão no estrato córneo promovendo a identificação de várias formas de água, foram relatados (FOREMAN, 1976; FOREMAN *et al.*, 1979; PACKER & SELLWOOD, 1978a,b). Ao mesmo tempo a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para investigar detalhes ultra-estruturais da pele (BRODY, 1977), inclusive em estudos mais recente (BENTLEY *et al.*, 1997).

1.6 SISTEMAS TRANSDÉRMICOS DE NICOTINA: nicotina como fármaco modelo

Os sistemas de liberação transdérmica para nicotina vem sendo muito utilizados em protocolos para clínicas e diretrizes terapêuticas com a substituição da nicotina na dependência ao uso do cigarro (FANT *et al.*, 1999, SAUL *et al.*, 2007). A nicotina apresenta diversas características que a tornam um fármaco ideal para sistemas de liberação transdérmica. É uma base diprótica com $pK_{a1} = 3.12$ (anel piridina) e $pK_{a2} = 8.02$ (anel pirrolidina), cuja estrutura esta apresentada na **Figura 8**. É altamente solúvel em solventes polares e apolares, apresenta baixa massa molecular, o que a torna teoricamente um eficiente penetrante (SARA *et al.*, 1999).

Figura 8. Estrutura molecular da nicotina (www.quimicaorganica.net)

Em 1809, Vauquelin, um cientista francês foi a primeira pessoa que identificou a molécula de nicotina. Este notou a volatilidade e a atividade alcalóide no estrato do tabaco. Somente em 1828 foi possível seu isolamento e purificação por Poselt e Reimann na Universidade de Heidelberg. Estes deram o nome à nicotina em honra a Jean Nicot, uma das primeiras pessoas que importou tabaco para a França vindo da "Índia Ocidental", em 1560. (FANT *et al.*, 1999).

Já em 1843 e 1847, foi estabelecida por Melsens a fórmula molecular empírica para a nicotina: $C_{10}H_{14}N_2$, e por Schloesing o seu massa molecular: 162,23

g.mol^{-1} . Somente em 1895, Adolf Pinner propôs a estrutura da nicotina conhecida atualmente (**Figura 8**).

A absorção da nicotina através das membranas celulares depende do pH. Admitindo que o pKa_2 da nicotina é em torno de 8.5, em pH ácido a nicotina está ionizada, não atravessando facilmente as membranas. Todavia em pH fisiológico ($\text{pH} \sim 7,4$), 31% da nicotina encontra-se na forma não ionizada, atravessando facilmente as membranas (SVERSSON, 1987).

Na sua forma básica, a nicotina é fortemente alcalina e facilmente solúvel tanto em água como em lipídeos. Na sua forma ionizada, a nicotina é mais difícil de ser absorvida. Por isso, meios alcalinos, nos quais a nicotina está menos ionizável, aumentam a sua biodisponibilidade. Nos fumantes, a nicotina é administrada por via oral. Nas pessoas que não inalam o fumo do tabaco, a principal via de administração da nicotina é através da mucosa nasal. No entanto, a absorção através desta via é altamente dependente do pH (BENOWITZ 1986, SVERSSON 1987).

Os fumantes que inalam o fumo do cigarro conseguem uma maior absorção de nicotina através das vias aéreas de pequeno calibre e dos alvéolos, independentemente do pH, sendo que o mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está totalmente elucidado (SARA *et al.*, 1999).

A terapia de reposição ou substituição do cigarro com nicotina é considerada um método seguro no tratamento da dependência ao fumo, é o mais popular e o menos dispendioso. Quando comparada com placebo, é mais efetiva, influenciando também a frequência das recaídas (BENOWITZ *et al.*, 1998, STAPLETON *et al.*, 1995 e HUGHES *et al.*, 1999). Esse tratamento pode ser aplicado por quatro formas de apresentação do produto com nicotina: a goma de mascar, o sistema transdérmico, o spray nasal e o vaporizador oral (RIGOTTI *et al.*, 1999).

No Brasil estão disponíveis a goma de mascar e o adesivo transdérmico de nicotina. O aconselhamento que acompanha a terapia de reposição com nicotina não é intensivo e, quando administrados em adultos saudáveis, tem produzido resultados positivos (JORENBY *et al.*, 1996; SHIFFMAN *et al.*, 1997). O uso desta terapia alivia os sintomas da síndrome de abstinência (RIGOTTI *et al.*, 1999;

ROUSSEL *et al.*, 1997). A remissão do uso pode durar seis meses ou mais com esse tratamento (FOULDS *et al.*, 1993).

Quando se associa a terapia de reposição de nicotina a outros recursos terapêuticos (aconselhamento ou outra medicação), a efetividade do tratamento pode aumentar (RIGOTTI *et al.*, 1999).

No momento, um dos medicamentos considerados como de primeira linha no tratamento da dependência à nicotina utilizados no Brasil são os adesivos de TTSs contendo nicotina (Ministério da Saúde, 2001). Estão disponíveis comercialmente, adesivos de 7 mg, 14 mg, 21 mg de nicotina ativa, com utilização pelo prazo médio de oito semanas. Essa forma de reposição de nicotina é a mais indicada, pois apresenta menos efeitos colaterais.

A redução da dose é progressiva por até um ano. Os adesivos devem ser trocados a cada 24 horas e não impedem que o indivíduo faça esporte. Tem como efeito colateral mais comum a presença de irritações de pele que podem impedir a continuidade do tratamento. No Brasil, o único medicamento para terapia de substituição do tabaco na forma de adesivo transdérmico comercializado, é o NiQuitinTM.

Estes adesivos estão disponíveis em três dosagens: 21 mg, contendo 114 mg de nicotina sendo liberado 21 mg/dia; 14 mg, contendo 78 mg de nicotina sendo liberado 14 mg/dia e ainda 7 mg, contendo 36 mg de nicotina sendo liberado 7 mg/dia de nicotina. Cada dosagem está disponível em embalagens de 7 ou 14 adesivos (conjuntos para uma ou duas semanas), em cartelas individuais.

Cada adesivo de NiQuitinTM apresenta em sua composição diferentes camadas compostas por copolímero de acetato de vinil etileno, tereftalato de polietileno/acetato de viniletetileno, poliisobutileno, película de polietileno, película de poliéster siliconizada e tinta de impressão (www.niquitin.com.br).

O adesivo deve ser aplicado na pele, fazendo um rodízio do local da aplicação a cada 24 horas. Na mulher, deve-se evitar colocá-lo no seio, e no homem, evitar colocá-lo em região que apresente pelos. A região deve estar

protegida da exposição direta do sol, porém, não há restrição quanto ao uso na água (BU0201/02).

Os efeitos colaterais mais comuns nos grupos tratados com NiQuitin™ foram geralmente do tipo sonhos anormais, artralgia, constipação, secura da boca, aumento da tosse, insônia, mialgia, náuseas e faringite. Aquelas que podem estar relacionadas à nicotina são: sonhos anormais, secura da boca, dispepsia, insônia e náuseas. Aquelas que podem estar relacionadas com a suspensão do uso do fumo incluem artralgia, constipação, síndrome do resfriado, mialgia e faringite (BU0201/02).

Face ao exposto na revisão bibliográfica, torna-se válida a pesquisa de métodos *in vitro* de liberação e análises comparativas entre eles, visando estipular critérios específicos para a melhor escolha na utilização de métodos e aparatos para os estudos *in vitro* de liberação e permeação tópica e transdérmica de fármacos. Os sistemas de liberação transdérmica de nicotina podem ser considerados modelos para esta pesquisa.

6. CONCLUSÕES

A metodologia analítica proposta para quantificação da nicotina após ensaios *in vitro* de liberação, permeação e retenção cutânea, se mostrou eficaz, sensível, precisa, exata e robusta para a devida proposta.

Com os resultados de liberação da Nicotina a partir de adesivos transdérmicos, avaliando-se diferentes fatores na variabilidade dos ensaios de liberação de fármacos, foi possível selecionar o mais adequado meio receptor e a velocidade de agitação do meio receptor. Nestes ensaios foi possível obter maior reprodutibilidade de análise e maior liberação da nicotina quando utilizado o método de VDC em sistema estático, utilizando meio receptor alcalino, indicando que nem sempre as especificações determinadas na Farmacopéia Americana, garantem a metodologia mais indicada para a necessidade de cada ensaio e medicamentos.

A verificação da não variabilidade dos resultados de permeação lote a lote do medicamento, foi de grande importância, uma vez que foi demonstrada a equivalência farmacêutica no perfil de liberação de todos os lotes selecionados para os ensaios *in vitro* de liberação, permeação e retenção cutânea.

Os resultados obtidos com o uso dos fatores de diferença (f_1) e semelhança (f_2) para avaliação do perfil de liberação da nicotina presente em adesivos transdérmicos foram compatíveis aos resultados obtidos quando foi utilizado o modelo estatístico One-Way ANOVA não paramétrico, admitindo $p > 0.05$. Isto demonstrou que a eficiência do uso do método matemático modelo independente f_1 e f_2 não somente para comparar perfis de liberação de formas farmacêuticas sólidas orais, mas também para avaliar perfil de permeação comparativo oriundos de adesivos transdérmicos.

Os ensaios de liberação da nicotina na ausência de membrana utilizando VDC tanto em sistema estático como em fluxo contínuo, apresentaram resultados semelhantes com aqueles obtidos com o método indicado pelo FDA, tanto em quantidades liberadas em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ como em fluxo (J) até 8 horas. Isto indica que o uso do método VDC e FDA para ensaios *in vitro* de liberação de fármacos em adesivos transdérmicos podem ser intercambiáveis.

Os resultados de permeação da nicotina através de membranas biológicas indicaram que a liberação da nicotina presente em adesivos transdérmicos NiQuitinTM é dependente de membrana. Peles de camundongo sem pelos, assim como pele de mudas de cobra, apresentaram maior reprodutibilidade quando comparado com a pele de orelha de porco, indicando que o controle de idade, sexo e alimentação dos animais utilizados, podem ser fatores significativos na repetibilidade dos resultados. Todavia os valores de coeficiente de variação apresentados estão adequados aos parâmetros estipulados nas diretrizes do SCCP onde o coeficiente de variação deve ser inferior a 30% para um experimento contendo $n = 6$ (SCCP, 2006).

Ensaio de retenção cutânea, tanto pelo método convencional de *tape stripping*, como por mapeamento de profundidade, demonstraram a importância da partição da nicotina em todas as camadas da pele para favorecer a permeação através da pele.

Os resultados deste projeto podem indicar o uso da VDC em sistema estático e com fluxo contínuo como métodos satisfatórios para ensaios *in vitro* de liberação e permeação cutânea de medicamentos de liberação transdérmica, podendo ser aplicados tanto em pesquisas de desenvolvimento de formulações, como no controle de qualidade e nos estudos de equivalência farmacêutica para medicamentos genéricos de administração transdérmica.

Os dados obtidos neste estudo poderão auxiliar nas discussões em torno dos medicamentos genéricos no Brasil, influenciando nas diretrizes para testes de Equivalência Farmacêutica e Controle de Qualidade dos medicamentos transdérmicos, tanto para a padronização do modelo de aparato a ser utilizado como também na proposição de modelos matemáticos de comparação de perfis de liberação.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA, NBR 6023

ABDOU H. M. Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence. Easton: **Mack Publishing Company** pg 544, 1989.

ABRAHAM M.K., CHADHA H.S., MITCHELL R.C. The factors that influence skin penetration of solutes. **J. Pharmacol.**, v.47, p.8-16, 1995.

ABUZARUR-ALOUL, R.; GJELLAN K.; SJOLUND M.; LOFQVIST M. GRADDNER. C. Critical dissolution test of oral systems based on statistically designed experiments. I: Screening of critical fluids and *in vitro/in vivo* modeling of extended release coated spheres. **Drug Dev. Ind. Pharm.** New York, v 23, 8, pg 749-760, 1997.

AIACHE, J. M. Los aparatos de estudios de velocidad de dissolution of farmacos desde formas no orales. In: Arancibia, A. Pezoa, R. eds. Biodisponibilidad de Medicamentos: **Simposio Internacional I. Santiago**: Editorial Universitária, 125-149, 1992.

AIACHE, M.; CHANET, L.; BEYSSAC, E; HAIGER, M.J. *In vitro* permeation of progesterone from a gel through the shed skin of three different snake species. *International Journal of Pharmaceutical* 170:151-156, 1998.

ALLEN JR., LOYD V. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos/ LOYD V. ALLEN JR., NICHOLAS G. POPOVICH, HOWARD C ANSEL; tradução Elenara Lemos Senna, 8 ed., Porto Alegre, Artmed, 2007.

ANSEL C. HOWARD, NICHOLAS G. POPOVICH AND LOYD V. ALLEN Jr. **Pharmaceutical Dosage forms and Drug Delivery Systems** – 6^o Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, EUA, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS, NBR 6023: informações e documentações, referencias:elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AYMAN EL-KATTAN, CHARLES S. ASBILL AND SAM HAIDAR. Transdermal testing: practical aspects and methods. PSTT Vol. 3 (12), 2000.

BABY A. R, CARLOS ALBERTO HAROUTIOUNIAN-FILHO, FERNANDA DAUD SARRUF, CARLOS ROBERTO TAVANTE-JÚNIOR, CLAUDINÉIA APARECIDA SALES DE OLIVEIRA PINTO, VIVIAN ZAGUE, ELIZABETH PINHEIRO GOMES ARÊAS, TELMA MARY KANEKO, MARIA VALÉRIA ROBLES VELASCO. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 44, n. 2, abr./jun., 2008.

BABY AR, LACERDA ACL, KAWANO Y, VELASCO MVR, LOPES OS, KANEKO TM PAS-FTIR and FT-Raman qualitative characterization of sodium dodecyl sulfate interaction with an alternative stratum corneum model membrane. **Pharmazie**, v.62, 10: 727-731, 2007.

BABY AR, LACERDA ACL, KAWANO Y, VELASCO MVR, LOPES OS, KANEKO TM. Evaluation of the interaction of surfactants with stratum corneum model membrane from *Bothrops jararaca* by DSC. **Int. J. Pharm.**, v.317, 1: 7-9, 2006a.

BABY AR, LACERDA ACL, KAWANO Y, VELASCO MVR, LOPES OS, KANEKO TM Spectroscopic studies of stratum corneum model membrane from *Bothrops jararaca* treated with cationic surfactant. **Colloid. Surf. B Biointerfaces**, v.50, 1: 61-65, 2006b.

BANAKAR, U.V. Pharmaceutical Dissolution Testing. New York, **Marcel Dekker Inc**, pg 437, 1992.

BARRY B.W, Dermatological Formulation. Percutaneous absorption. **Drug and Pharmaceutical Science**. New York: Marcel Dekker, v 50, p.480, 1983.

BENOWITZ NL. Nicotine safety and toxicity. New York: Oxford **University Press**; 1998.

BHATT, P.P., RYTTING, J.H., TOPP, E.M. Influence of azone and lauryl alcohol on the transport of acetaminophen and ibuprofen through shed snake skin. **Int. J. Pharm.** 72, 219–226, 1991.

BHATTACHAR, S.N., RYTTING, J.H., ITOH, T., NISHIHATA, T. The effects of complexation with hydrogenated phospholipid on the transport of salicylic acid, diclofenac and indomethacin across snake stratum corneum. **Int. J. Pharm.** 79, 263–271, 1992.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária RE nº 310 de 01 de setembro de 2004. Guia para realização de ensaios de equivalência farmacêutica com perfil de dissolução para FFSO.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária RE nº 893 de 29 de maio de 2003. Guia para realização de alterações, inclusão e notificações pós registro de medicamentos.

BRASIL. Resolução R.E. n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”.

BRITISH PHARMACOPEIA 2009. London v. 2: Her Majesty’s Stationery Office.

BRONAUGH, R.L.; STEWART, R.F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 73, p. 1255-1258, 1985.

BU0201/02- Bula do Medicamento NiQuitin™

BUYUKTIMKIN, S., BUYUKTIMKIN, N., RYTTING, J.H. Synthesis and enhancing effect of 2-(*N,N*-dimethylamino) propionate on the transepidermal delivery of indomethacin, clonidine and hydrocortisone. **Pharm. Res.** 10, 1632–1637, 1993.

CHOWDARY, K.P.R., RAJYALAKSHMI Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharm. New Delhi**, v.30, 350, pg51-54, 1987.

CIOLINO LA, TURNER JA, MCCAULEY HA, SMALLWOOD AW, YI TYJ. Optimization study for the reversed-phase ion pair liquid chromatographic determination of nicotine in commercial tobacco products. **J Chromatography A**. v.852, (2): 451-463, 1999.

EL TAYAR, N.; RUEY-SHIUAM, T.; TESYA, B.; CARUPT, P.A. Percutaneous of drugs: A quantitative structure-permeability relationship study. **Journal Pharmaceutical Science**. 80:744-749, 1991.

ELVIRA ESCRIBANO, ANA CRISTINA CALPENA, JOSEP QUERALT, ROSSEND OBACH AND JOSE DOMÉNECH. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol 19 (4) pga 203-210, 2003.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 2004, 5^o Ed. v.2 Council of Europe: France, Strasbourg.

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

FANT V. R.; LUCY L. O. D.; JACK E. H. Nicotine replacement therapy. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, Oxford, v 26, Issue 3, pg. 633-652, 1999.

FARE H.M.; ZATZ J.L. Measurement of drug release from topical gels using two types of apparatus. **Pharm. Tech.** 19 (1), pg 52-58, 1995.

FARMACOPÉIA AMERICANA –USP 29, Rockville, 2006.
FARMACOPÉIA EUROPEIA – 4^o Ed. France, 2002.

FDA - Guidance for industry: SUPAC-SS Nonsterile Semisolid Dosage forms. Scale-up and Post approval changes: Chemistry, manufacturing and controls: *in vitro* release testing and *in vivo* Bioequivalence Documentation , may 1997.

FDA - Guidelines for dissolution testing of solid oral products. **Drug Inf. J.** Philadelphia, v 30, pg1071-1784, 1996.

FDA. Guidance for industry: SUPAC-SS Nonsterile semisolids dosage forms. Scale-up and post approval changes: chemistry, manufacturing and controls: *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation. 1999.

FLEEKER, C., WONG, O., RYTTING, J.H. Facilitated transport of basic and acidic drugs in solutions through snake skin by a new enhancer—dodecyl *N,N*-dimethylamino acetate. **Pharm. Res.** 6, 443–448, 1989.

FLYNN C.L.; SHAH V.P.; TENJARLA S.N. et. al. Assessment of value and applications of *in vitro* testing of topical dermatological drug products. **Pharm. Res.** 16, pg 1325-1330, 1999.

FOULDS J, STAPLETON J, HAYWARD M, RUSSELL MAH, FEYERABEND C, FLEMING T, et al. Transdermal nicotine patches with low-intensity support to aid smoking cessation in outpatients in a general hospital. **Arc. Fam. Med.**, 2:417-23, 1993.

FRANZ J.T. Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 64, p. 190-195, 1975.

FU LU, M., LEE, D., SUBBA RAO, G. Percutaneous absorption enhancement of leuprolide. **Pharm. Res.** 9, 1575–1579, 1992.

GAO S, SINGH J. Effect of oleic acid/ethanol and oleic/propylene glycol on the *in vitro* percutaneous absorption of 5-fluorouracil and tamoxifen and the macroscopic barrier property of porcine epidermis. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v 165, p. 45-55, 1998.

GARCIA F. S.; TEDESCO A. C.; COLLETT J.H.; BENTLEY M. L.V. Topical Delivery System for ZnPcSO₄ based on Liquid Crystalline phases for use in PDT of skin Cancer. Controlled Release Society - 31 st **Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society**, v.1 p. 320-320, 2004.

GORDON L. FLYNN. Fundamental Concepts of *in vitro* Release. AAPS-FDA Workshop on Assessment of value applications of *in vitro* release testing of topical dermatological drug products, sept 1997.

GUIDELINES Mental and Behavioural Disorders. Clinical descriptions and diagnostic guideliness, 1992.

HADGRAFT J, LEWIS D, BEUTNER D AND WOLFF MH. "In vitro assessments of transdermal devices containing nytrolycerin." International Journal of Pharmaceutics, (73) 125-130, 1991.

HADGRAFT, J. Skin deep. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Amsterdam, v.58, n.2, p.291-299, 2004.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.224, n.1/2, p.1-18, 2001.

HADGRAFT, J.; RIDOUT, G. Development of model membranes for percutaneous absorption measurements. I. Isopropyl myristate. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.39, n.1/2, p.149-156, 1987.

HAIGH JM, SMITHEW EW 1994. The selection of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.2 (5/6): 311-330, 1994.

HAIGH, J.M.; BEYSSAC, E.; CHANET, L.; AIACHE, J.-M. *In vitro* permeation of progesterone from a gel through the shed snake skin of three different species. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.170, n.2, p.151-156, 1998.

HANSON RESEARCH COORPORATION – WWW.hansonresearch.com

HIRVONEN, J., RYTTING, J.H., PARONEN, P., URTTI, A. Dodecyl *N,N*-dimethylamino acetate and Azone enhance drug penetration across human, snake and rabbit skin. **Pharm. Res.** 8, 933–937, 1991.

HUGHES JR, GOLDSTEIN MG, HURT RD, SHIFFMAN S. Recent advances in the pharmacotherapy of smoking. **JAMA** ;281(1):72-6, 1999.

ITOH T, XIA J, MAGAVI R, NISHIHATA T, RYTTING JH. Use of shed snake skin as a model membrane for in vitro percutaneous penetration studies: comparison with human skin. **Pharm. Res.**, v.7, (10):1042-1047, 1990a.

ITOH T, MAGAVI R, CASADY RL, NIISHIHATA T, RYTTING JH. A method to predict the percutaneous permeability of various compounds: shed snake skin as a model membrane. **Pharm. Res.** v.7, (12):1302-1306, 1990b.

J. KEMKEN, A. ZIEGLER, B. W. MIILLER, **J. Pharm. Pharmacol.**, 43, 679, 1991.

JENNING V, GYSLER A, SCHAFER-KORTING M, GOHLA S H. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v 49, p.211-218, 2000.

JIA-YOU FANG, TSONG-LONG HWANG, CHIA-LANG FANG AND HSIEN-CHIH CHIU. *In vitro* and *in vivo* evaluations of the efficacy and safety of skin permeation enhancers using flurbiprofen as a model drug. **International Journal of Pharmaceutics**, vol 255 (1-2) pgs 153-166, 2003.

JOENBY DE, HATSUKAMI DK, SMITH SS, FIORE MC, ALLEN S, JENSEN J, *et al.* Characterization of tobacco withdrawal symptoms: transdermal nicotine reduces hunger and weight gain. **Psychopharmacol.**, 128(2):130-138, 1996.

JORGENSEN, E. D.; BHAGWAT, D. Development of dissolution tests for oral extended-release products. **PSTT**, Amsterdam, v.1, n.3, p.128-135, 1998.

JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO J. Histologia Básica. Tradução da Histologia Básica, 8º Ed. Editora Guanabara Koogan – Rio de Janeiro, 1995.

LOFFLER H, DREHER F, MAIBACH HI. Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. **Br J. Dermatol.**, 151: p. 746-752, 2004.

LOPES B. L.; COLLET J.H. BENTLEY M.V.L.B. Topical delivery of cyclosporin A: an *in vitro* study using monoolein as a penetration enhancer **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v 60, (1), Pg 25-30, 2005.

LOPES, R.F.V.; BENTLEY, M.V.L.; DELGADO-CHARRO, M.B.; GUY, R.H. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. **Pharm. Res.**, New York, v. 18, p. 311-315, 2001.

M. AKAZAWA, T. ITOH, K. MASAK, B.T. NGHIEM, N. TSUZUKI, R. KONISHI, T. HIGUCHI. **Int. J. Pharm**, 50,53, 1989.

MANADAS R.; PINA M. EM; VEIGA F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Rev. Brás. Cien. Farm.** São Paulo v. 38, nº4, pg 375-399, 2002.

MARCOLONGO R. & STORPIRTIS S. Dissolução de Medicamentos fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. **In press**. Tese de Mestrado da FCF-USP, 2003.

MEGRAB NA, WILLIAMS AC, BARRY BW. Estradiol permeation across human skin, silastic and snake skin membranes: the effects of ethanol/water cosolvent systems. **Int. J. Pharm.** v.116 (1):101-112, 1995.

NOYES A.A.; WITHNEY, W.R.; The rate of solution of solid substances in their own solutions. **J. Am. Chem. Soc.** V. 19, pg 930-934, 1897.

OECD. Guideline for the testing of chemical, n°428. Skin Absorption: *In vitro* Method, Paris, France, 2004.

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

PEREIRA G. R.; COLLET, J.H.; BENTLEY, M.V.L. B. Effect of GMO\Propyleneglycol systems on *in vitro* nicotine's skin permeation. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 13, s.1, p. s1131 – s132, 2001.

PHARMACOPEIAL FORUM 2009. Topical and transdermal drug products – Products quality tests, vol 35 (3) May-June, 2009.

PONGJANYAKUL T, PRAKONGPAN S, PANOMSUK S, PUTTIPIPATKHACHORN S, PRIPREM A. Shed king cobra and cobra skins as model membranes for in vitro nicotine permeation studies. **J. Pharm. Pharmacol.** v.54 (10): 1345-1350, 2002.

PONGJANYAKUL, T.; PRAKONGPAN, S.; PRIPREM, A. Permeation studies comparing cobra skin with human skin using nicotine transdermal patches. **Drug Development Industrial Pharmacy** 26:635-642, 2000.

RIBANI M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova.** vol 27, (5) p.771-780, 2004.

RICHARD GH AND JONATHAN HADGRAFF. **Journal of Controlled Release** 4: 237-251. 1987.

RIGG, P.C.; BARRY, B.W. Shed snake skin and hairless mouse skin as a model membrane for human skin during permeation studies. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v.94, n.2, p.235-240, 1990.

RIGOTTI NA, ARNSTEN JH, MCKOOL KM, WOOD-REID KM, SINGER DE, PASTERNAK RC. The use of nicotine-replacement therapy by hospitalized smokers. **Am. J. Prev. Med.** 17(4):255-259, 1999.

ROUSSEL G, ROCHE D, MOMAS I, BRAHIMI N, CALLAIS F, LEQUANG NT, *ET AL.* Usefulness of markers in managing tobacco withdrawal. **Pathol. Biol.**, 45(6):467-471, 1997.

SARA ZORIN, FREDRIK KUYLENSTIERNA and HANS THULIN, *In vitro* test do Nicotine's permeability through human skin. Risk evaluation and Safety Aspects. **Ann. Occup. Hyg**, vol 43 n°6, 405-413, 1999.

SARTORELLI P.; ANDERSEN H.R.; ANGERER J.; CORISH J.; DREXLER H.; GOEN T.; GRIFFIN P.; HOTCHKISS S.A.M.; LARESE F.; MONTOMOLI L.; PERKINS J., SCHMELZ M.; VAN de SANDT J.; WILLIAMS F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Enviroment Toxicol. Pharmacol.**, Amsterdam, v.8, p. 133-152, 2000.

SAUL SHIFFMAN; STUART FERGUSON; STEPHEN HELLEBUSCH. Physician's counseling of patients when prescribing nicotine replacement therapy. **Addictive Behaviors**, Oxford, v 32, Issue 4, pg. 728-739, 2007.

SCCP 0970/06. Opinion on Basic Criteria for the *In vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. Scientific Committee on consumer Products, Adopted by the SCCP, 28 march, 2006.

SCHOMOOK F.P.; MEINGASSNER J.G.; BILLICH A. Comparison of human skin or epidermis models with humana skin and animal skin *in vitro* percutaneous absorption. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 215, p. 51-56, 2001.

SHAH P VINOD, JEROMES S ELKINS AND ROGER L WILLIAMS. Evaluation of the test system used for *in vitro* release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharmaceutical Development and Technology** 4: 377-385, 1999.

SHAH V.P.; ELKINS J. *In vitro* release from glucocorticosteroid ointments. **J. Pharm. Sc.** Washington, 84, pg 1139-1140, 1995.

SHAH V.P.; ELKINS J.S.; WILLIAMS R.L. Evaluation of the test system used for *in vitro* release of drugs from topical dermatological drug products. **Pharm. Develop. Technol.**, pg 377-385, 1994.

SHIFFMAN S, GITCHELL J, PINNEY JM, BURTON SL, KEMPER KE, LARA EA. Public health benefit of over-the-counter nicotine medications. **Tobacco Control** 6(4):306-10, 1997.

SIEWERT M.; DRESSMAN J.; BROWN C.; SHAH V.P. FIP/AAPS Guidelines for dissolution *in vitro* release testing of novel/special dosage forms. **Dissol. Tech.**, v. 10, nº1 pg 6-15, 2003.

SINKO PATRICK J. MARTIN. Físico farmácia e ciencias farmaceuticas/Patrick J. Sinko; tradução George Gonzales Ortega, *et al.* – 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

SKOUG J.W.; HALSTEAD G.W.; THEIS D.L.; FFREEMAN J.E.; FAGAN D.T.; ROHRS B.R. Strategy for the development and validation of Dissolution tests for solid oral dosage forms. **Pharm. Technology**, p. 58-72, Amsterdam, 1996.

STAPLETON J, RUSSELL M, FEYRABEND C, WISEMAN S, *et al.* Dose effects and predictors of outcome in a randomized trial of transdermal nicotine patches in general practice. **Addict.** 90:31-42, 1995.

SUH, H., JUN, H.W. Effectiveness and mode of action of isopropyl myristate as a permeation enhancer for naproxen through shed snake skin. **J. Pharm. Pharmacol.** 48, 812– 816, 1996.

TAKAHASHI, K., TAMAGAWA, S., KATAGI, T., RYTTING, J.H., NISHIHATA, T., MIZUNO, N. Percutaneous penetration of basic compounds through shed snake skin as a model membrane. **J. Pharm. Pharmacol.** 45, 882–886, 1993.

TAKAHASHI, K.; SAKANO, H.; RYTTING, J.H.; NUMATA, N.; KURODA, S.; MIZUNO, N. Influence of pH on the permeability of p-toluidine and aminopyrine through shed skin as a model membrane. **Drug Development Industrial Pharmacy** 27:159-164, 2001.

TAKAHASHI, K.; TAMAGAWA, S.; KATAGI, T.; RYTTING, J.H.; NISHIHATA, T.; MIZUNO, N. TURUNEN, T.M., BUYUKTIMKIN, S., BUYUKTIMKIN, N., URTTI, A., PARONEN, P., RYTTING, J.H. Enhanced delivery of 5-fluorouracil through shed snake skin by two new transdermal penetration enhancers. **Int. J. Pharm.** 92, 89–95, 1993.

UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 31. The National Formulary: NF22. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

USP 29, UNITED STATES PHARMACOPEIA. 29.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

WAGNER, J. G. Biopharmaceutics and Relevant Pharmacokinetics. Hamilton: **Drug Intelligence Publications**, pg 375, 1971.

WIDLER N, SIGRIST A, GAFNER FM. Lipid analysis and transepidermal water loss in snakes. **IFSCC Magazine** v.5 (1): 24-29, 2002.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. *Adv. Drug Delivery Rev.*, Amsterdam, v.56, n.5, p.603- 618, 2004.

WONG, O., HUNTINGTON, J., NISHIHATA, T., RYTTING, J.H. New alkyl *N,N*-dialkyl-substituted amino acetates as transdermal penetration enhancers. *Pharm. Res.* 6, 286–295, 1989.

ZATZ, J.L. *Skin permeation*. Fundamentals and application. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 300p, 1993.