UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação biofarmacotécnica de formulações dermatológicas semi-sólidas de cetoconazol

Zaida Maria Faria de Freitas

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Storpirtis

São Paulo

2005

DEDICATÓRIA

Ao meu pai que me ensinou a ser perseverante.
À minha mãe que me ensinou que cada dia é único.
Com os irmãos, Luciano, Álvaro e Cristiano, aprendi que cada dia é uma conquista.
No sorriso dos sobrinhos, a certeza do amanhã..

Com Levi aprendi que o companheirismo é a essência do dia a dia.

Obrigada pela compreensão nos momentos de ausência...

A Deus que está sempre em meu coração.

ERRATA:

Possui falha das páginas 49-55, apenas na numeração, não está faltando conteúdo.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Silvia Storpirtis, pelo aceite da orientação, pelo gratificante aprendizado e carinhosa amizade.

À Professora Dra. Nádia Volpato, pelos muitos momentos de paciência e grande amizade.

À Professora Dra. Elisabete Pereira dos Santos, pelo apoio, sincera amizade, companheirismo em muitos momentos.

À Professora Dra. Lúcia Maria Azevedo, pela participação como investigador clínico nos estudos *in vivo*.

À Professora Dra. Chang Chiann pelo importante tratamento estatístico dos dados dos estudos *in vivo* e ótimas considerações.

Ao Professor. Dr. Lucas A.M. Ferreira e sua aluna Alessandra C. Ayub pelo aprendizado da técnica de separação da pele suína.

Às Professoras Rita e Márcia, às farmacêuticas Gláucia, Cleonice, Naira e aos funcionários da Farmácia Universitária Milton, Maria Amélia, Vicente, Ricardo, Paulo, Orcalino, Carlos Roberto, Carlos, Oacir pelo apoio e brilhante desempenho durante minha ausência.

Aos Professores Maurício, Valéria e Sheila pelo apoio e carinho recebidos durante a elaboração deste trabalho.

À Professora Carla Holandino e Venício Vega pela amizade e apoio durante este aprendizado.

Aos companheiros do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos Márcio, Joana, Márcio, Ana, Edilene, Mariana, Bianca, Lais, Vivian, pelo apoio, carinho e convivência.

À querida amiga Aline Varjão pelos muitos momentos de companheirismo e incentivo.

À Eliane Velasco, amiga querida, pela amizade e carinho.

À Angélica Loures pelo carinho e atenção durante a elaboração deste trabalho.

À Carolina Bemvindo pela colaboração como bolsista na etapa inicial deste trabalho.

Aos meus queridos amigos Paulo, Mônica, Anna Beatriz, Déia, Adriana, Rubens, pelos muitos momentos de compreensão, amizade sincera, carinho em momentos difíceis.

Aos meus queridos amigos Antônio, Therezinha, Paulo, Rodrigo, Leal, Jane, Daphene pelos momentos de alegria e descontração que passamos juntos.

Ao amigo Antônio Eduardo Bordalo Riedlinger Mont'Alverne pelo carinho e apoio na elaboração gráfica dos cromatogramas.

Aos amigos Rafael, Bia e Artur Amorim pelo carinho e a este último pela paciência em desenhar algumas figuras deste trabalho.

Aos amigos Lourdes, Walmir, Cláudio, Guaraciara, Janaína, Jandiara, Lene, pelos momentos alegres que passamos juntos.

Às cunhadas Lúcia Helena e Silvia Freitas pelo carinho e amizade, e a última pelo apoio na elaboração dos gráficos.

À dona Alice Pereira pelo carinho e amizade fundamentais para uma conquista.

À dona Rosinha Amorim pelo carinho e amizade.

À minha querida amiga Jacqueline Souza, pela sincera amizade, companheirismo, carinho em momentos tão difíceis.

Aos amigos paulistas que suavizaram os momentos difíceis e contribuíram para os momentos de alegria.

Aos voluntários que participaram do estudo de penetração cutânea, contribuindo significativamente para meu aprendizado.

A CAPES, pela bolsa PICDT concedida a Z.M.F.F.

Ao LabCQ - Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (FF/UFRJ) pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, participaram do desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O cetoconazol (CTZ) é um antifúngico imidazólico de amplo espectro, administrado tipicamente pela via oral (200 ou 400 mg por dia) ou topicamente (creme 2% aplicado duas vezes ao dia). A eficácia da terapia tópica depende das características de liberação do fármaco, do veículo e da farmacocinética da substância ativa no tecido cutâneo, ou seja, de como ela se difunde através da pele. No presente trabalho, duas formulações comerciais (A e B), uma manipulada (C) e três desenvolvidas (D2:0; E1:1 e F0:2) contendo CTZ na concentração de 20 mg/g, foram estudadas quanto às características físico-químicas e quanto ao comportamento biofarmacêutico/bioequivalente tópico, através de medidas adequadas do ativo na camada do estrato córneo (EC). Uma metodologia *in vivo* denominada *tape-stripping* ou "remoção do estrato córneo" por fitas adesivas foi utilizada para medir a velocidade e extensão da penetração do CTZ no EC do antebraço de voluntários sadios. Um sistema bicompartimental de difusão vertical com membrana sintética (acetato de celulose) e membrana natural (pele suína) foi empregado para avaliar *in vitro* a taxa de liberação e a avaliação da penetração e eventual permeação do fármaco, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com método previamente validado. Nos estudos *in vivo*, as quantidades de fármaco determinadas no EC (μg/mg) para cada tempo da aplicação foram analisadas estatisticamente empregando-se análise da variância (ANOVA) considerando dois fatores: Fator 1 = tratamento com dois níveis e Fator 2 = antebraços (esquerdo e direito). Dentre os produtos avaliados somente entre A e C houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os ensaios de liberação, através da avaliação do fluxo de fármaco para o meio aceptor, evidenciaram agrupamento das formulações em duas categorias distintas entre si com fluxo entre 2,41, 2,16 e 2,49 $\mu g/cm^2/h$ compreendendo A, B e F0:2 ($p = 0,171$) e outra com fluxo entre 5,85, 6,28 e 7,21 $\mu g/cm^2/h$ para C, D2:0 e E1:1 ($p = 0,478$) pela ANOVA com $\alpha = 0,05$. A quantidade de CTZ nos estratos cutâneos da pele suína diminuiu com a profundidade, ou seja, na derme foi detectado menor quantidade de fármaco após aplicação das formulações A, B e F0:2 e não foi detectado sua presença na solução receptora. As formulações A, B e F0:2 não apresentaram um perfil de penetração cutânea na epiderme e na derme estatisticamente diferente ao nível de 5% ($p = 0,609$ e $p = 0,269$, respectivamente). A bioequivalência foi avaliada empregando os dados obtidos nos estudos *in vivo*, de acordo com os critérios das razões ($ASC_{0-240min}$) entre os produtos B, C e F0:2 em relação a A (considerado referência) com intervalo de confiança de 90% (IC 90%). Considerando o limite de 80-125%, as formulações não seriam bioequivalentes, pois existe uma grande diferença entre os produtos A e B, entre A e C, já A e F apresentam intervalo mais próximo do limite citado. Com base nesses resultados, a formulação do produto F poderia ser indicada a um possível desenvolvimento de genérico do produto A.

Palavras chaves: cetoconazol, bioequivalência, *tape-stripping*, *in vitro*.

ABSTRACT

Ketoconazole (KTZ) is an imidazolic antifungal, of broad-spectrum, typically administered orally (200 or 400 mg per day) or topically (2% cream, applied twice daily). The efficacy of the topical therapy depend on the characteristics of the drug's release, of the vehicle and of the active substance's pharmacokinetic in the cutaneous tissue, in other words, on how this substance diffuses through the skin. On this paper, two commercial formulations (A and B), one manipulated (C) and three developed (D2:0; E1:1 and F0:2) containing KTZ on the concentration of 20 mg/g, were studied in relation to the physical-chemical characteristics and to the bioavailability/bioequivalence topic behave by an adequate active layer's measurement of the stratum corneum (SC). The methodology *in vivo* called as *tape* stripping or "stratum corneum remotion" by adhesive tapes was proposed to measure the rate and KTZ penetration's extension in the SC of healthy volunteers' forearm. A bicompartmental system of vertical diffusion with sintetic membrane (celullose acetate) and natural membrane (porcine skin) was used to evaluate *in vitro* the rate of release and the penetration evaluation and eventual drug permeation, respectively. All samples were then submitted to HPLC analysis by previously validated method. In the studies *in vivo* the amount of drug determined in the SC (μg/mg) for each application time was analyzed using variance's analysis (ANOVA) considering two factors: Factor 1 = treatment with two levels and Factor 2 = forearm (left and right). Among the products evaluated there was only between A and C a statistically significant difference ($p < 0,05$). The assays of release, through the evaluation of the drug flow to the receptor chamber, evidenced the grouping of formulations in two categories, different among themselves, with flow among 2,41; 2,16 and 2,49 $\mu g/cm^2/h$ comprehending A, B and F(0:2) ($p = 1,171$) and other with flow among 5,85; 6,28 and 7,21 $\mu g/cm^2/h$ and to C, D2:0 and E1:1 ($p = 0,478$) by ANOVA with $\alpha = 0,05$. The amount of KTZ in the cutaneous stratum of porcine skin decreased with the depth, in other words, a lower value for drug was detected in the dermis after formulations' application A, B and F0:2 and its presence was not detected in the receptor solution. Formulations A, B and F0:2 did not present a cutaneous penetration's profile, in the epidermis and dermis, statistically different by level of 5% ($p = 0,6097$ e $p = 0,269$, respectively). Bioequivalence was evaluated using datas obtained from studies *in vivo,* according to criterias of reason_($ASC_{0-240min}$) among the products B, C and F in relation to A (considered as reference) with interval of confidence of 90% (IC 90%). Considering the 80-125% limit, the formulations would not be bioequivalents, because there is a big difference among products A and B, A and C; now A and F present the nearest interval to the quoted limit. Basing on these results, the formulation of the product F could be indicated a possible generic development of product A.

Key words: ketoconazole, bioequivalence, *tape stripping*, *in vitro*.

ABREVIATURAS

Anvisa/MS – Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde
ASB – área sob a curva
BE/BD – bioequivalência/biodisponibilidade
C_d – concentração dentro do veículo
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
C_o – concentração do soluto
CTZ – cetoconazol
D – coeficiente de difusão
DCB – denominação comum brasileira
DCI – denominação comum internacional
DEF – dicionário de especialidades farmacêuticas
DFC – dermatofarmacocinética
DMA – dimetilacetamida
DMF – dimetilformamida
DMSO – dimetilsulfóxido
EC – estrato córneo
EMEA – European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
FDA – Food and Drug Administration
h – espessura
IC – Intervalo de confiança
Kp – coeficiente de partição
P – coeficiente de permeabilidade
PVC – cloreto de polivinila
Q – quantidade cumulativa do soluto
SS – estado estacionário (*steady-state*)
SUPAC – Scale-Up and Postapproval Changes
WHO – World Health Organisation

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo II – Revisão Bibliográfica 09
Figura II.1. Organização estratificada da pele 09
Figura II.2. Representação diagramática da absorção de fármacos através da pele em direção aos tecidos mais profundos e para a circulação sistêmica após atravessar o estrato córneo 13
Figura II.3. Representação diagramática do transporte de fármacos através da principal via no estrato córneo: o espaço intercelular. 14
Figura II.4. Esquema de aplicação da primeira Lei de Fick 16
Figura II.5. Representação gráfica da 2ª lei de Fick com indicação do lag time (t_{lag}). 18
Figura II.6. Esquema de síntesedo CTZ (Cis 1) 23
Figura II.7. Localização no diagrama dos promotores de absorção cutânea apresentados na tabela II.4. 30
Capítulo III – Formulações Antimicóticas 56
Figura III.1. Faixa de viscosidade para as formulações A, B, C e F0:2 70
Figura III.2. Faixa de viscosidade para as formulações D2:0 e E1:1 70
Figura III.3 – Representação esquemática de um creme semi-sólido preparado com álcool cetoestearílico e tensioativo iônico 72
Capítulo IV – Penetração cutânea in vivo de cetoconazol das formulações semi-sólidas, empregando a metodologia *tape-stripping* 77
Figura IV.1. Esquema de demarcação das áreas nos antebraços dos voluntários: na área central do hexágono era aplicada a formulação; o quadrado de 1,56 cm^2 correspondia à área de remoção do EC. 84
Figura IV.2. Representação gráfica de três curvas padrão para validação das condições analíticas do CTZ por CLAE 89
Figura IV.3. Representação gráfica de três curvas padrão para validação da metodologia de extração do CTZ das fitas adesivas 91
Figura IV.4. Cromatogramas ilustrativos da solução padrão de CTZ e soluções extratoras das diferentes áreas demarcadas nos experimentos de *tape-stripping* com a formulação referência aplicada no antebraço direito de um voluntário 93
Figura IV.5. Cromatogramas ilustrativos da solução padrão de CTZ e soluções extratoras das diferentes áreas demarcadas nos experimentos de *tape-stripping* com a formulação referência aplicada no antebraço esquerdo de um voluntário 94
Figura IV.6. – Quantidade média de EC retirado pela fitas adesivas 95
Figura IV.7. Representação gráfica de três curvas padrão do CTZ para os experimentos de penetração cutânea *in vivo* 97
Figura IV.8. Quantidade de CTZ presente no EC. Produtos A, B e C 101
Figura IV.9. Quantidade de CTZ presente no EC. Produtos C, D2:0 e E1:1 105
Figura IV.10. Quantidade de CTZ presente no EC. Produtos A, B, C e F0:2 108
Capítulo V – Liberação *in vitro* de cetoconazol das formulações semi-sólidas empregando células de difusão tipo Franz com membrana de acetato de celulose 120
Figura V.1. Célula de difusão tipo Franz empregada nos estudos de liberação *in vitro* 122
Figura V.2. Representação gráfica de três curvas padrão do CTZ para os testes de liberação *in vitro* 125
Figura V.3. Quantidade de CTZ liberada por área. Produtos A, B e C 126
Figura V.4. Quantidade de CTZ liberada por área. Produtos C, D2:0 e E1:1 127
Figura V.5. Proposta de distribuição do CTZ nas fases aquosas e oleosas das 128

formulações C, D(2:0) e E(1:1)
Figura V.6. Quantidade de CTZ liberada por área. Produtos A, B e F0:2 129
Figura V.7. Correlação inversa entre o fluxo *in vitro* e a quantidade de ativo presente na camada mais externa da pele ao final de 240 minutos 131
Capítulo VI – Penetração e permeação cutânea *in vitro* de cetoconazol das formulações empregando pele suína 135
Figura VI.1. A) Sistema empregado nos estudos de penetração/permeação *in vitro*. B) Aplicação da amostra. 140
Figura V1.2. A) Retirada do pedaço de pele; B) Pedaço de pele após remoção da formulação; C) Separação dos extratos cutâneos: epiderme e derme com auxílio do bisturi; D) Derme sendo recortada para processo de extração. 141
Figura VI.3 – Curva padrão de CTZ 2,0 – 10,00 μg/mL 144
Figura VI.4. – Cromatogramas obtidos da extração de CTZ da pele suína empregando o solvente ternário CH_3CN:CH_3OH:H_2O (30:30:40). 145
Figura VI.5. – Cromatogramas obtidos do estudo de permeação de CTZ através da pele suína ao longo de 8 horas de experimento após aplicação do produto A. 147
Figura V1.6. Penetração de CTZ, nas camadas da pele, seguido da aplicação dos produtos A, B e F por 8 horas. 148
Figura VI.7. Representação gráfica de três curvas padrão do CTZ, obtidas por CLAE, na faixa de 0,50 - 10 μg/mL, em dias diferentes. 149

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo II – Revisão Bibliográfica 09
Tabela II.1. Principais formulações farmacêuticas contendo cetoconazol comercializadas no Brasil 24
Tabela II.2. Valores orgânicos e inorgânicos dos promotores de absorção cutânea 29
Capítulo III – Formulações Antimicóticas 56
Tabela III.1. Componentes e técnica de preparação do creme D2:0 contendo 2% CTZ na fase oleosa (interna) 61
Tabela III.2. Componentes e técnica de preparação do creme E1:1 contendo 1% de CTZ na fase oleosa e 1% no creme pronto 62
Tabela III.3. Componentes e técnica de preparação do creme F0:2 contendo 2% de CTZ incorporado no creme base aniônico 64
Tabela III.4. Caracterização das formulações estudadas 67
Tabela III.5. Valores de viscosidade das formulações obtidos numa faixa comum de velocidade. 69
Tabela III.6. Valores de viscosidade das formulações obtidos numa faixa comum de velocidade. 69
Capítulo IV – Penetração cutânea *in vivo* de cetoconazol das formulações semi-sólidas, empregando a metodologia *tape-stripping* 77
Tabela IV.1. Solubilidade do cetoconazol segundo nomenclatura adotada pela USP 88
Tabela IV.2. Resultados da recuperação média e da precisão da quantidade de CTZ extraída das fitas em conjunto 90
Tabela IV.3. Recuperação média de CTZ das fitas pós retirada do EC de ambos antebraços em cada experimento 92
Tabela IV.4. Quantidade média de CTZ presente no EC obtida após a aplicação das formulações A, B, C 96
Tabela IV.5. Quantidade média de CTZ presente no EC obtida após a aplicação das formulações D2:0, E1:1 e F0:2 96
Tabela IV.6. Resultado do tratamento estatístico considerando dois fatores: F1 = tratamento e F2 = antebraço entre as formulações A e B em todos os tempos 98
Tabela IV.7. Resultado do tratamento estatístico considerando dois fatores: F1 = tratamento e F2 = antebraço entre as formulações A e C em todos os tempos 100
Tabela IV.8. Resultado do tratamento estatístico considerando dois fatores: F1 = tratamento e F2 = antebraço entre as formulações C e D0:2 em todos os tempos 103
Tabela IV.9. Resultado do tratamento estatístico considerando dois fatores: F1 = tratamento e F2 = antebraço entre as formulações C e E1:1 em todos os tempos 104
Tabela IV.10. Resultado do tratamento estatístico considerando dois fatores: F1 = tratamento e F2 = antebraço entre as formulações A e F0:2 em todos os tempos 107
Tabela IV.11. Valores extremos de IC e razão de área sob a curva para formulações A, B, C, e F0:2 109
Capítulo V – Liberação *in vitro* de cetoconazol das formulações semi-sólidas empregando células de difusão tipo Franz com membrana de acetato de celulose 120
Tabela V.1. Valor do fluxo de CTZ 124
Capítulo VI – Penetração e permeação cutânea *in vitro* de cetoconazol das formulações empregando pele suina 135
Tabela V1.1. Recuperação média de CTZ dos tecidos 142
Tabela V1.2. Recuperação média de CTZ dos tecidos (n=3) 143
Tabela V1.3. Quantidade de CTZ recuperada dos tecidos cutâneos 148

SUMÁRIO

Capítulo I – Introdução Geral e Objetivos 1
I.1. Introdução Geral 2
I.2. Objetivos: Geral 5
I.3. Referências Bibliográficas 6
Capítulo II – Revisão Bibliográfica 9
II.1. Estrutura da pele e vias de penetração cutânea 9
II.2. Aspectos teóricos sobre mecanismos de penetração cutânea 15
II.2.1. Fatores que influenciam no transporte através da pele 19
II.3. Micoses e Fármacos Antimicóticos 19
II.3.2. Cetoconazol 21
II.3.2.1. Propriedades físico-químicas 21
II.3.2.2. Estrutura química e síntese orgânica 22
II.3.2.4. Absorção, Distribuição e Eliminação 25
II.4. Formulações Semi-sólidas 25
II.5. Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos 32
II.5.1. Fatores que influenciam a biodisponibilidade e bioequivalência de produtos tópicos 35
II.5.1.1. Efeito do veículo 36
II.5.1.2. Efeito do estado do fármaco 37
II.5.1.3. Efeitos biológicos 38
II.5.2. Análise Farmacodinâmica 38
II.5.3. Análise Farmacocinética 39
II.5.4. Ensaios Clínicos Comparativos 42
II.5.5. Estudos *In Vitro* 42
II.6. Referências Bibliográficas 44
Capítulo III – Formulações Antimicóticas 56
III.1. Introdução 56
III.2. Metodologia 57
III.2.1. Material 57
III.2.1.1. Matéria-prima e substância de referência 58
III.2.1.2. Excipientes 58
III.2.1.3. Formulações comerciais - descrição qualitativa dos componentes 59
III.2.1.4. Equipamentos e acessórios 59
III.2.1.5. Formulações desenvolvidas – método de preparo 60
III.2.2. Características físicas e químicas das formulações 65
III.3. Resultados e Discussão 67
III.3.1. Características físicas e químicas das formulações 67
III.4. Conclusões 73
III.5. Referências Bibliográficas 74
Capítulo IV – Penetração cutânea *in vivo* de cetoconazol das formulações semi-sólidas, empregando a metodologia *tape-stripping* 77
IV.1. Introdução 77
IV.2. Metodologia 78
IV.2.1. Materiais e Reagentes 78
IV.2.2. Equipamentos e Acessórios 78
IV.2.3. Estabelecimento das condições analíticas do cetoconazol por CLAE 79
IV.2.4. Validação da metodologia analítica 80
IV.2.5. Seleção e avaliação clínica dos voluntários 82

IV.2.6. Procedimento de Aplicação do Produto 83
IV.2.7. Validação da metodologia de extração de CTZ em fitas conjuntas 85
IV.2.7.1. Escolha da condição ótima de extração de CTZ das fitas adesivas 85
IV.2.7.2. Caracterização da recuperação e da precisão da extração de CTZ das fitas adesivas 86
IV.2.9. Procedimento de Pesagem do EC nas fitas adesivas 87
IV.2.10. Tratamento de dados 87
IV.3. Resultados e Discussão 88
IV.3.1. Validação das condições analíticas do cetoconazol por CLAE 88
IV.3.2. Validação da metodologia de extração de CTZ das fitas adesivas 90
IV.3.3. Experimentos de penetração cutânea *in vivo* 91
IV.4. Conclusões 110
IV.5. Referências Bibliográficas 111
Anexo
Documento digitalizado da aprovação da técnica *tape-stripping* pelo Comitê de Ética do HUCFF - UFRJ 115
Formulário de Cadastro de Voluntários 116
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 117
Capítulo V – Liberação *in vitro* de cetoconazol das formulações semi-sólidas empregando células de difusão tipo Franz com membrana de acetato de celulose 120
V.1. Introdução 120
V.2. Metodologia 121
V.2.1. Materiais e Reagentes 121
V.2.2. Equipamentos e Acessórios 121
V.2.3. Procedimento do experimento 122
V.3. Resultados e Discussão 123
V.4. Conclusões 131
V.5. Referências Bibliográficas 132
Capítulo VI – Penetração e permeação cutânea *in vitro* de cetoconazol das formulações empregando pele suina 135
VI.1. Introdução 135
VI.2. Metodologia 136
VI.2.1. Materiais e Reagentes 136
VI.2.2. Equipamentos e Acessórios 136
VI.2.3. Preparo da pele suína 137
VI.2.4. Validação da metodologia de extração de CTZ da epiderme e derme suína 137
VI.2.4.1. Escolha da condição ótima de extração de CTZ da epiderme e derme suína 137
VI.2.4.2. Caracterização da recuperação e precisão da extração de CTZ da epiderme e derme suína 138
VI.2.5. Protocolo da penetração/permeação in vitro das formulações contendo CTZ 139
VI.3. Resultados e Discussão 142
VI.3.1. Validação da metodologia de extração de CTZ da epiderme e derme suína 142
VI.3.1.1. Escolha da condição e caracterização da seletividade da recuperação e precisão da extração de CTZ da epiderme e derme suína 142
VI.3.2. Resultados da penetração/permeação *in vitro* das formulações contendo CTZ 145
VI.4. Conclusão 149
VI.5. Referências Bibliográficas 150

Conclusão Geral 153

Capítulo I – Introdução Geral e Objetivos

I.1. Introdução geral

Os medicamentos podem penetrar na pele intacta após aplicação, através das paredes dos folículos pilosos, das glândulas sudoríparas ou sebáceas ou por entre as células da camada córnea (BARRY, 1987; POTTS; GUY, 1992; SINGH; SINGH, 1993; BLANCO et al., 2003).

A camada córnea tem a propriedade de reter na sua estrutura substâncias ativas resultando no assim chamado "efeito reservatório". A liberação progressiva desta reserva conduz a efeitos prolongados. Os fármacos que a atravessam podem se concentrar nas partes profundas da pele e nas regiões subcutâneas, o que é favorável às ações locais. Numerosas substâncias podem assim se acumular na pele em diferentes níveis (RIVIERE, 1993).

O estrato córneo (EC), sendo um tecido queratinizado, comporta-se como uma membrana artificial semipermeável e as moléculas das substâncias ativas penetram por difusão passiva. Assim, a velocidade de movimentação de um fármaco através dessa camada da pele depende da concentração do mesmo no veículo, de sua solubilidade, do coeficiente de difusão e do coeficiente de partição entre o EC e o veículo. As substâncias que tem características de solubilidade tanto em água quanto em lipídios são boas candidatas à difusão através do EC, bem como nas camadas epidérmica e dérmica (SURBER et al., 1990).

Nas infecções superficiais por dermatófitos, o agente patogênico pode localizar-se nas camadas mais externas da pele, isto é, o EC, ou nos apêndices cutâneos, de modo que o fármaco administrado topicamente deve ser liberado, nesses locais, em concentrações adequadas para inibir o crescimento do fungo (DIXON et al., 1978; HEEL et al., 1982; PERSHING; CORLETT; JORGENSEN, 1994; SHAH et al., 1998).

No tratamento destas infecções, a terapia tópica deveria ser preferida em relação à administração oral. De fato, a concentração do fármaco requerida para desenvolver a atividade antimicótica no sítio alvo, deveria ser mais facilmente alcançada após a dosagem tópica, se o fármaco fosse liberado e absorvido adequadamente. A resposta terapêutica, por

conseguinte, dependerá dos processos de liberação do fármaco da forma semi-sólida que o contém, da penetração da substância ativa nas camadas da pele, da velocidade de eliminação do fármaco da pele e do desencadeamento do efeito desejado propriamente dito (SHAH et al., 1998).

A terapia antifúngica cutânea, com derivados imidazólicos como o cetoconazol (CTZ), pode ser conduzida pelas vias oral, parenteral e tópica. A indicação da melhor via depende da gravidade da infecção dermatófita (SHUSTER, 1984).

O CTZ é um antifúngico imidazólico de amplo espectro. É administrado tipicamente pela via oral (200 ou 400 mg por dia) ou topicamente (creme 2% aplicado duas vezes ao dia). Mostra-se eficaz contra várias infecções cutâneas superficiais como candidíase, pitiríase versicolor, tinea cruris (pedis ou corporis) e dermatófitos (SHUSTER, 1984; MCGRAWTH; MURPHY, 1991; LESHER, 1996; SKIKA et al., 2000).

Em geral, a administração tópica resulta em baixas concentrações na circulação sanguínea, reduzindo assim os possíveis efeitos tóxicos do fármaco, mas dificultando a determinação de sua concentração em níveis plasmáticos. Tem-se discutido que a camada do estrato cutâneo é mais indicada para uma medida adequada e mensurável da biodisponibilidade tópica do fármaco, objetivando avaliar *o perfil de concentração versus tempo do fármaco na pele*. De acordo com SHAH et al. (1998), esta abordagem vem sendo denominada de dermatofarmacocinética (DFC).

Uma metodologia sugerida é a técnica de *tape stripping*, ou seja, "remoção do EC" por sucessivas aplicações de uma fita adesiva adequada, resultando em remoção do tecido com a extração e análise do fármaco (DREHER et al., 1998; SHAH et al., 1998; SHAH et al., 1999; PERSHING, 2001). O EC é o sítio alvo para o tratamento de micoses, desta forma, determinar o perfil de concentração do fármaco em função do tempo neste tecido poderia indicar

diretamente a biodisponibilidade local da substância ativa e, conseqüentemente, a eficácia da formulação aplicada.

Por outro lado, a determinação da velocidade de liberação do fármaco de preparações semi-sólidas pode prover o controle de qualidade das formulações sob aspecto biofarmacêutico. Nesta metodologia pode ser empregado um modelo bicompartimental, conhecido como célula de difusão vertical e membrana sintética (UNITED STATES, 1997). Para tal, podem-se empregar membranas artificiais como acetato de celulose, nitrato de celulose e polissulfona (HAIGH; SMITH, 1994), as quais não oferecem resistência à passagem do fármaco do compartimento doador para o compartimento receptor, proporcionando, desta forma, a quantificação do fármaco neste último, em função da partição entre o veículo e o meio aceptor.

No sistema de células de difusão, pode-se também utilizar pele natural (humana ou animal) para conhecer o comportamento biofarmacêutico de uma formulação, no que diz respeito à penetração e/ou permeação do fármaco. Dentre os vários tipos de pele animal (rato, cobaio, camundongo com e sem pêlo, macaco rhesus, cobra) que podem ser utilizadas, recentemente, tem-se empregado a pele suína devido a sua similaridade com a pele humana. (HAIGH; SMITH, 1994; SEKKAT; KALIA; GUY, 2002; MEDI; SINGH, 2003).

As formulações empregadas no tratamento das afecções tópicas são preparações de consistência semi-sólidas destinadas a serem aplicadas sobre a pele ou sobre determinadas mucosas a fim de exercer uma ação local ou de promover a penetração percutânea de princípios medicamentosos.

Dependendo do seu comportamento reológico, da sua adesividade, os semi-sólidos podem aderir à superfície de aplicação por períodos suficientemente longos até serem removidos. Essa propriedade auxilia a prolongar a liberação do medicamento no local de

aplicação, apresentando vantagens em termos de facilidade de aplicação, e capacidade de liberação tópica de uma ampla variedade de fármacos (IDSON; LAZARUS, 2001).

O conhecimento do comportamento dessas formulações sob aspecto de biodisponibilidade *in vivo* e liberação *in vitro* permite aprimoramento dos produtos e melhor controle quando se fazem necessárias alterações de escala produtiva (*scale-up/down*) e/ou componentes da formulação pós-aprovação do medicamento.

I.2. Objetivos

Geral:

Realizar estudos biofarmacotécnicos com formulações tópicas de cetoconazol (CTZ), fármaco antifúngico, derivado imidazólico sintético, empregado no tratamento de micoses superficiais, no que se refere a:

1. Avaliação da taxa de liberação do fármaco *in vitro*, empregando células de difusão tipo Franz com membrana artificial (acetato de celulose);
2. Avaliação da penetração e permeação de CTZ empregando células de difusão com membrana natural (pele suína);
3. Avaliação da captação e quantificação de CTZ pela pele através da técnica *tape stripping in vivo*.

I.3. Referências Bibliográficas*

BARRY, B.W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.6, p.85-97, 1987.

BLANCO, M.D.; BERNARDO, M.V.; TEIJÓN, C.; SASTRE, R.L.; TEIJÓN, J.M. Transdermal application of bupivacaine-loaded poly(acrylamide(A)-co-monomethyl itaconate) hydrogels. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.255, p.99-107, 2003.

DIXON, D.; SHADOMY, S.; SHADOMY, H.J.; ESPINEL-INGROFF, A.; KERKERING, T.M. Comparison of the *in vitro* antifungal activities of miconazole and a new imidazole. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.138, p.245-248, 1978.

DREHER, F.; ARENS, A.; HOSTYNEK, J.J.; MUDUMBA, S.; ADEMOLA, J.; MAIBACH, H.I. Colorimetric method for quantifying human stratum corneum removed by adhesive-tape-stripping. *Acta Derm.-Venereol.*, Basingstoke, v.78, p.186-189, 1998.

HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for *in vitro* diffusion experiments. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.2, p.311-330, 1994.

HEEL, R.C.; BRODGEN, R.N.; CARMINE, A.; MORLEY, P.A.; SPEIGHT, T.M. Ketoconazole: a review of its therapeutic efficacy in superficial and systemic fungal infections. *Drugs*, Auckland, v.23, p.1-36, 1982.

IDSON, B.; LAZARUS, J. Semi-sólidos. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. cap.18, p.907-953.

LESHER, J.L. Recent developments in antifungal therapy. *Dermatol. Clin., Orlando*, v.14, n.1, p.163-169, 1996.

MCGRAWTH, J.; MURPHY, G.M. The control of seborrhoeic dermatitis and dandruffby antipityrosporal drugs. *Drugs*, Auckland, v.41, n.2, p.178-184, 1991.

MEDI, M.B.; SINGH, J. Electronically facilitated transdermal delivery of human parathyroid hormone (1-34). *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.263, p.25-33, 2003.

PERSHING, L.K. Dermatopharmacokinetics for assessing bioequivalence of topically applied products in human skin. *Cosmet. Toiletries*, Carol Stream, v.115, n.5, p.43-51, 2001.

PERSHING, L.K.; CORLETT, J.; JORGENSEN, C. *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, *v.*38, p.90-95, 1994.

POTTS, R.O.; GUY, R.H. Predicting skin permeability. *Pharm. Res.*, Norwell, v.9, p.663-669, 1992.

RIVIERE, E.J. Biological factors in absorption and permeation. In: ZATZ, J.L., ed. *Skin permeation*: fundamentals and application. Wheaton: Allured Publishing, 1993. cap.5, p.113-125.

SEKKAT, N.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Biophysical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.91, n.11, p.2376-2381, 2002.

SINGH, S.; SINGH, J. Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: a review. *Med. Res. Rev.*, Hoboken, v.13, n.5, p.569-621, 1993.

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

SHAH, V.P.; FLYNN, G.L.; YACOBI, A.; MAIBACH, H.I.; BON, C.; FLEISCHER, N.M.; FRANZ, T.J.; KAPLAN, S.A.; KAWAMOTO, J.; LESKO, L.J.; MARTY, J.P.; PERSHING, L.K.; SCHAEFER, H.; SEQUEIRA, J.A.; SHRIVASTAVA, S.P.; WILKIN, J.; WILLIAMS, R.L. Bioequivalence of topicaldermatological dosage forms: methods of evaluation of bioequivalence. *Pharm. Res.*, Norwell, v.15, n.2, p.167-171, 1998.

SHUSTER, S. The etiology of dandruff and the mode of action of therapeutic agents. *Br. J. Dermatol.*, Oxford, v.111, p.235-242, 1984.

SKIKA, M.; SKIBA-LAHIANI, M.; MARCHAIS, H.; DUCLOS, R.; ARNAUD, P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.198, p.1-6, 2000.

SURBER, C.; WILHELM, K.P.; HORI, M.; MAIBACH, H.I.; GUY, R.H. Optimization of topical therapy: partitioning of drugs into stratum corneum. *Pharm. Res.*, Norwell, v.7, n.12, p.1320-1324, 1990.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. *Guidance for industry*: nonsterile semisolid dosage forms: scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation. Rockville, 1997. Disponível em: http://www.fda.gov/cder/guidance/1447fnl.pdf. Acesso em: 10 jun. 2000.

*Referências de acordo com a norma NBR 6023/39 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

II.1. Estrutura da pele e vias de penetração cutânea

A pele é uma membrana heterogêna composta principalmente de duas partes: epiderme e derme. A derme contém capilares, glândulas sebáceas ou sudoríparas, folículos pilosos e nervos. A epiderme é avascular, possui uma estrutura multilamelar que representa os diferentes estágios da diferenciação celular. Em movimento ascendente de proliferação da camada basal, as células alteram de forma ordenada, metabolicamente ativa e divididem-se em células densas, funcionalmente mortas, queratinizadas, os corneócitos. Estas últimas células são envolvidas por bicamada lipídica multilamelar constituindo a última camada da epiderme, o estrato córneo (EC) (MOSER et al., 2001). A figura II.1 representa a organização estratificada da pele, adaptada de ANSEL; POPOVICH; ALLEN (2000).

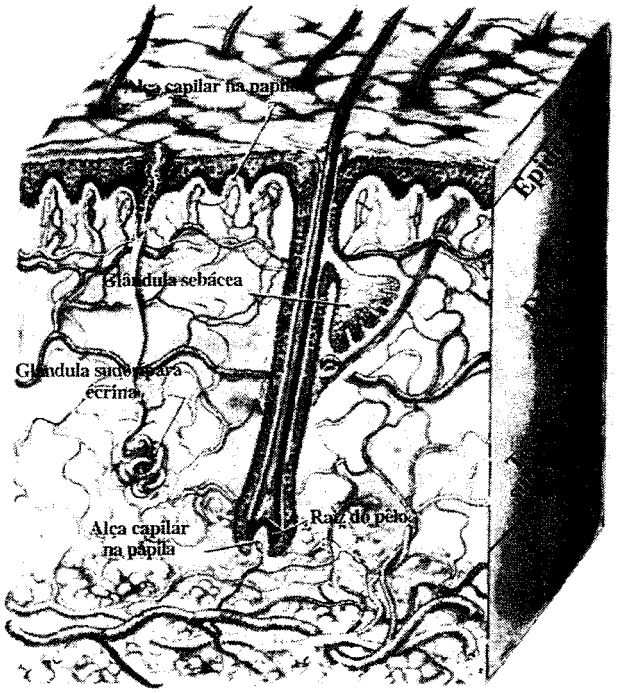


Figura II.1 - Organização estratificada da pele, adaptada de ANSEL; POPOVICH; ALLEN. (2000).

O EC é constituído pela superposição de células completamente queratinizadas, anucleadas, formando lamelas muito alongadas de 0,5 a 0,8 μm de espessura e até 30 μm de comprimento, chamadas corneócitos (AGACHE et al., 1994; ASBILL; MICHNIAK, 2000).

Estes podem ser simbolizados como "tijolos" da parede de barreira, que estão assentados em regiões lipídicas que agem como uma "argamassa" para ligar os corneócitos (JUNGINGER; HOFLAND; BOUWSTRA, 1992).

Os corneócitos são compostos principalmente de derivados de proteínas fibrosas que são denominadas queratinas. Eles são aproximadamente hexagonais, e representam cerca de 80% do volume da camada córnea (WARD; DU REAU, 1990).

As células do EC são unidas através de estruturas como desmossomas e através de efeitos coesivos dos lipídeos intercelulares. A descamação da última camada do estrato córneo, o estrato "disjunctum", é resultante de processos enzimáticos envolvendo proteases e lipases que atuam sobre os desmossomas e lipídeos intercelulares, respectivamente (JASS; ELIAS, 1991).

O canal intercelular do estrato córneo é principalmente composto de lipídeos neutros e ceramidas, e também contendo glicoproteínas, desmossomos, enzimas ativas e produtos secretados pelas glândulas sebáceas (PETERSEN, 1992).

De acordo com PETERSEN (1992), o estrato córneo é formado em quatro estágios durante o processo de diferenciação, iniciando com a divisão celular na camada basal da epiderme:

a) Primeiro estágio: as células da camada basal, queratinócitos, formam filamentos de queratina. Esta proteína não é secretada da célula, mas permanece em parte no citoplasma. Os lipídeos formados consistem principalmente de fosfolipídeos e uma pequena quantidade de lípideos não-polares e ácidos graxos livres.

b) Segundo-estágio: com migração das células para a camada espinosa, as fibrilas de queratina tornam-se mais estruturadas e facilmente detectáveis por microscópio.

c) Terceiro estágio: no estado granuloso, a queratina preenche completamente o interior da célula. Neste estágio, são encontrados os seguintes lipídeos: colesterol, ceramidas e glicolipídeos.

d) Quarto estágio: cornificação e desenvolvimento da barreira lipídica. Os queratinócitos morrem um após o outro, tornam-se desprovidos de organelas e rígidos, cornificando-se. As células mais velhas desprendem-se e ocorre a descamação.

Durante o último estágio do processo de diferenciação, os corpos lamelares ou granulares se distribuem no espaço intercelular e secretam os componentes que formam a barreira de lipídeos da bicamada da membrana. Esta barreira é composta de 40-49% de ceramidas; 20-25% de colesterol; 10% de sulfato de colesterila; 0,7% de éster de colesterila; 0,1% de fosfolipídeos; 2,6% de triacilgliceróis e cerca de 25% de ácidos graxos livres (JUNGINGER; HOFLAND; BOUWSTRA, 1992; FORSLIND, 1994).

Nota-se que existe uma variação no conteúdo de lipídeos do EC que corresponde aproximadamente às propriedades de permeabilidade da barreira.

Embora o EC seja composto de células mortas, ele é um local de considerável atividade metabólica. Contudo, ao contrário dos outros tecidos, sua atividade é extracelular, devido a enzimas excretadas pelos corpos de Odland. As enzimas (geralmente hidrolases) contidas nestas estruturas são excretadas junto com as bicamadas glicoceramídicas, entre o estrato granuloso e o EC. As reações catalisadas por estas enzimas são responsáveis pela constituição das bicamadas lipídicas, pela diferenciação celular e pela proteção contra os corpos estranhos (FORESTIER, 1992).

De acordo com ABRAHAM e DOWNING (1989), o EC é um tecido altamente especializado, funcionando como uma barreira de proteção contra a perda de água transepidérmica e penetração de outros produtos do meio ambiente (IMOKAWA; AKASAKI; KUNO, 1989; MOSER et al., 2001).

Além disso, a pele e, em particular, o EC constitui uma barreira efetiva para a permeação de fármacos. Uma demonstração disso ocorre quando a última camada é *stripped* com fita adesiva, aumentando a permeabilidade para água e outros compostos (ASBILL; MICHNIAK, 2000). Esta camada freqüentemente controla os processos de absorção percutânea, sendo uma etapa limitante na velocidade de difusão (GEINOZ et al., 2002).

A natureza exata sobre a função de barreira tem sido investigada nos últimos anos e recentes avanços em técnicas biofísicas têm promovido interessante compreensão do mecanismo de absorção a níveis moleculares (HADGRAFT, 2001).

Os lipídeos da pele são organizados em estruturas lamelares. Algumas moléculas de água podem estar incorporadas nas regiões interlamelares, entre os principais grupos hidrofílicos dos lipídeos. Como resultado desta estrutura, domínios hidrofílicos alternam-se com outros lipofílicos, formando-se assim os caminhos para que os fármacos e/ou outras substâncias (como tensoativos) penetrem no EC (JUNGINGER; HOFLAND; BOUWSTRA, 1992).

A permeação de fármacos através da pele inclui a difusão através da epiderme intacta e dos apêndices, folículos pilosos e glândulas sudoríparas ou sebáceas. No entanto, estes ocupam apenas 0,1% do total da superfície da pele e a contribuição por esta via é considerada pequena (MOSER et al, 2000). A figura II.2 é uma representação diagramática adaptada de ROBERTS (1997) das potenciais vias de entrada para formulações tópicas na pele.

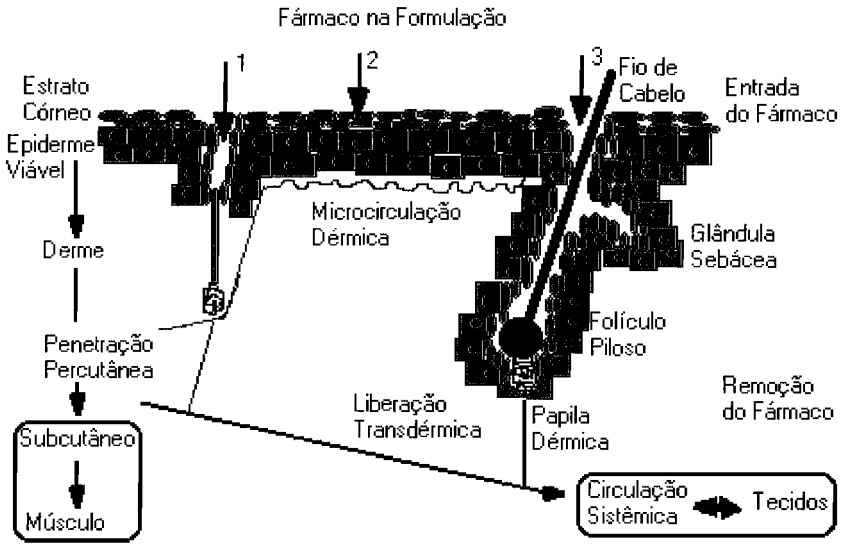


Figura II.2 - Representação diagramática da absorção de fármacos através da pele em direção aos tecidos mais profundos e para a circulação sistêmica após atravessar o estrato córneo. Potenciais vias de entrada para formulação tópica na pele são: (1) através das glândulas sudoríparas, (2) através do estrato córneo e (3) através do folículo piloso.

O estrato córneo sendo um tecido queratinizado, comporta-se como uma membrana artificial semipermeável e os fármacos penetram por difusão passiva. Assim, a velocidade de movimentação de um medicamento através dessa camada da pele depende da concentração e da solubilidade do fármaco na formulação, assim como da sua partição neste veículo; dos coeficientes de partição e difusão no e através do EC (SURBER et al., 1990; KRIWET; MÜLLER-GOYMANN, 1995; MIGRATORI, 2000).

A permeabilidade dos fármacos através do EC pode ser realizada por duas vias: matriz intercelular (entre os corneócitos) e transcelular (através dos corneócitos) (SINGH; SINGH, 1993).

De acordo com MIGRATORI (2000), o transporte de fármacos (especialmente hidrofóbicos) pode ocorrer através da via transcelular. Estudos realizados por POTTS e FRANCOEUR (1991) sobre a difusão de água permitiram observar que uma pequena fração polar foi transferida pelo caminho tortuoso (via intercelular) (Figura II.3). Este transporte envolve uma interação do soluto com os componentes lipídicos e polares do espaço

intercelular (ROSADO *et al.*, 2003). Por conseguinte, as razões relacionadas à impermeabilidade da pele poderiam ser: o caminho tortuoso e o problema repetido de difusão e partição através da estrutura da bicamada lipídica (Hadgraft, 2001).

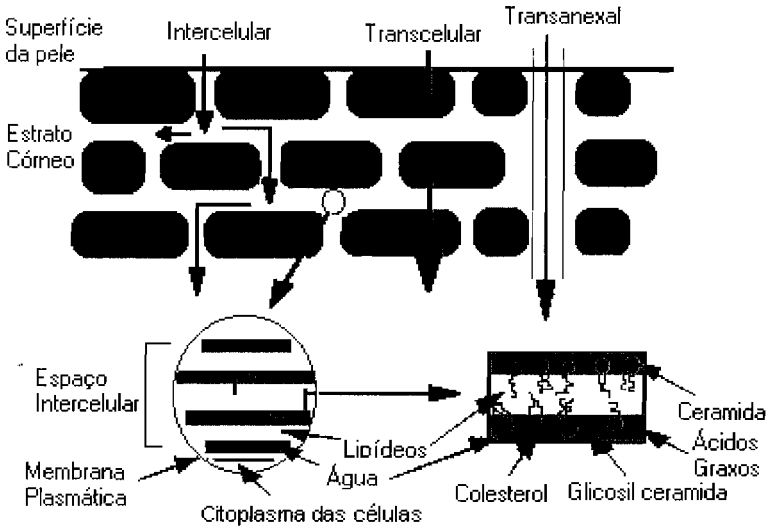


Figura II.3 – Representação diagramática do transporte de fármacos através da principal via no estrato córneo: o espaço intercelular.

De acordo com BLANCO et al. (2003), os fármacos administrados pela via tópica ou transdérmica deveriam possuir propriedades físico-químicas específicas: ser altamente hidrofóbicos e solúveis em óleo, e seus pesos moleculares deveriam ser pequenos, em geral menores que 500 Da.

Como a principal via de penetração dos fármacos são os canais intercelulares, o componente lipídico é considerado um determinante da velocidade de transporte cutâneo (POTTS; GUY, 1992; ROBERTS, 1997; WILLIANS; BARRY, 2004).

A absorção de substâncias aplicadas à pele é importante para a liberação de fármacos *dentro da pele* para efeitos locais em dermatologia; *através da pele chegando à absorção percutânea* para aliviar dores musculares dos tecidos mais profundos ou *alcançando a circulação sistêmica* para tratamento de diversas patologias não locais ou distantes. As

vantagens associadas à via transdérmica em relação a outras vias de administração envolvem: não ocorre ou é mínima a desativação por enzimas, logo não há eliminação pré-sistêmica e não há interações com alimentos (ROBERTS, 1997).

II.2. Aspectos teóricos sobre mecanismos de penetração cutânea

O processo de absorção cutânea pode ser definido como o movimento de massa da substância ativa da superfície da pele para a circulação geral. Isto inclui penetração através do EC, difusão através de cada camada da pele, captação pelos capilares vizinhos à junção dermo-epidérmica e, finalmente, transporte para os tecidos alvos para desencadear a ação terapêutica (SINGH; SINGH, 1993).

A massa transferida de compostos da superfície da pele para o interior do corpo através do EC é controlada por simples difusão passiva (ROUGIER et al., 1990). Existem muito poucas evidências para sugerir que exista algum processo ativo envolvendo a permeação na pele (HADGRAFT, 2001).

Entende-se como difusão o transporte de moléculas individuais por uma barreira ou espaço livre, que ocorre segundo um processo aleatório e que depende de um gradiente de concentração (SINGH; SINGH, 1993; NETZ; GONZÁLEZ ORTEGA, 2002).

De acordo com RIVIERE (1993), a difusão através do EC pode ser explicada através de três etapas:

1) O fármaco difunde-se dentro da formulação (ou do veículo) para a superfície do EC;
2) Ocorre uma passagem do fármaco para o interior do EC, controlada pelo coeficiente de partição;
3) O fármaco difunde-se através do EC. Esta talvez seja a etapa de maior importância nos estudos de permeação cutânea.

As leis de difusão de Fick podem ser empregadas para analisar os dados de permeação e predizer este comportamento. A primeira lei de difusão de Fick (figura II.4) é empregada para descrever o fluxo que se estabelece no estado estacionário (SS - *steady-state*) por área ($\mathbf{J_{ss}}$) em termos da partição do permeante entre a formulação aplicada e a pele (**Kp**), seu coeficiente de difusão (**D**) no espaço intercelular do EC, e o comprimento difusional (**h**), quando o gradiente de concentração permanece constante ao longo do tempo (MOSER, 2000).

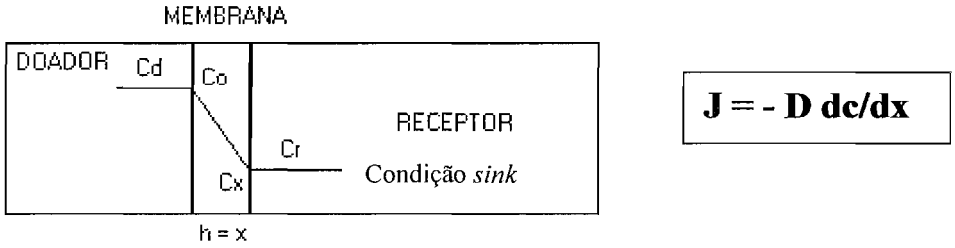


Figura II.4 – Esquema de aplicação da primeira lei de Fick.

De acordo com ROUGIER et al. (1990), o EC pode ser assumido como uma membrana homogênea (espessura **h**) e a concentração do permeante ($\mathbf{C_o}$) dentro da primeira camada da membrana ($\mathbf{x = 0}$) depende da sua concentração na formulação ($\mathbf{C_d}$) e o coeficiente de partição (**Kp**) entre a membrana e a formulação:

$$\mathbf{C_o = K_p C_d}$$

Para todos os valores de tempo, a concentração do permeante dentro da última camada da membrana ($\mathbf{x = h}$) obedece à condição *sink* (logo $\mathbf{C_x <<< C_o}$ e também $\mathbf{C_r <<< C_d}$), assim, assumindo instantâneo transporte estacionário, isto é, fluxo imediato e constante no tempo, a forma integrada da 1ª lei de Fick assume a expressão abaixo:

$$\mathbf{J_{ss} = A\ DK_p/h\ (C_d - C_r)}$$

Ou

$$\mathbf{J_{ss} = A\ DK_p/h\ C_d}$$

Onde $\mathbf{J_{ss}}$ corresponde ao fluxo no estado estacionário (o declive da linha reta), e **A** à área de contato.

De acordo com MOSER et al. (2001), três estratégias para a permeação podem ser postuladas de acordo com a 1ª lei de Fick:

1) Aumento do coeficiente de difusão do permeante na membrana;
2) Aumento da solubilidade do permeante na membrana devido ao aumento da sua partição dentro da membrana;
3) Aumento da proporção entre a concentração do permeante dissolvido na formulação e a solubilidade deste no veículo, elevando o grau de saturação do mesmo na formulação.

A última estratégia está baseada na interação entre o permeante e a formulação, enquanto as duas primeiras insinuam um efeito do veículo sobre a função de barreira do EC (por exemplo, ação de promotores químicos dentro do EC e subseqüente desordem dos lipídeos intercelulares do EC, ou extração de tais lipídeos por componentes de solvatação da formulação).

Entretanto, para uma membrana heterogênea como a pele, onde **D**, $\mathbf{K_p}$ e **h** possuem inter-relação complexa, os termos costumam ser reunidos em um único parâmetro denominado coeficiente de permeabilidade (**P**), sendo este essencialmente experimental.

$$\mathbf{J_{ss} = A.P.\Delta C}$$

Porém, à medida que o EC é uma boa barreira, um longo tempo é requerido para alcançar SS.

A 2ª lei de Fick é aplicada para saber como varia a concentração do fármaco no interior da membrana em função do tempo (SINGH; SINGH, 1993). A mudança na quantidade cumulativa do fármaco (**Q**) que passa através da membrana por unidade de área como função do tempo é representada na figura II.5.

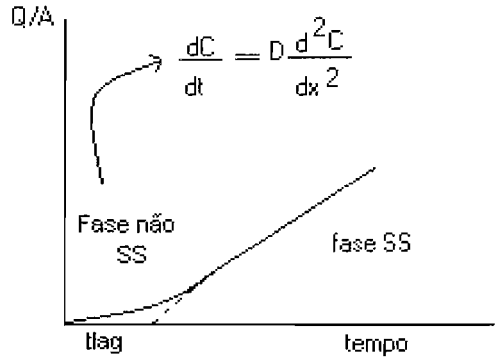


Figura II.5. Representação gráfica da 2ª lei de Fick com indicação do lag time (t_{lag}).

O emprego dos dados pós-estado estacionário, que são lineares, para a análise de dados e estimação dos parâmetros de permeação (**J**, **D**, $\mathbf{K_p}$), em experimentos *in vitro* com dose infinita, é conhecido como método do *time-lag* ou *lag-time* (t_{lag}) (SHAH, 1993; NERELLA; BLOCK; NOONAN, 1993).

Quando a linha do SS é extrapolada até o eixo de x (tempo), o intercepto corresponde ao t_{lag} (ROUGIER et al., 1990), que é definido como o tempo em que o gradiente de concentração do fármaco se estabiliza no interior da membrana (figura II.5).

Assumindo que a concentração do fármaco no compartimento doador é constante, que a condição *sink* é perfeita, que não há degradação ou ligação do permeante na membrana e que o equilíbrio na interface é instantâneo, o desdobramento matemático da 2ª lei de Fick, resultará, no tempo infinito, na expressão abaixo (equação do SS):

$$\mathbf{Q/A = K_p\, D\, C_d/h\, (t - h^2/6D)}$$

Quando Q = 0 (extrapolação da linha SS), o intercepto no eixo X corresponde ao t_{lag} (ver figura II.5); e a equação acima resultará em :

$$t_{lag} = \mathbf{h^2/6D}$$

De modo que, pode-se estimar o coeficiente de difusão (**D**), conhecendo-se a espessura da membrana (**h**).

II.2.1. Fatores que influenciam no transporte através da pele

A eficácia da via tópica requer adequada captação do fármaco pela pele, durante um determinado período de tempo, para que o agente ativo possa exercer sua ação farmacológica. A resposta terapêutica, por sua vez, dependerá dos processos de liberação do fármaco da forma semi-sólida que o contém; penetração da substância ativa nas camadas da pele; velocidade de eliminação do fármaco da pele e o desencadeamento do efeito desejado propriamente dito (PERSHING; CORLETT; JORGENSEN, 1994).

Os fatores que afetam esses processos são múltiplos, a saber: características físico-químicas do fármaco (solubilidade, coeficiente de partição, peso molecular); excipientes (natureza química, propriedades físicas e mecânicas, lipofilia ou hidrofilia, presença ou não de tensoativos, pH da formulação); região de aplicação e estado geral da pele; grau de hidratação e modo de aplicação (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

II.3. Micoses e Fármacos Antimicóticos

As micoses são causadas por fungos, vegetal de estrutura rudimentar que não tem caule, raízes ou folhas, nem clorofila (ALY, 1994).

Na maior parte dos casos, os fungos utilizam hidratos de carbono, já elaborados, como alimento, porém alguns têm enzimas capazes de transformar gorduras, proteínas, álcoois superiores e ácidos orgânicos em alimento. Como essas substâncias são encontrados em organismos vivos, os fungos parasitam os homens, animais ou vegetais superiores. Quando utilizam matéria orgânica em decomposição encontrada livremente na natureza, não são chamados de parasitas, mas sim, de saprófitos (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

De acordo com ALY (1994), os fungos são classificados em três categorias: *Schizomycetes* são considerados fungos inferiores; *Mixomycetes*, não têm espécies que

parasitam o homem; *Eumycetes* se dividem em quatro classes, uma das quais compreende maioria dos fungos que parasitam o homem (classe dos *Fungi imperfecti*).

As micoses superficiais são infecções fúngicas localizadas nas camadas superficiais da pele e seus anexos, bem como nas mucosas e zonas cutâneo-mucosas. A palavra *tinha* (do latim *tinea* = verme ou traça) foi empregada no passado para designar as lesões fúngicas do couro cabeludo, unhas e pele glabra, provocada por dermatófitos (fungos queratinofílicos), que compreendem os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

Os dermatófitos apresentam uma predileção ecológica, no que diz respeito à sua adaptação ao meio ambiente, podendo ser divididos em três grandes grupos em relação ao seu habitat, sendo classificados como geofílicos, zoofílicos e antropofílicos (COSTA et al., 1999).

Quanto à distribuição geográfica, os dermatófitos são ubiquitários, não existindo área ou grupo de pessoas que se encontrem isoladas destes fungos. A variada distribuição etiológica das dermatofitoses pode ser explicada por áreas onde condições geoclimáticas e sociais são extremamente diferenciadas (COSTA et al., 2002).

A freqüência e etiologia das dermatofitoses têm sido avaliadas em várias cidades brasileiras como Goiânia (COSTA et al., 2002), Fortaleza (BRILHANTE et al., 2000); São Paulo (TALARICO FILHO et al., 1998; CHINELLI et al., 2003); Rio de Janeiro (RAMOS-E-SILVA et al., 1998) e Porto Alegre (MEZZARI, 1998).

De acordo com a literatura, muitos antifúngicos podem ser empregados no tratamento de dermatofitoses: acrisorcina, anfotericina B, candicidina, griseofulvina, haloprogina, nistatina, timol, pomada de whitfield, tintura de castellani (solução carbol-fucsina), violeta de genciana, hipossulfito de sódio (tiossulfato de sódio, $Na_2S_2O_3 + 5H_2O$), terbinefina, tolnaftato (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991; DIEHL, 1996; PIÉRARD; ARRESE; PIÉRARD-FRANCHIMONT, 1996; SHEAR et al., 1998).

Em 1969, houve um grande avanço no tratamento de micoses, com a introdução dos derivados imidazólicos: o clotrimazol, o miconazol, o econazol e em seguida o isoconazol (WARNOCK; SPELLER, 1982).

Estes compostos possuem atividade terapêutica contra um grande número de leveduras, dermatófitos, fungos dimórficos e algumas bactérias gram-positivas (SYMOENS; CAUWENBERGH, 1983).

O cetoconazol (CTZ) foi sintetizado em 1978 e introduzido na terapêutica por HEERES et al. (1979), proporcionando um significativo avanço na quimioterapia antifúngica.

Crescentes avanços na terapia antifúngica são representados pelo terconazol de uso tópico, fluconazol de uso oral e parenteral, itraconazol de uso oral, nitrato de sertaconazol de uso tópico (GUPTA; SAUDER; SHEAR, 1994; RAMOS et al., 1998).

II.3.2. Cetoconazol

O CTZ é um antifúngico imidazólico de amplo espectro, constituindo tratamento seguro e eficaz para as dermatofitoses crônicas e recalcitrantes, bem como para outras micoses cutâneas e sistêmicas (DIEHL, 1996).

A base da atividade antifúngica é o bloqueio da conversão de lanosterol em ergosterol, necessário para manter a integridade da membrana dos organismos celulares (GUPTA; SAUDER; SHEAR, 1994).

II.3.2.1. Propriedades físico-químicas

O CTZ apresenta-se como pó branco, levemente amarelado, facilmente solúvel em diclorometano, solúvel em ácidos e em metanol, parcialmente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em água, sendo fotossensível (BRION, 1999).

II.3.2.2. Estrutura química e síntese orgânica

O CTZ é, quimicamente, cis-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina, com peso molecular de 531,4 e ponto de fusão de 148 a 152°C. Possui pKa de 3,0 e 6,5 e log P = 3,8 (n-octanol:tampão pH 10) (BRION, 1999).

O CTZ apresenta diversos efeitos colaterais como: náuseas, vômitos, desconforto abdominal, diarréia, tonteiras, cefaléia, diminuição da libido, erupção maculopapular, alterações hepáticas, ginecomastia e teratogenicidade (GUPTA; SAUDER; SHEAR, 1994).

A figura II.4. mostra o esquema de síntese do CTZ: 2,4 dicloroacetofenona é submetida a uma ciclização com glicerol na presença do benzeno-1-butanol e do ácido *p*-toluenossulfônico (**1**), levando à formação do produto (**2**); este pela ação do bromo, transforma-se em cis-2-(2,4-diclorofenil)-2-bromometil-4-hidroximetil-1,3-dioxolano (**3**), o qual é benzoilado com cloreto de benzoila, resultando o cis-2-(2,4-diclofenil)-2-bromometil-4-benzoiloximetil-1,3-dioxolano (**4**). A condensação deste com 1-H-imidazol produz o cis-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1-H-imidazol-1-metil)-4-benzoloximetil-1,3-dioxolano (**5**), o qual, em meio básico, é debenzoilado, dando cis-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1-H-imidazol-1metil)-4-hidroximetil-1,3-dioxolano (**6**). A reação do (6) com o cloreto de metanosulfonila produz o cis-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1-H-imidazol-1-metil)-1,3-dioxolano-4-metilmetanosulfonato (**7**). Finalmente, este composto é condensado com 1-acetil-4-(4-hidrofenil)piperazina, por meio de hidreto de sódio em benzeno-dimetilsufóxido, produzindo o cis-1-acetil-4-{4-{2-(2,4-diclorofenil)-2-(1-imidazolil –1-metil)-1,3-dioxilanil-4-metoxi]fenil}piperazina (cis I) (PERARO, 2001).

O CTZ é uma mistura racêmica de cis (2S,4R) e cis (2R,4S) enantiômeros, agem inibindo as enzimas do citocromo P450. O isômero cis (2S,4R) é três vezes mais potente que seu similar cis (2R,4S). (ROSTEIN et al., 1992).

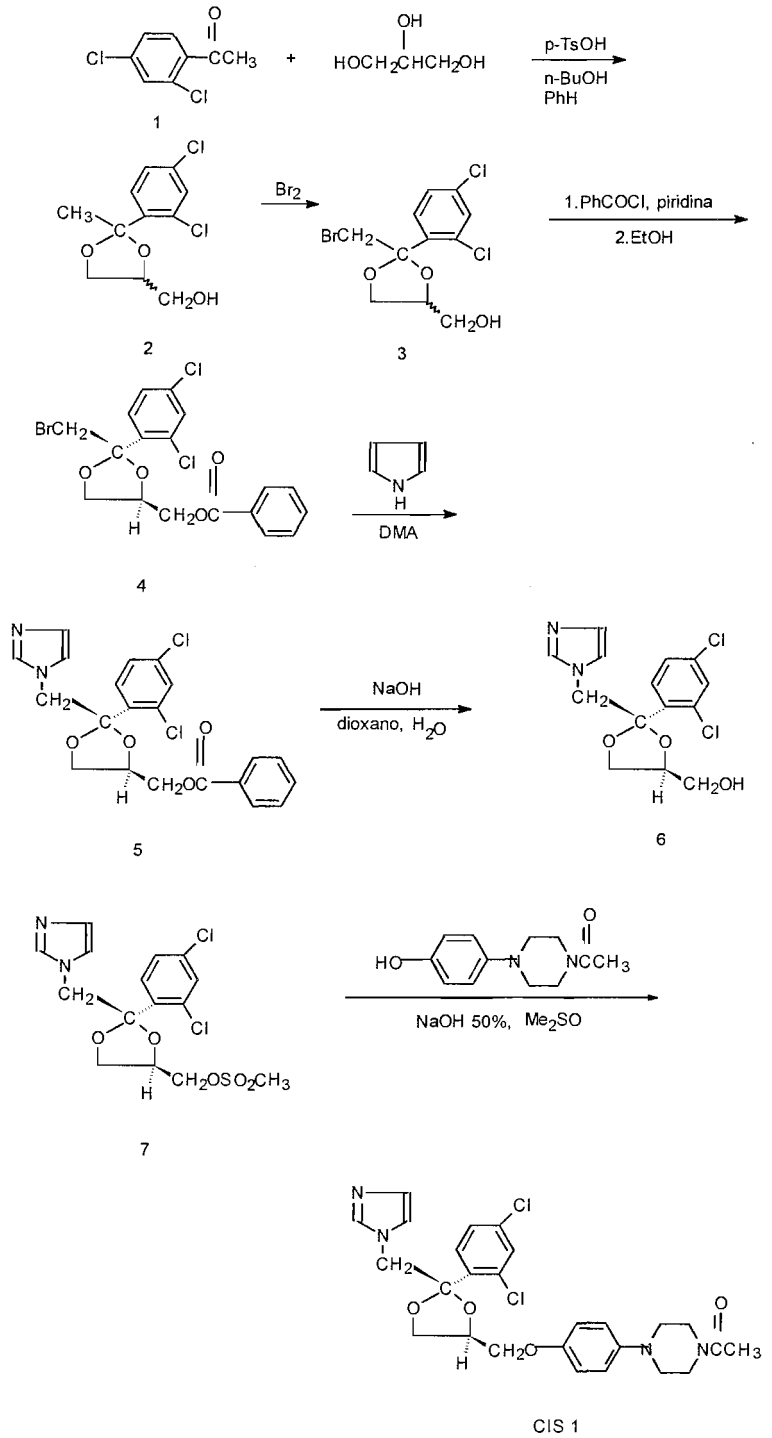


Figura II.6. Esquema de síntese do CTZ (Cis 1)

No mercado brasileiro, o CTZ é encontrado sob a forma de comprimidos, contendo 200 mg do fármaco, creme dermatológico e xampu, ambos produtos tópicos contendo 20 mg/g descritas no Dicionário de Especialidades Farmacêuticas (DEF, 2002/2003).

As principais formulações farmacêuticas contendo CTZ comercializadas no Brasil estão relacionadas na tabela II.1 (DEF, 2002/2003).

Tabela II.1 – Principais formulações farmacêuticas contendo cetoconazol comercializadas no Brasil

Nome Comercial	Forma Farmacêutica	Laboratório
Aciderm®	Comprimido, creme	Sanval
Arcolan®	Creme, xampu	Galderma
Candiderm®	Creme	Aché
Candoral®	Comprimido	Aché
Cetocona®	Comprimido	Herald's do Brasil
Cetoconazol	Comprimido	Bergamo
Cetoconazol	Comprimido, creme**, xampu	Neo-Química
Cetoconazol	Comprimido	Davidson
Cetoconazol	Comprimido	Ducto
Cetoconazol	Comprimido**	Apotex
Cetoconazol	Comprimido**	Ranbaxy
Cetoconazol	Comprimido**, creme**	Teuto Brasileiro
Cetoconazol	Comprimido, creme	Sanval
Cetoconazol	Comprimido, creme	Green Pharma
Cetoconazol	Comprimido, creme, xampu	Honorterápica
Cetoconazol	Creme**	Medley-Gen
Cetoconazol	Creme**, xampu**	Cristália
Cetoconazol	Comprimido	Glicolabor
Cetoconazol	Comprimido	Knoll/Basf Generix
Cetoconazol	Comprimido, creme, xampu	Luper
Cetoconazol	Comprimido**, creme**, xampu**	EMS
Cetoconazol	Comprimido	Neovita
Cetoconazol	Comprimido, creme, xampu	Cimed
Cetoconazol Bunker®	Comprimido, creme, xampu	Bunker
Cetoconazol Delta®	Comprimido, creme, xampu	Delta
Cetohal®	Comprimido	Hexal
Cetomed	Creme, xampu	Cimed
Cetonax®	Comprimido*, creme*, xampu*	Janssen-Cilag
Cetonil®	Comprimido, xampu	Stiefel
Cetozan®	Comprimido, creme	Royton
Cetozin®	Creme	Medic
Cetozol®	Comprimido, creme, xampu	Cazi
Fungiderm®	Comprimido, creme	Bergamo
Fungoral®	Comprimido, creme, xampu	Farmion
Ketacon®	Comprimido	Cellofarm
Ketocon®	Comprimido	Cibran
Ketomicol	Comprimido, creme, xampu	Luper
Ketonan®	Creme	Marjan
Ketonazol	Comprimido, creme, xampu	Bunker
Lozan®	Comprimido, creme, xampu	Teuto Brasileiro
Miconan®	Comprimido, creme	Ativus Farmacêutica
Micoral®	Comprimido, creme	Elofar
Nizoral®	Comprimido, creme, xampu	Janssen-Cilag
Noriderm®	Comprimido, creme, xampu	EMS
Noronal®	Comprimido	Ducto
Tiracaspa®	Xampu	Hexal
Triatop®	Xampu	Johnson & Johnson
Zanoc®	Comprimido, creme, xampu	Delta

*Medicamento Referência, **Medicamento Genérico. Fonte: (DEF, 2002/2003).

II.3.2.4. Absorção, Distribuição e Eliminação

O CTZ foi o primeiro agente antifúngico imidazólico de amplo espectro administrado oralmente, efetivo contra muitas infecções fúngicas previamente tratado por anfotericina B. É bem absorvido em pacientes com acidez gástrica normal. Sua biodisponibilidade pode ser reduzida em situações nas quais existe ausência de ácido clorídrico nos fluidos gástricos. A concentração máxima alcançada no soro é de duas a quatro horas, o estado estacionário no plasma é alcançado dentro de três a quatro dias. No plasma 99% de CTZ ligam-se às proteínas plasmáticas, em particular a albumina. Aproximadamente 1% fica na forma livre. O fármaco é amplamente distribuído na urina, saliva, fluidos inflamados das articulações, pele e tecidos, com baixa penetração no fluido cerebroespinhal. CTZ oral alcança a pele via vasos sanguíneos, sendo pela glândula sudorípara écrina a maior via pela qual o CTZ alcança o EC, o fármaco tem sido detectado no suor écrino pelo menos em uma hora após a administração de uma dose única de 400 mg. Uma das vias mais lenta da liberação do fármaco à pele são excreção no sebo e incorporação na camada basal epidermal (VAN TYLE, 1984; DANESHMEND; WARNOCK, 1983; HARRIS; JONES; ARTIS, 1983; GUPTA; SAUDER; SHEAR, 1994).

O CTZ é metabolizado pelo fígado sofrendo eliminação pré-sistêmica com oxidação do anel imidazólico seguida de uma degradação do imidazol oxidado; degradação oxidativa do anel de piperazina e hidroxilação aromática (PERARO, 2001). Os metabólitos não têm propriedade antifúngica e são excretados principalmente através da bile dentro do trato intestinal (VAN TYLE, 1984).

II.4. Formulações Semi-sólidas

As formulações empregadas no tratamento das afecções tópicas são preparações de consistência semi-sólida destinadas a serem aplicadas sobre a pele ou sobre determinadas

mucosas com a finalidade de exercer uma ação local ou de realizar a penetração percutânea de princípios medicamentosos. São constituídas por excipientes, no qual são dissolvidos ou dispersados, geralmente, um ou vários fármacos. A composição deste excipiente pode influir sobre os efeitos da preparação e sobre a liberação do fármaco (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995; LE HIR, 1997).

Os semi-sólidos se apresentam disponíveis em uma grande variedade de formas farmacêuticas, cada uma com características únicas. As *pomadas* são preparações semi-sólidas para a aplicação externa na pele ou em mucosas. Sua composição sofre amolecimento, mas não se liquefaz, quando aplicada sobre a pele. Terapeuticamente, as pomadas agem como emolientes e protetoras da pele, mas são utilizadas como veículos para a aplicação tópica de substâncias medicamentosas. Os *cremes* são formas farmacêuticas que contêm uma ou mais substâncias medicamentosas dissolvidas ou dispersas em uma base adequada, geralmente uma emulsão óleo em água ou dispersão microcristalina aquosa de ácidos graxos de cadeia longa ou álcoois, removíveis com água e aceitáveis sob o ponto de vista cosmético e estético. Os *géis* são sistemas semi-sólidos formados por suspensão de pequenas partículas inorgânicas ou grandes moléculas orgânicas interpenetradas por um líquido. Os géis podem tanto ter uma base aquosa (géis aquosos) como de solvente orgânico (organogéis). As *pastas* são formas farmacêuticas semi-sólidas que contêm uma ou mais substâncias medicamentosas incorporadas em uma base com grandes proporções de sólidos finamente dispersos (BLOCK, 1995; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995; LE HIR, 1997; ANSEL; POPOVICK; ALLEN, 2000).

Uma ampla variedade de matérias-primas está disponível para a preparação de uma forma farmacêutica. De acordo, com a literatura, os mais utilizados são: glicerídios; ceras; hidrocarbonetos; silicones polioxietilenoglicóis e homólogos; géis de produtos minerais:

bentonita; silício; géis de polímeros orgânicos: alginatos, gelose, pectina, metilcelulose e carboximetilcelulose, amido (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995; LE HIR, 1997).

As formulações semi-sólidas para a terapia medicamentosa dermatológica se destinam à produção da ação terapêutica desejada em locais específicos no tecido epidérmico. A capacidade de o medicamento penetrar a epiderme, derme e camadas subcutâneas da pele depende das propriedades do fármaco e da base carreadora (GUPTA; GARG, 2002).

Nos últimos anos têm sido estudados vários métodos para aumentar a velocidade de absorção de fármacos aplicados topicamente (ARIMA et al., 1998; CHEN; CHIEN, 1999; ASBILL; MICHNIAK, 2000; BARRY, 2001; WILLIAMS; BARRY, 2004):

Método físico utiliza força física, tais como eletricidade e ultra-som, para alterar a permeabilidade da pele ou aumentar a atividade termodinâmica visando aumento de absorção do fármaco (sonoforese, iontoforese, eletro-osmose e eletroporação);

Método químico incorpora promotores químicos em sistemas simples e/ou de liberação para reduzir a resistência da pele ou modificar a molécula com objetivo de melhorar o coeficiente de partição e/ou a difusividade dentro do EC (água; sulfóxidos e derivados; laurocaprano (azone) e seus derivados; pirrolidonas; ácidos graxos; álcoois, álcoois graxos e glicois; tensoativos; uréia; óleos essenciais, terpenos e derivados, e outros);

Método farmacotécnico integra fármacos em veículos carreadores, tais como micelas lipídicas, lipossomas para facilitar a deposição de fármacos dentro da pele.

Métodos bioquímicos: síntese de pró-fármacos bioconversíveis na pele e co-administração de inibidores do metabolismo cutâneo.

De acordo com HARADA et al. (1992), a ordem bioquímica da matriz lipídica intercelular do EC deve ser alterada para aumentar a penetração da substantiva ativa. No entanto, o promotor ideal deve promover a penetração do fármaco através da barreira da pele sem alterar permanentemente suas propriedades (CHEN; CHIEN, 1999).

A seguir tem-se o conjunto de propriedades que um promotor deveria possuir para ser empregado como promotor de penetração ou absorção cutânea" (WOLFGANG; SPROCKEL, 1988; ASBILL; MICHNIAK, 2000):

1. Ser farmacologicamente inerte e não possuir ação nos sítios receptores da pele ou do corpo de maneira geral;
2. Não ser tóxico, nem irritante e nem alergênico;
3. Sua ação deve ser reversível e imediata à aplicação e a duração do efeito deve ser adequada;
4. Quando removido da pele, o tecido deve recuperar imediata e completamente suas propriedades normais de barreira;
5. Reduzir a função de barreira da pele de maneira unidirecional, i.e. prevenindo a perda de eletrólitos ou outro material endógeno;
6. Ser quimicamente e fisicamente compatível com uma grande variedade de fármacos e adjuvantes farmacêuticos;
7. Ser um excelente solvente para os fármacos;
8. Espalhar-se bem sobre a pele;
9. Incorporar-se em loções, suspensões, pomadas, cremes, géis, aerosóis e/ou adesivos cutâneos;
10. Possuir baixo custo, não possuir odor e cor e ser dermatologicamente aceitável.

Os promotores químicos são a alternativa mais freqüentemente empregada em formulações tópicas e transdérmica, uma vez que estes podem interagir com os constituintes da pele promovendo o fluxo do fármaco (MEGRAB; WILLIANS; BARRY, 1995; WILLIAMS; BARRY, 2004).

HORI et al. (1990) classificaram os promotores químicos em diagrama segundo suas propriedades físico-químicas Os autores calcularam os valores orgânicos e inorgânicos destas

substâncias químicas (tabela II.4) e retrataram a localização destes promotores através de diagrama empregando os valores orgânicos *versus* os valores inorgânicos (Figura II.5). Duas áreas foram delimitadas no diagrama. A área I representa os compostos com maiores características hidrófilas, incluindo substâncias como o propilenoglicol, o etanol, os derivados da pirrolidona e o dimetilsulfóxido. Na área II, fizeram parte os compostos hidrófobos como o ácido oleico, o álcool e o ácido láurico, o miristato de isopropila, o 1-dodecilazaciclohepta-no-2-ona, o n-decilmetilsulfóxido e o N,N-dimetil-*m*-toluamida.

Tabela II.2 – Valores orgânicos e inorgânicos dos promotores de absorção cutânea

Promotores	Orgânico	Inorgânico
Água	0	100
Etanol	40	100
Propilenoglicol	60	200
N,N-Dimetilacetamida	80	200
N,N-Dimetiltoramida	60	200
2-Pirrolidona	80	145
N-Metilpirrolidona	100	145
5-Metil-2-pirrolidona	100	145
1,15-Dimetil-2-pirrolidona	120	145
1-Etil-2-pirrolidona	120	145
2-Pirrolidona-5-ácido carboxílico	100	295
Dimetilsulfóxido	80	140
Ácido Oléico	360	152
1-Dodecilazaciclohepta-no-2-ona	360	145
N,N-Dimetil-*m*-toluamida	240	215
n-Decilmetilsulfóxido	260	140
Álcool Láuril	240	100
Ácido Láurico	240	150
Miristato de Isopropila	330	60

Fonte: (HORI; SATOH; MAIBACH, 1990).

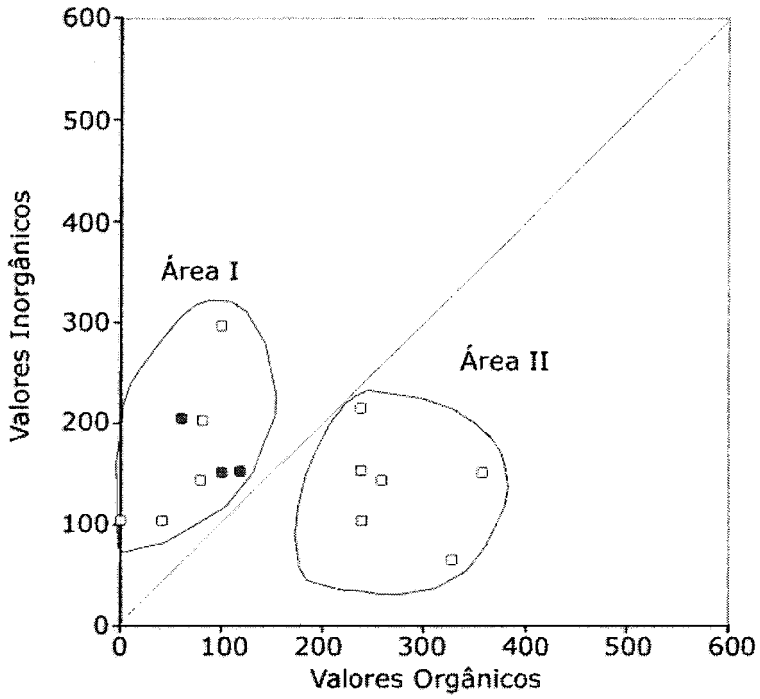


Figura II.7. – Localização no diagrama dos promotores de absorção cutânea apresentados na tabela II.5.

As diferenças de hidrofilia e lipofilia das várias substâncias químicas fazem com que as mesmas atuem por mecanismos diferentes. O modo de ação destes agentes têm sido revisado por vários autores (WALKER; SMITH, 1996; SUHONEN; BOWSTRA; URTTI, 1999; ASBILL; MICHNIAK, 2000; NAIK; KALIA; GUY, 2000; BARRY, 2001; WILLIAMS; BARRY, 2004; GHAFOURIAN et al., 2004). Em geral, os promotores químicos podem atuar sobre a pele, a formulação, e o fármaco: promovendo um aumento da difusão do fármaco sobre a pele; causando fluidização dos lipídeos, o que conduz a diminuição da função de barreira (ação reversível); resultando em um efeito reservatório dentro da pele; promovendo aumento e otimização da atividade termodinâmica do fármaco no veículo e na pele; afetando o coeficiente de partição do fármaco, visando aumentar sua liberação da formulação dentro das camadas superiores da pele.

Alguns parecem intumescer o EC conduzindo à perda de material estrutural essencial, reduzindo, portanto a resistência difusional e aumentando a permeabilidade. O mais eficaz é o dimetilsulfóxido (DMSO) seguido do dimetilformamida (DMF), da dimetilacetamida (DMA), da uréia, do propilenoglicol, e dos agentes tensoativos. O DMSO, a DMF e a DMA são fortemente higroscópicos e é provável que a presença destas substâncias no EC aumente a hidratação deste tecido, portanto a sua permeabilidade (SARPOTDAR; ZATZ, 1986; HADGRAFT, 2001).

O propilenoglicol é freqüentemente usado como componente de uma formulação. É uma molécula pequena, capaz de se transferir através da pele alterando sua característica de solubilidade, conseqüentemente promovendo um aumento na velocidade de absorção de diversas substâncias ativas. Além disso, comporta-se como co-solvente alterando a atividade termodinâmica do fármaco através do aumento de sua solubilidade no veículo (ELGINDY, 1993; MEGRAB; WILLIANS; BARRY, 1995; GWAK; CHUN, 2001; HADGRAFT, 2001; PANCHAGNULA et al., 2004).

REFAI e MÜLLER-GOYMANN (2002) avaliaram o comportamento promotor do miristato de isopropila em formulações com hidrocortisona e verificaram por calorimetria diferencial de varredura do EC que houve uma alteração em sua estrutura lipídica ocasionando aumento da permeabilidade do fármaco.

Os ácidos graxos apresentam uma vantagem de serem um componente endógeno da pele humana. Podem diferir em vários aspectos: comprimento da cadeia, características da dupla ligação (posição, número, configuração), ramificação e substituintes. Estas variações estruturais podem influenciar seus efeitos como promotores de penetração da pele. São capazes de inserir entre a porção hidrofóbica da bicamada lipídica do EC, perturbar sua estrutura, e assim, aumentar sua fluidez e diminuir a resistência difusional para os permeantes (SANTOYO; YGARTUA, 2000; COTTE et al., 2004).

Provavelmente, os agentes tensoativos aumentam a permeabilidade da pele por promoverem uma desorganização na estrutura da bicamada lipídica da pele, de maneira a permitir maior liberdade de passagem de substâncias hidrófilas. Quando ocorre penetração, os tensoativos aniônicos são os que penetram melhor, seguidos pelos catiônicos e pelos não iônicos. Os sabões de diferentes ácidos graxos possuem estas propriedades em graus variados, sendo a penetração mais significativa para os sais de ácidos graxos com cadeia carbônica de 10 ou menos átomos de carbono. A penetração dos sabões de ácidos graxos varia inversamente com o pH. Em pH elevado (aproximadamente 11), a ação do tensoativo aniônico parece ser atenuada ou mascarada por influência do próprio pH mais alcalino (CHEN; CHIEN, 1999; IDSON; LAZARUS, 2001).

II.5. Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos

Nos últimos vinte anos, houve uma expansão da indústria farmacêutica de medicamentos genéricos para sólidos orais, surgindo à necessidade de se garantir a intercambialidade desses produtos com o medicamento pioneiro ou inovador (STORPIRTIS, 1999).

A intercambiabilidade entre o genérico e seu respectivo medicamento de referência baseia-se no conceito da equivalência terapêutica entre os mesmos, geralmente assegurada pela comprovação da equivalência farmacêutica, da bioequivalência e das boas práticas de fabricação e controle de qualidade (STORPIRTIS et al., 2004). Para demonstrar a equivalência terapêutica por métodos convencionais seria necessária a realização de ensaios clínicos de longa duração. Com o objetivo de economizar recursos financeiros e tempo, e também em virtude de considerações éticas em relação ao elevado número de pacientes envolvidos em tais ensaios, a comparação clínica direta tem sido substituída por avaliações indiretas (PORTA, 1999).

Desta forma, para os produtos sólidos orais toma-se como base o princípio de que curvas semelhantes de decaimento sanguíneo de fármacos produzam o mesmo resultado em termos de eficácia e segurança. Ensaios de bioequivalência são realizados nos quais a biodisponibilidade do produto genérico é comparada à do produto original. Assim, não basta que esses produtos sejam equivalentes farmacêuticos, é necessário que sejam bioequivalentes. Nesse contexto, a bioequivalência pode ser considerada um substituto da equivalência terapêutica, desde que exista relação bem definida entre concentração do fármaco e efeito terapêutico e segurança (STORPIRTIS, 1999).

Apesar das tentativas de harmonização, existem, ainda, diferenças entre as definições dos termos bioequivalência, biodisponibilidade, equivalência terapêutica, equivalentes farmacêuticos, medicamentos bioequivalentes, medicamento de referência e medicamento genérico (ROLIM, 2001). A seguir, os conceitos descritos estão baseados na legislação nacional vigente (BRASIL, 2003):

Bioequivalência é um parâmetro que consiste na demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio(s) ativo(s), e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental.

Biodisponibilidade é um parâmetro que indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina.

Equivalência terapêutica: dois medicamentos são considerados terapeuticamente equivalentes se eles são farmaceuticamente equivalentes e, após administração na mesma dose molar, seus efeitos em relação à eficácia e segurança são essencialmente os mesmos, o

que se avalia por meio de estudos de bioequivalência apropriados, ensaios farmacodinâmicos, ensaios clínicos ou estudos *in vitro*.

Equivalentes farmacêuticos são medicamentos que contém o mesmo fármaco, isto é, mesmo sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos. Devem cumprir com as mesmas especificações atualizadas da Farmacopéia Brasileira e, na ausência destas, com as de outros códigos autorizados pela legislação vigente ou, ainda, com outros padrões aplicáveis de qualidade, relacionados à identidade, dosagem, pureza, potência, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução, quando for o caso.

Medicamentos bioequivalentes são equivalentes farmacêuticos que, ao serem administrados na mesma dose molar, nas mesmas condições experimentais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação a biodisponibilidade.

Medicamento de referência é o medicamento inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no País, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro; cuja biodisponibilidade foi determinada durante o desenvolvimento do produto e que teve sua eficácia e segurança comprovada por meio de ensaios clínicos, antes da obtenção do registro para comercialização (STORPIRTIS, 1999).

Medicamento genérico é o medicamento similar a um produto de referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela DCB ou, na sua ausência, pela DCI. Além disso, o fabricante deve investir no desenvolvimento farmacotécnico de um produto que cumpra com as mesmas especificações *in vitro*, em relação ao medicamento de

referência. Entretanto, se aceita que a formulação e o processo de fabricação não sejam idênticos, o que geralmente ocorre devido aos diferentes equipamentos e fornecedores de matérias-primas empregados por distintos fabricantes, desde que essas diferenças não comprometam a bioequivalência entre os produtos (STORPIRTIS, 1999).

Nos últimos 10 anos, tem-se discutido e pesquisado sobre como determinar a avaliação da bioequivalência de produtos tópicos semi-sólidos. Estas formulações são destinadas a liberar o fármaco para pele com o objetivo de tratar doenças e/ou aliviar sintomatologia. Estes produtos induzem a resposta terapêutica quando aplicados à pele doente; o início, a duração e a magnitude desta resposta depende da eficiência de três processos seqüenciais: liberação do fármaco do veículo; penetração/difusão do fármaco através do EC e ativação do efeito farmacológico desejado (SHAH, 2001).

A bioequivalência focaliza a liberação do fármaco da formulação e subseqüente distribuição no sítio ativo. Geralmente, pode ser documentada através da realização de diferentes tipos de estudos comparando medicamento de referência e genérico. Estas avaliações podem ser classificadas em ordem de preferência como: análise farmacocinética, análise farmacodinâmica, ensaios clínicos comparativos e estudos *in vitro* (SHAH et al., 1998; SHAH, 2001).

II.5.1. Fatores que influenciam a biodisponibilidade e bioequivalência de produtos tópicos

De acordo com BORSADIA et al. (1992), a biodisponibilidade e bioequivalência de produtos dermatológicos tópicos são principalmente influenciadas pelo veículo, pelo fármaco e efeitos biológicos.

II.5.1.1. Efeito do veículo

Nos últimos anos, tem-se dado atenção à influência do veículo no movimento do fármaco através da pele.

Os veículos usados em formulações tópicas podem afetar as propriedades de barreira da pele humana e conseqüentemente a velocidade de permeação de fármacos por alterar o coeficiente de partição (**K_p**) entre o veículo e a membrana e/ou o coeficiente de difusão (**D**) dentro da membrana (conforme fórmula descrita no item II.2 neste capítulo). O primeiro é um efeito termodinâmico, ao passo que o segundo é um efeito cinético que pode estar relacionado aos efeitos estruturais tais como alterações nas ligações intermoleculares dos lipídeos do EC (SINGH; SINGH, 1993; ROSADO et al., 2003).

Veículos como propilenoglicol, etanol, miristato de isopropila, freqüentemente usados como componentes de uma formulação, são capazes de alterar a estrutura lipídica do EC promovendo aumento da permeabilidade do fármaco (MEGRAB; WILLIANS; BARRY, 1995; HADGRAFT, 2001; ALBERTI et al., 2001b). Outras substâncias químicas que devido às suas características de hidrofilia e lipofilia podem influenciar o comportamento do fármaco na pele estão descritas no ítem II.3 deste capítulo.

A formulação também pode ser dita como um veículo e tem um papel dominante na terapia tópica, porque se encontra no local de ação. Teoricamente, a eficiência destas preparações em promover a penetração de fármacos na pele também está relacionada com o modo no qual podem alterar a atividade da água presente no EC e influenciar o coeficiente de partição EC/água (SINGH; SINGH, 1993; IDSON; LAZARUS, 2001).

A formulação quando presente na pele nem sempre se mantém em forma inalterada. A evaporação da água da base poderia deixar as moléculas do fármaco imersas em uma fase oleosa. Sistemas de emulsão tipo óleo-em-água podem inverter para sistemas tipo água-em-óleo, o que faria com que o fármaco se difundisse através de uma camada oleosa para alcançar

a pele. Componentes não-voláteis da formulação aumentam de concentração na medida em que os componentes voláteis são eliminados; isto pode alterar o estado de saturação do fármaco e, conseqüentemente, sua atividade. O fármaco pode precipitar em decorrência da falta de solvente (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Muitas formulações dermatológicas modernas são sistemas laváveis óleo-em-água. Pomadas usadas para a aplicação de medicamentos insolúveis ou solúveis em óleo deixam um filme gorduroso sobre a pele, inibindo perda de umidade e estimulando a hidratação da camada de queratina, resultando em um aumento da penetração do fármaco. Enquanto que a aplicação de cremes e loções sob condições normais (não-oclusivas) permite alteração de ar e água, sendo assim a pele não alcança maior estado de hidratação (IDSON; LAZARUS, 2001; REFAI; MÜLLER-GOYMANN, 2002).

É importante otimizar a forma farmacêutica para maximizar a biodisponibilidade da substância ativa, uma vez que, a velocidade de liberação do fármaco da formulação pode ser manipulada pela mudança da sua concentração, variação do coeficiente de partição e aumento de sua solubilidade (WELIN-BERGER; NEELISSEN; BERGENSTAHL, 2001).

Diferentes formulações podem resultar em diferentes quantidades de penetração do fármaco dentro da pele e podem, assim, exibir diferentes intensidades de atividade (REFAI; MÜLLER-GOYMANN, 2002). Isto sugere que a avaliação da biodisponibilidade e bioequivalência de produtos tópicos deve ser feita entre formulações similares, por exemplo, entre cremes, entre pomadas ou entre loções.

II.5.1.2. Efeito do fármaco

Polimorfismo e tamanho da partícula são exemplos de fatores que podem determinar a solubilidade ou velocidade de dissolução de um fármaco, conseqüentemente podem

influenciar a biodisponibilidade e bioequivalência de produtos tópicos (BORSADIA et al., 1992), assim como o coeficientes de difusão e de partição (MIGRATORI, 2000).

O coeficiente de difusão de um fármaco na pele será determinado por fatores como tamanho, forma e carga; o coeficiente de partição será determinado pela sua solubilidade nos lipídeos, estruturas responsáveis pelas propriedades de permeabilidade da barreira do EC. Sendo assim, substâncias que têm baixa solubilidade em óleo poderão apresentar baixas velocidades de penetração (MIGRATORI, 2000; FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

II.5.1.3. Efeitos biológicos

Existe extensa literatura sobre a influência de solvente orgânico e molécula anfifílica sobre o estrato córneo. Estes fazem parte dos efeitos dos veículos. Sob outros aspectos, tem-se pouca pesquisa sobre como fatores biológicos podem influenciar a biodisponibilidade. Ambos metabolismo da pele e fluxo sanguíneo podem influenciar a concentração do fármaco na pele. Além disso, a idade da pele e matéria do sítio regional da pele são outros fatores que podem influenciar a biodisponibilidade de produtos tópicos (BORSADIA et al. 1992).

II.5.2. Análise Farmacodinâmica

A avaliação da bioequivalência dos produtos tópicos dermatológicos da classe dos corticosteróides pode ser realizada através da avaliação da resposta farmacodinâmica produzida por estas formulações quando aplicadas topicamente em voluntários sadios. Esta classe de fármacos produz um efeito vasoconstritor que resulta no branqueamento da pele, esta resposta tem sido correlacionada com a sua potência e eficácia (UNITED STATES, 1995).

O estudo consiste na avaliação do branqueamento da pele resultante do efeito vasoconstritor através do emprego de um cromômetro ou colorímetro, que quantifica a

resposta branqueadora permitindo a medida do início, da duração e do declínio da resposta (CARON et al., 1990; PERSHING et al., 1992; SINGH et al., 1999).

De acordo com a legislação dos Estados Unidos (FDA - Food and Drug Administration), Comunidade Européia (EMEA - The European Agency for The Evaluation of Medicinal Products), Canadá (WHO – World Health Organisation), a demonstração da bioequivalência entre produtos tópicos dermatológicos só poder ser realizada para a classe dos corticosteróides seguindo o protocolo de vasoconstrição (UNITED STATES, 1995). As demais classes ainda não possuem um protocolo oficial.

II.5.3. Análise Farmacocinética

As medidas de concentração do fármaco no sangue, plasma e/ou urina são empregadas para estabelecer a bioequivalência/biodisponibilidade (BE/BD) de medicamentos sólidos orais em voluntários sadios após uma dose de administração. Esta avaliação está bem regulamentada na legislação de vários paises como Brasil (Anvisa/MS), Estados Unidos (FDA - Food and Drug Administration), Comunidade Européia (EMEA - The European Agency for The Evaluation of Medicinal Products), Canadá (WHO – World Health Organisation) e outros.

As formulações semi-sólidas tópicas geralmente não produzem concentrações do fármaco quantificáveis no sangue, plasma e/ou urina. Além disso, a disponibilidade sistêmica não deve refletir propriamente a biodisponibilidade cutânea para medicamentos que tratam das afecções da pele (BORSADIA et al., 1992).

Tem-se discutido, que a camada do estrato cutâneo é mais indicada para uma medida adequada e mensurável da biodisponibilidade tópica do fármaco. Esta abordagem vem sendo denominada de dermatofarmacocinética (DFC) (SHAH et al.,1998; SHAH; ELKINS; WILLIAMS, 1999; SHAH, 2001).

A DFC pode ser utilizada como medida de BE/BD para formulações tópicas, uma vez que, a camada córnea tem a propriedade de reter na sua estrutura substâncias ativas resultando no assim chamado "efeito reservatório", e a determinação do fármaco nesse local proporcionaria medida direta da concentração da substância ativa em seu sítio de ação (MISELNICKY et al., 1988; RIVIERE, 1993, REDDY et al., 2002).

Uma metodologia denominada de *tape stripping* ou "remoção do estrato córneo" por fitas adesivas tem sido proposta para medir a velocidade e extensão da penetração do fármaco no EC do antebraço de voluntários sadios. É uma técnica rápida e relativamente não invasiva, os dados obtidos podem ser empregados para estimar o coeficiente de permeabilidade e coeficiente de partição *in vivo* e tem sido proposta para avaliar a bioequivalência de produtos semi-sólidos para uso tópico (SHAH, 1995, SHAH et al., 1998, PERSHING, 2001; REDDY et al., 2002).

Nos estudos de DFC, o perfil de concentração *versus* tempo do fármaco no EC é obtido após a aplicação da formulação em múltiplos sítios. Cada sítio indica a concentração do fármaco em um determinado período de tempo. Os intervalos de aplicação devem ser determinados previamente, sendo as amostras do EC removidas seqüencialmente por fitas adesivas através da técnica de *tape stripping*. A quantidade do fármaco presente nestas fitas deve ser extraída e analisada empregando uma metodologia analítica previamente validada. (SHAH et al., 1998; SHAH, 2001).

Para tal, a quantificação do EC removido é de importância relevante para estabelecer a concentração do fármaco na pele após a aplicação da formulação. A pesagem é o método preferido para medir a quantidade removida (WEIGMANN et al., 1999-a; WEIGMANN et al., 1999-b; KALIA et al. 2001; WEIGMANN et al., 2001), mas, às vezes, torna-se inviável, e uma alternativa poderia ser um método colorimétrico para proteínas (DREHER et al., 1998).

Assim sendo, a quantidade de fármaco obtida nos estudos de DFC poderia ser expressa como quantidade de fármaco por quantidade de EC retirado (μg de fármaco/mg de EC) em função do tempo.

Para produtos sólidos orais, de acordo com a legislação nacional (Brasil, 2003), dois medicamentos serão considerados bioequivalentes se os valores extremos do intervalo de confiança de 90% da razão da média geométrica ($ASC_{0\text{-teste}}/ASC_{0\text{-referência}}$) forem maiores que 0,8 e menores que 1,25.

Este limite também foi utilizado nos estudos da determinação da bioequivalência de produtos semi-sólidos como gel de tretinoina 0,025% (PERSHING et al., 2003) e gel de cetoprofeno 2,5% (LODÉN et al., 2004).

A metodologia *tape stripping* tem sido empregada para medir a quantidade de várias substâncias ativas no EC como fluoresceína sódica (CODERCH et al., 1996); piroxicam (PELLETT; ROBERTS; HADGRAFT, 1997); ácido salicílico (TSAI et al., 1999); propionato de clobetasol (WEIGMANN et al., 1999-b; WEIGMANN et al., 2001); terbinefina (ALBERTI et al., 2001a; ALBERTI et al., 2001b); oxibenzona (WISSING; MÜLLER, 2002); tretinoina (PERSHING et al., 2003); cetoprofeno (LODÉN et al., 2004); benzofenona-4 (OTTO et al., 2005) e tem sido provado que é uma técnica aplicável para várias classes terapêuticas e tipos de formulações (SHAH, 2001).

O FDA, órgão responsável pela legislação americana mantém em consulta pública desde junho de 1998 o "*Guidance for Industry – Draft – Topical dermatological drug products NDAs and ANDAS – In vivo bioavailability, bioequivalence. In vitro release and associated studies*". Este guia indica a metodologia de *tape stripping* como avaliação de BE/BD para várias classes de produtos dermatológicos com antifúngicos, retinóicos, antiinflamatórios (UNITED STATES, 2000).

II.5.4. Ensaios Clínicos Comparativos

Ensaios clínicos comparativos são geralmente difíceis de serem executados: altamente variáveis; insensíveis; consomem muito tempo; têm alto custo. É necessário um elevado número de voluntários para avaliar a bioequivalência através deste ensaio, cerca de 275 a 500 para estudos com tretinoina e 275 a 300 são recomendados para ensaios com antifúngicos (SHAH, 1995; SHAH, 2001).

Com exceção da classe dos corticosteróides que tem legislação oficial para estabelecer BE/BD, as demais classes de produtos dermatológicos têm a possibilidade de realizar esta avaliação através de ensaios clínicos comparativos, quando superado as dificuldades do mesmo.

II.5.5. Estudos *In Vitro*

Os testes de liberação *in vitro* das substâncias ativas têm chamado muita atenção após a edição do SUPAC-SS (UNITED STATES, 1997).

De acordo com a edição do SUPAC-SS (UNITED STATES, 1997), a liberação *in vitro* do fármaco é uma propriedade da formulação que o contém. A velocidade de liberação dos produtos tópicos dermatológicos pode ser medida empregando um sistema bicompartimental como célula de difusão vertical com membrana sintética e meio aceptor adequado. A membrana sintética serve como um suporte para separar a formulação do meio receptor, devendo ser quimicamente inerte para não reagir com a formulação ou com o meio aceptor, e não deve ser velocidade limitante nos processos de liberação do fármaco, sendo empregados acetato de celulose, nitrato de celulose, polisulfona (HAIGH; SMITH, 1994). A solução receptora deve ser compatível com a metodologia analítica empregada para quantificação do fármaco.

Soluções receptoras como misturas hidro-alcóolicas e água são empregadas como meio aceptor, obedecendo a condição *sink*, ou seja, o volume empregado é cinco vezes maior que o ponto de saturação do fármaco (ZATZ, 1995).

Os dados obtidos podem ser empregados como medida de equivalência para produtos de formulações semi-sólidas sujeitas a alterações especificadas pela SUPAC (*Scale-Up and Postapproval Changes*), ou seja, como controle de qualidade para assegurar a uniformidade lote a lote dos produtos (FDA, 1997; SHAH; ELKINS; WILLIANS, 1999; FLYNN et al., 1999).

A atividade termodinâmica e a viscosidade têm um efeito dominante sobre a liberação da substância ativa do veículo (DAVIS; KHANDERIA, 1972). A velocidade de liberação do fármaco da formulação pode ser manipulada pela mudança da sua concentração, variação do coeficiente de partição e aumento de sua solubilidade na formulação (WELIN-BERGER; NEELISSEN; BERGENSTAHL, 2001).

Pesquisas crescentes têm sido realizadas em busca do aparato mais adequado para avaliar a velocidade de liberação *in vitro* para produtos tópicos dermatológicos, uma vez que, oficialmente, não existe uma padronização que possa ser aplicada para todas as formulações semi-sólidas.

Sendo assim, encontram-se descritos na literatura vários modelos de células de difusão, tipos de membranas artificiais, que são empregados na avaliação da velocidade de liberação *in vitro* de fármacos em diferentes formas farmacêuticas (KNORST; NEUBERT; WOHLRAB, 1997; REGE; VILIVALAM; COLLINS, 1998; KIERSTAN et al., 2001; WELIN-BERGER; NEELISSEN; BERGENSTAHL, 2001; WISSING; MÜLLER, 2002; GALLAGHER; TROTTED; HEARD, 2003; CSÓKA et al., 2005).

A avaliação *in vitro* da penetração e permeação cutânea de fármacos também pode ser avaliada por um sistema bicompartimental de difusão vertical, empregando membrana

natural. Dentre os vários tipos de pele animal (rato, cobaio, camundongo com e sem pele, macaco rhesus, cobra) que podem ser utilizadas, recentemente, tem-se empregado a pele suína devido a sua similaridade com a pele humana (HAIGH; SMITH, 1994; LOPES; KANEKO, 2000; SEKKAT; KALIA; GUY, 2002; MEDI; SINGH, 2003).

II.6. Referências Bibliográficas*

ABRAHAM, W.; DOWNING, D.T. Preparation of model membranes for skin permeability studies using corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.93, p.809-815, 1989.

AGACHE, P.; LAURENT, R.; LARDANS, L.; BLANC, D. Epiderme, pêlo, glândulas sebáceas e sudoríparas. In: PRUNIERAS, M., dir. *Manual de cosmetología dermatológica*. 2.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1994. p.109-151.

ALBERTI, I.; KALIA, Y.N.; NAIK, A.; BONNY, J.-D.; GUY, R.H. Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum *in vivo*. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.219, p.11-19, 2001b.

ALBERTI, I.; KALIA, Y.N.; NAIK, A.; BONNY, J.-D.; GUY, R.H. *In vivo* assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.71, p.319-327, 2001a.

ALY, R. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis, v.31, n.3, suppl.S, pt.2, p.S21-S29, 1994.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V.J.R. *Farmacotécnica*: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p.397-400.

ARIMA, H.; MIYAJI, T.; IRIE, T.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Enhancing effect of hydroxypropyl-β-ciclodextrin on cutaneous penetration and activation of the 4-biphenylyl acetate in hairless mouse skin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.6, p.53-59, 1998.

ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local *versus* transdermal activity. *Pharm. Sci. Technol. Today*, Oxford, v.3, n.1, p.36-41, 2000.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.14, p.101-114, 2001.

BLANCO, M.D.; BERNARDO, M.V.; TEIJÓN, C.; SASTRE, R.L.; TEIJÓN, J.M. Transdermal application of bupivacaine-loaded poly(acrylamide(A)-co-monomethyl itaconate) hydrogels. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.255, p.99-107, 2003.

BLOCK, L.H. Medicated applications. In: REMINGTON: the science and pratice of pharmacy. 19.ed. Easton: Mack, 1995. cap.10, p.1577-1583.

BORSADIA, S.; GHANEM, A.H.; SETA, Y.; HIGUCHI, W.I.; FLYNN, G.L.; BEHL, C.R.; SHAH, V.P. Factors to be considered in the evaluation of bioavailability and bioequivalence of topical formulations. *Skin Pharmacol.*, Basel, v.5, p.129-145, 1992.

BRASIL. Resolução – RDC n.135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. *Diário Oficial da União*, Brasília, n.104, 02 jun. 2003. Seção 1, p.28-30.

BRILHANTE, R.S.; PAIXÃO, G.C.; SALVINO, L.K.; DIOGENES, M.J.; BANDEIRA, S.P.; ROCHA, M.F.; SANTOS, J.B.; SIDRIM, J.J. Epidemiology and ecology of dermatophytoses in the City of Fortaleza: trichophyton tonsurans as important emerging pathogen of Tinea capitis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.33, n.5, p.417-425, 2000.

BRION, J.D. Conazoles. In: ASSOCIATION FRANÇAISE DES ENSEIGNANTS DE CHIMIE THÉRAPEUTIQUE. *Traité de chimie thérapeutique*: principaux antifongiques et antiparasitaires. Paris: Technique et Documentation, 1999. cap.6, p.115-169.

CARON, D.; QUEILLE-ROUSSEL, C.; SHAH, V.P.; SCHAEFER, H. Correlation between drug penetration and the blanching effect of topically applied hydrocortisone creams in humans. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis, v.23, p.458-462, 1990.

CHEN, L.-L.H.; CHIEN, Y.W. Enhancement of skin permeation. In: MAGDASSI, S.; TOUITOU, E., eds. *Novel cosmetic delivery systems*. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.3, p.51-69. (Cosmetic science and technology, v.19).

CHINELLI, P.A.; SOFIATTI, A.A.; NUNES, R.S.; MARTINS, J.E. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.45, n.5, p.259-263, 2003.

CODERCH, L.; OLIVA, M.; PONS, M.; MAZA, A.; MANICH, A.M.; PARRA, J.L. Percutaneous penetration of liposomes using the tape stripping technique. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.139, p.197-203, 1996.

COSTA, M.; PASSOS, X.S.; SOUZA, L.K.H.; MIRANDA, A.T.B.; LEMOS, J.A.; OLIVEIRA Jr., J.G.; SILVA, M.R.R. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.35, n.1, p.19-22, 2002.

COSTA, T.R.; COSTA, M.R.; SILVA, M.V.; RODRIGUES, A.B.; FERNANDES, O.F.; SOARES, A.J.; SILVA, M.R. The etiology and epidemiology of dermatophytoses in

Goiânia, GO, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.32, n.4, p.367-371, 1999.

COTTE, M.; DUMAS, P.; BESNARD, M.; TCHORELOFF, P.; WALTER, P. Synchrotron FT-IR microscopic study of chemical enhancers in transdermal drug delivery: example of fatty acids. *J. Controlled Release,* Amsterdam, v.97, p.269-281, 2004.

CSÓKA, I.; CSÁNYI, E.; ZAPANTIS, G.; NAGY, E.; FEHÉR-KISS, A., HORVÁTH, G., BLAZSÓ, G.; EROS, I. *In vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.291, p.11-19, 2005.

DANESHMEND, T.K.; WARNOCK, D.W. Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v.8, p.17-42, 1983.

DAVIS, S.S.; KHANDERIA, M.S. Viscoelastic properties of pharmaceutical semi-solids: characterization of the plastibases for bioavailability studies. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.24, p.176-180, 1972.

DEF: dicionário de especialidades farmacêuticas 2002/2003. 31.ed. Rio de Janeiro: Publicações Médicas, 2003. p.95.

DIEHL, K.B. Topical antifungal agents: an update. *Am. Fam. Phys.*, Kansas, v.54, n.5, p.1687-1692, 1996.

DREHER, F.; ARENS, A.; HOSTYNEK, J.J.; MUDUMBA, S.; ADEMOLA, J.; MAIBACH, H.I. Colorimetric method for quantifying human stratum corneum removed by adhesive-tape-stripping. *Acta Derm.-Venereol.*, Basingstoke, v.78, p.186-189, 1998.

ELGINDY, N.A. Formulation of permeation enhancers for indomethacin hidrogels. *Pharmazie*, v.48, n.8, p.616-619, 1993.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia.* São Paulo: EDUSP, 2003. p.531-542.

FLYNN, G.L.; SHAH, V.P.; TENJARLA, S.N.; CORBO, M.; DEMAGISTRIS, D.; FELDMAN, T.G.; FRANZ, T.J.; MIRAN, D.R.; PEARCE, D.M.; SEQUEIRA, J.A.; SWARBRICK, J.; WANG, J.C.T.; YACOBI, A.; ZATZ, J.L. Assessment of value and applications of *in vitro* testing of topical dermatological drug products. *Pharm. Res.*, Norwell, v.16, n.9, p.1325-1330, 1999.

FORESTIER, J.P. Les enzymes de léspace extra-cellulaire du stratum corneum. *Int. J. Cosmet. Sci.*, London, v.14, p.47-63, 1992.

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

GALLAGHER, S.J.; TROTTED, L.; HEARD, C.M. Ketoprofen: release from, permeation across and rheology of simple gel formulations that simulate increasing dryness. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.268, p.37-45, 2003.

GEINOZ, S.; REY, S.; BOSS, G.; BUNGE, A.L.; GUY, R.H.; CARRUPT, P.A.; REIST, M.; TESTA, B. Quantitative structure-permeation relationships for solute transport across silicone membranes. *Pharm. Res.*, Norwell, v.19, n.11, p.1622-1629, 2002.

GHAFOURIAN, T.; ZANDASRAR, P.; HAMISHEKAR, H.; NOKHODCHI, A. The effect of penetration enhancers on drug delivery through skin: a QSAR study. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.99, p.113-125, 2004.

GUPTA, A.K.; SAUDER, D.N.; SHEAR, N.H. Antifungal agents: an overview. Pt.1. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis, v.30, n.5, p.677-698, 1994. [Revierw].

GUPTA, A.K.; SAUDER, D.N.; SHEAR, N.H. Antifungal agents: an overview. Pt.2. *J. Am. Acad. Dermatol.,* Saint Louis, v.30, n.6, p.911-933, 1994. [Revierw].

GUPTA, P.; GARG, S. Avanços recentes nas formas de dosagem semi-sólidas para aplicação dermatológica. *Pharm. Technol., Ed. Bras.*, São Paulo, v.6, n.3, p.4-20, 2002.

GWAK, H.S.; CHUN, I.K. Effect of vehicles and enhancers on the *in vitro* skin penetration of aspalatone and its enzymatic degradation across rat skins. *Arch. Pharm. Res.*, Seoul, v.24, n.6, p.572-577, 2001.

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

HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for *in vitro* diffusion experiments. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.2, p.311-330, 1994.

HARADA, K.; MURAKAMI, T.; YATA, N.; YAMAMOTO, S. Role of intercellular lipids in stratum corneum in the percutaneous permeation of drugs. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.99, p.278-282, 1992.

HARRIS, R.; JONES, H.E.; ARTIS, W.M. Orally administered ketoconazole: route of delivery to stratum corneum. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.24, p.876-882, 1983.

HEERES, J.; BACKX, L.J.J.; MOSTMANS, J.H.; VAN CUTSEM, J. Antimycotic: imidazoles. Pt.4. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new potent orally active broad-spectrum antifungal agent. *J. Med. Chem.*, Columbus, v.22, n.8, p.1003-1005, 1979.

HORI, M.; SATOH, S.; MAIBACH, H.I. Classification of percutaneous penetration enhancers: a conceptional diagram. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.42, p.71-82, 1990.

Capítulo III – Formulações Antimicóticas

III.1 Introdução

Os semi-sólidos constituem uma proporção significativa das formas farmacêuticas disponíveis na terapêutica. Atuam como transportadores para medicamentos que são topicamente administrados na pele, mucosa nasal, revestimento externo da orelha, córnea, mucosa bucal, mucosa retal, vagina e uretra (GUPTA; GARG, 2002).

As formas farmacêuticas semi-sólidas se destinam à produção da ação terapêutica desejada em locais específicos no tecido epidérmico ou dérmico. A capacidade do fármaco penetrar a epiderme, derme e camadas subcutâneas depende das propriedades do fármaco e da base carreadora (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

A eficácia total da formulação tópica depende das características de liberação do fármaco a partir do veículo e da farmacocinética do fármaco, ou seja, de como ele se difunde através da pele. O transporte em massa de uma formulação ocorre pela movimentação das moléculas ou pela difusão das partículas (em uma suspensão) ou de gotas do óleo (em uma emulsão) (WELIN-BERGER; NEELISSEN; BERGENSTAHL, 2001).

Dependendo do seu comportamento reológico, da sua adesividade, os semi-sólidos podem aderir à superfície de aplicação por períodos suficientemente longos até serem removidos. Essa propriedade auxilia a prolongar a liberação do fármaco no local de aplicação, apresentando vantagens em termos de facilidade de aplicação e capacidade de liberação tópica de uma ampla variedade de fármacos (IDSON; LAZARUS, 2001).

Embora alguns medicamentos sejam destinados principalmente à ação na superfície da pele, a área-alvo para a maioria dos distúrbios dermatológicos corresponde à epiderme viável e/ou derme superior. Assim a penetração difusiva de um fármaco na pele representa um importante aspecto da terapia medicamentosa (WELIN-BERGER; NEELISSEN; BERGENSTAHL, 2001).

A caracterização física das formas farmacêuticas semi-sólidas compreende a avaliação da aparência, da reologia, do pH, da homogeneidade e da distribuição e tamanho das partículas (MOLLICA; AHUJA; COHEN, 1978). A caracterização química envolve a determinação do teor do fármaco e a estabilidade química da substância ativa propriamente dita e/ou em relação aos excipientes da formulação (BUCHMANN, 2001).

Mais recentemente, a avaliação de liberação do ativo *in vitro* (UNITADE STATES, 1997) e o conhecimento do comportamento biofarmacêutico do medicamento através de técnicas de quantificação do fármaco na pele ou em suas camadas, como o *tape-stripping* (PERSHING; CORLETT; JORGENSEN, 1994; PERSHING, 2000), têm-se mostrado válidos para a otimização e/ou desenvolvimento de formulações.

No presente trabalho, as formulações comerciais, a manipulada e as desenvolvidas contendo o antifúngico CTZ na concentração de 20 mg/g, foram estudadas quanto às características físicas: aparência, avaliação do pH e da viscosidade; quanto às características químicas: teor do fármaco e quanto ao comportamento biofarmacêutico citado acima.

Neste capítulo, serão descritas as formulações em estudo, produto referência nacional (A); produto genérico (B); produto manipulado (C) e produtos desenvolvidos (D2:0, E1:1 e F0:2) e suas características físicas e químicas.

III.2. Metodologia

III.2.1. Material

Todos os solventes empregados foram de grau analítico ou grau CLAE e as matérias-primas de grau farmacêutico.

III.2.1.1 Matéria-prima e substância de referência

Padrão farmacopéico USP (lote 35650G3) para estabelecer um padrão de trabalho de cetoconazol (lote KET-M1071/Purifarma).

III.2.1.2 Excipientes

1. Butilhidroxitolueno (Procedência: Henrifarma, lote: 140801);
2. Estearato de Octila (Procedência: Pharmaspecial, lote: 0703007014-R);
3. Glicerina Bidestilada (Procedência: Chemspecs, lote: 138715);
4. Imidazolinidiluréia (Procedência: Spectrum, lote: 04200085899).
5. Mistura Álcool Cetoestearílico/Alquil Sulfato de Sódio (Procedência: Cognis Brasil, lote: 013/1357308/015);
6. Mistura Lauril Glicosídio/Poligliceril 2-Dipolihidroxiestearato/Glicerina (Procedência: Chemspecs, lote: CMP032/0080/093);
7. Mistura Metiletilpropilparabeno/Fenoxietanol (Procedência: Viafarma, lote: N258530);
8. Propilenoglicol (Procedência: DEG, lote: 101301);
9. Vaselina Líquida (Procedência: Farmos, lote: 2103C/035065

III.2.1.3. Formulações comerciais - descrição qualitativa dos componentes

A. Produto referência nacional: propilenoglicol, álcool estearílico, álcool cetílico, monoestearato de sorbitano, polissorbatos, miristato de isopropila, sulfito de sódio e água purificada.

B. Produto genérico: álcool estearílico, álcool cetílico, monoestearato de sorbitano, polissorbato 60, miristato de isopropila, sulfito de sódio, propilenoglicol e água purificada.

C. Produto manipulado: estearato de octila (10,0 g), vaselina líquida (5,0 g), metilparabeno (0,1 g), propilparabeno (0,1 g), vaselina sólida (2,0 g), metabissulfito de sódio (0,2 g), mistura álcool cetoestearílico/alquilsulfato de sódio (10,0 g) e água destilada (67,8 mL).

Todos contêm 20 mg/g de CTZ.

III.2.1.4 Equipamentos e acessórios

1. Agitador (marca Fisatom, modelo 713D);
2. Balança analítica (marca Mettler Toledo, modelo AG204);
3. Balões volumétricos de 10, 25, 50, 100 e 500 mL (marca Quimex);
4. Bécher de 50, 100, 250 e 500 mL (marca Quimex);
5. Caneco de aço inox de 250 mL (marca Brinox-Brasil Inox 18-10);
6. Gral e pistilo de porcelana de 250g (marca Chiarotti);
7. Membrana filtrante 0,45μm (marca Millipore);
8. Placa de aquecimento (marca Corning);
9. Pipetas automáticas de 20, 200, 1000, 5000 μL (marca Gilson);
10. Potenciômetro (marca Digimed, modelo DM21);
11. Provetas de 50, 100, 250, 500 e 1000 mL (marca Quimex)

12. *Shaker* (marca Endolab);
13. Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) isocrático (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com coluna C18 e pré-coluna (C18), um loop de 20 μL, um detector ultravioleta e integrador eletrônico;
14. Ultrasson (marca Thornton);
15. Viscosímetro Brookfield Digital (modelo DV-II) e acessório Helipath mod D.

III.2.1.5. Formulações desenvolvidas – método de preparo

Duas formulações foram obtidas através do clássico processo de preparo de emulsões (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995), com base na formulação original do produto C. O desenvolvimento destas preparações teve como o objetivo verificar se diferentes modos de incorporação do CTZ poderiam interferir na liberação e/ou presença do fármaco no EC:

1) D2:0 – o CTZ foi adicionado à fase interna (fase oleosa) do creme conforme apresentado na Tabela III.1.

2) E1:1 – 1% de CTZ foi adicionado à fase interna do creme e 1% incorporado no creme pronto conforme apresentado na Tabela III.2.

Tabela III.1 – Componentes e técnica de preparação do creme D2:0 contendo 2% CTZ na fase oleosa (interna)

Componentes	**Quantidade (g)**
1. Estearato de Octila	15,0
2. Vaselina Líquida	5,0
3. Mistura Lauril Glicosídio/Poligliceril 2-Dipolihidroxiestearato/ Glicerina	2,0
4. Glicerina Bidestilada	10,0
5. Mistura Metiletilpropilparabeno/Fenoxietanol	0,5
6. Mistura Álcool Cetoestearílico/Alquil Sulfato de Sódio	10,0
7. Cetoconazol	2,0
8. Butilhidroxitolueno	0,2
9. Água Destilada	qsp 100

Técnica de preparação:

1. Em um recipiente de aço inox de 250 mL de capacidade foram adicionados os componentes 1-8 (fase oleosa – A).
2. Em um bécher de 100mL, foi colocado 55,3 mL de água destilada (fase aquosa – B).
3. A e B foram aquecidos em placa de aquecimento até atingirem a temperatura de 75°C (fase oleosa) e 80°C (fase aquosa), respectivamente.
4. B foi adicionada em A sob agitação até temperatura ambiente.
5. O creme foi envasado em embalagem opaca.

Tabela III.2 – Componentes e técnica de preparação do creme E1:1 contendo 1% de CTZ na fase oleosa e 1% no creme pronto.

Componentes	**Quantidade (g)**
1. Estearato de Octila	15,0
2. Vaselina Líquida	5,0
3. Mistura Lauril Glicosídio/Poligliceril 2-Dipolihidroxiestearato/ Glicerina	2,0
4. Glicerina Bidestilada	10,0
5. Mistura Metiletilpropilparabeno/Fenoxietanol	0,5
6. Mistura Álcool Cetoestearílico/Alquil Sulfato de Sódio	10,0
7. Cetoconazol	1,0 + 1,0
8. Butilhidroxitolueno	0,1 + 0,1
9. Água Destilada	qsp 100

Técnica de preparação

1. Em um recipiente de aço inox de 250 mL de capacidade foram adicionados os componentes 1-8 (fase oleosa – A).
2. Em um bécher de 100mL, foi colocado 55,3 mL de água destilada (fase aquosa – B).
3. A e B foram aquecidos em placa de aquecimento até atingirem a temperatura de 75°C (fase oleosa) e 80°C (fase aquosa), respectivamente.
4. B foi adicionada em A sob agitação até temperatura ambiente.
5. Em um gral de porcelana, foi colocado 0,1 g de butilhidroxitolueno e 1,0 g de CTZ, que foram homogeneizados e o creme preparado foi adicionado através de mistura geométrica até completar 100g.
6. O creme foi envasado em embalagem opaca.

O desenvolvimento da terceira formulação (F0:2) foi fundamento em duas questões:

1. Os produtos A e B possuem em sua composição propilenoglicol (promotor químico). Este componente tem a propriedade de permear dentro da pele e alterar suas características de permeabilidade, promovendo um aumento na velocidade de absorção de diversas moléculas (HADGRAFT, 2001). Baseado neste fato, a presença deste excipiente torna-se importante no desenvolvimento de uma nova formulação.
2. O produto C desenvolveu coloração rósea a partir do trigésimo dia de preparo. Este contém em sua formulação os conservantes metilparabeno e propilparabeno freqüentemente empregados em emulsões dermatológicas. De acordo com PERARO (2001), o CTZ apresenta reações de incompatibilidade com os parabenos, a qual é evidenciada pela coloração rósea. Os autores propõem o emprego de imidazolidiniluréia como conservante e, após estudos de estabilidade demonstraram que não houve alteração da formulação por um período superior a 90 dias. Este intervalo de tempo é de considerável importância para fórmulas manipuladas.

Portanto, F0:2 foi desenvolvida, visando aumento da biodisponibilidade do fármaco e estabilidade da preparação. O produto foi preparado com base na formulação original do produto C, no qual o CTZ era incorporado em um creme base aniônico. Neste foi adicionado um agente promotor (propilenoglicol) com o objetivo de aumentar a penetração do CTZ e a imidazolinidiluréia (conservante) com o objetivo de aumentar a estabilidade da formulação. O modo de incorporação do fármaco foi mantido o mesmo da preparação original (tabela III.3).

Tabela III.3 – Componentes e técnica de preparação do creme F(0:2) contendo 2% de CTZ incorporado no creme base aniônico

Componentes	**Quantidade (g)**
1. Estearato de Octila	15,0
2. Vaselina Líquida	5,0
3. Mistura Lauril Glicosídio/Poligliceril 2-Dipolihidroxiestearato/ Glicerina	2,0
4. Propilenoglicol	20,0
5. Imidazolinidiluréia	0,5
6. Mistura Álcool Cetoestearílico/Alquil Sulfato de Sódio	10,0
7. Água Destilada	qsp 100
8. Cetoconazol	2,0
9. Butilhidroxitolueno	0,2

Técnica de preparação

1. Em um recipiente de aço inox de 250 mL de capacidade foram adicionados os componentes 1-6 (fase oleosa – A).
2. Em um bécher de 100mL, foi colocado 47,5 mL de água destilada (fase aquosa – B).
3. A e B foram aquecidos em placa de aquecimento até atingirem a temperatura de 75°C (fase oleosa) e 80°C (fase aquosa), respectivamente.
4. B foi adicionada em A sob agitação até temperatura ambiente.
5. Em um gral de porcelana, foi colocado 0,2 g de butilhidroxitolueno e 2,0 g de CTZ, que foram homogeneizados e o creme base foi adicionado através de mistura geométrica até completar 100g.
6. O creme foi envasado em embalagem opaca.

III.2.2. Características físicas e químicas das formulações

Aparência

A avaliação e a descrição da aparência constitui uma caracterização fácil e prática. Foi realizada macroscopicamente, descrevendo cor, aspecto físico e estado da matéria (BUCHMANN, 2001).

Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado por método potenciométrico à temperatura ambiente, empregando o potenciômetro com eletrodo de vidro de dupla ponte salina para sistemas semi-sólidos, sem diluição do produto (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995; LE HIR, 1997).

Determinação da viscosidade

As análises foram realizadas em viscosímetro digital Brookfield, utilizando-se 100g da amostra à temperatura de 23 ± 0,5°C, após 48 horas do preparo da formulação.

As amostras foram avaliadas com os *spindles* E e F nas velocidade de 0,3; 0,6; 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 30,0 e 60,0 rpm. A cada mudança de velocidade foram aguardados 2 minutos para estabilização e as leituras de viscosidade foram feitas durante os 5 minutos seguintes.

Determinação do teor

Condições analíticas

Para a análise do CTZ, foi empregado um sistema CLAE isocrático A fase móvel empregada foi acetonitrila: K_2HPO_4 0,01 M 50:50 (vol/vol) (pH 6,8) e fluxo de 0,7 mL/min e a detecção foi realizada em 242 nm, de acordo com as condições estabelecidas em IV.2.3. do capítulo IV.

Preparo do padrão e da amostra

Padrão

Em um bécher de 50 mL, foi pesado 20 mg do padrão, levado ao ultrasson por 6 minutos com 15 mL de tetrahidrofurano. Foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL com metanol. Foi colocado no *shaker* por 30 minutos, o volume foi completado com metanol. Desta foi retirado uma alíquota de 2,0 mL e transferido para balão volumétrico de 25 mL completando o volume com a fase móvel. A solução foi filtrada por membrana 0,45 μm, e analisada por CLAE.

Amostra

Em um bécher de 50 mL, foi pesado 1,0 g da amostra, levada ao ultrasson por 6 minutos com 15 mL de tetrahidrofurano. Foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL com metanol. Foi colocado no shaker por 30 minutos, o volume foi completado com metanol. Desta foi retirada uma alíquota de 2,0 mL e transferida para balão volumétrico de 25 mL completando o volume com a fase móvel. A solução foi filtrada por membrana filtrante, e analisada por CLAE.

III.3. Resultados e Discussão

III.3.1. Características físicas e químicas das formulações

Aparência

A aparência foi avaliada macroscopicamente a partir do dia de preparo e coloração levemente rósea foi evidenciada no 30º dia para as formulações C, D2:0 e E1:1, sendo que os produtos foram mantidos à temperatura de 25°C durante toda a avaliação. A formulação F0:2 não desenvolveu a coloração rósea e as formulações comerciais apresentaram-se inalteradas (tabela III.4).

Tabela III.4. – Caracterização das formulações estudadas.

Formulação	Aspecto Físico	pH	Teor (%)
A	creme branco	6,85	100,9
B	creme branco	7,64	107,6
C	creme branco*	5,68	97,9
D(2:0)	creme branco*	5,68	105,6
E(1:1)	creme branco*	5,68	95,0
F(0:2)	creme branco	5,68	105,0

*Aparecimento de coloração rósea a partir do 30° dia (Temperatura de 25°C).

Determinação do pH

O pH do veículo tanto quanto o pH da pele são importantes para a difusão de fármacos, porque as propriedades ácidas e básicas das substâncias ativas influenciam a solubilidade e partição nas diferentes camadas da pele e por conseguinte, a penetração dos fármacos (WAGNER et al., 2003).

O papel da variação dos valores de pH nos veículos foi avaliada por SZNITOWSKA, JANICKI e BACZEK (2001) empregando dois fármacos lipofílicos (hidrocortisona e

testosterona), os autores concluíram que nenhum efeito sobre a penetração foi observado dentro da faixa de pH de 1,0-11,0.

De acordo WILHELM, CUA e MAIBACH (1991), o pH da superfície da pele apresenta uma variação compreendida entre 4,0 e 7,0. WAGNER et al. (2003) avaliaram o perfil do pH *in vivo* e *in vitro* através do EC e em camadas mais profundas (epiderme viável + derme), os valores observados compreendem a faixa de 4,5 a 6,8 aproximadamente.

Na tabela III.4 estão listados os resultados obtidos e pode-se observar que as formulações C, D2:0, E1:1 e F0:2 apresentaram valores iguais de pH. O valor de pH para a formulação B estava dentro da faixa preconizada pelo fabricante (7,5 a 8,5). O valor encontrado para o produto A (referência nacional) poderia ser considerado referência, uma vez que não existem valores tabelados em compêndios oficiais e de acordo, com as considerações citadas acima, os valores de pH encontrados nas formulações estudadas não poderiam influenciar na velocidade de liberação e ou penetração do CTZ no EC.

Determinação da viscosidade

As formulações apresentam viscosidades diferentes, por isso foram avaliadas por *spindles* diferentes. O *spindle* F é empregado para avaliar formulações com viscosidade em faixas mais altas e o E para mais baixas, de acordo com as características do viscosímetro e dos *spindles* utilizados.

As tabelas III.5 e III.6 apresentam a faixa de viscosidade obtida em uma velocidade comum (0,3 – 0,6 rpm) para as formulações A, B, C e F(0:2) com *spindle* F e em outra de 3,0 a 6,0 rpm com *spindle* E comum às formulações D(2:0) e E(1:1), respectivamente.

Tabela III.5. Valores de viscosidade das formulações obtidos numa faixa comum de velocidade.

Formulação	Velocidade (rpm)	Faixa de Viscosidade (x 10^3cps) (mín. - máx.)
A*	0,3	625 – 858
	0,6	501 – 568
B*	0,3	1390 –1550
	0,6	1000 –1270
C*	0,3	518 – 668
	0,6	419 – 508
F0:2 *	0,3	484 – 651
	0,6	374 – 399

*Leituras realizadas com spindle F (7.800 – 3.120.000 cps).

Tabela III.6. Valores de viscosidade das formulações obtidos numa faixa comum de velocidade.

Formulação	Velocidade (rpm)	Faixa de Viscosidade (x 10^3cps) (mín. - máx.)
D2:0 *	3,0	34,1– 41,1
	6,0	21,4 – 23,7
E1:1 *	3,0	16,1 – 18,2
	6,0	10,2 – 11,5

*Leituras realizadas com sinpdle E (3.900 – 1.560.000 cps).

As figuras III.1 e III.2 ilustram os resultados obtidos para a faixa de viscosidade durante a avaliação das formulações A, B, C e F0:2 e das D2:0 e E1:1, respectivamente.

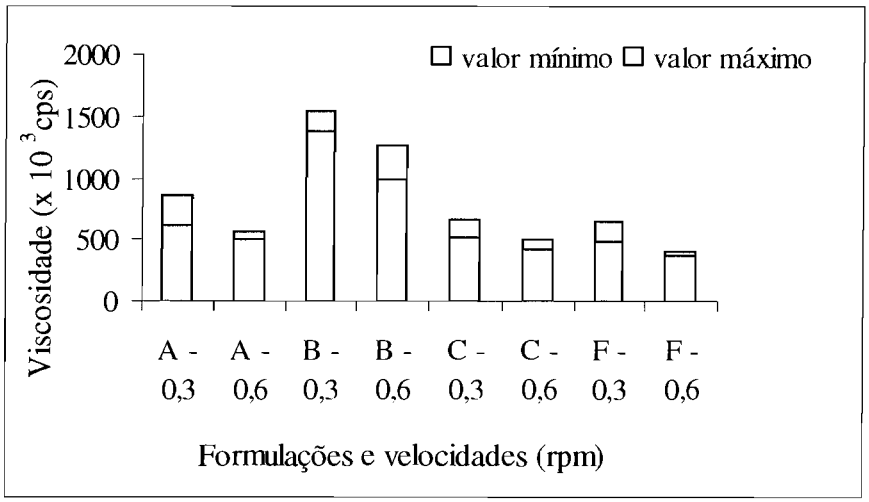


Figura III.1. Faixa de viscosidade para as formulações A, B, C e F0:2 nas velocidades de 0,3 e 0,6 cps.

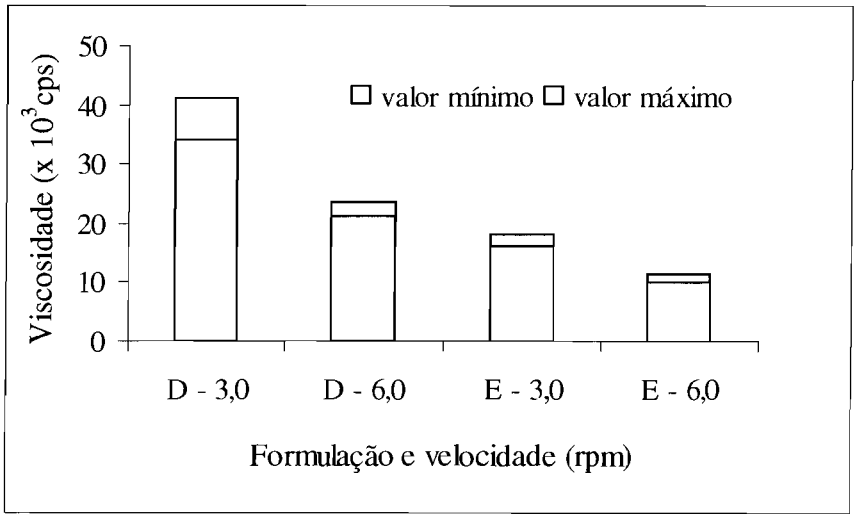


Figura III.2. Faixa de viscosidade para as formulações D2:0 e E1:1 nas velocidades de 3,0 e 6,0 cps.

A viscosidade de uma emulsão pode ser alterada por modificação da composição da fase lipídica, por variação na relação entre a fase aquosa e oleosa, na proporção dos tensoativos e por adição de espessantes (RIEGER, 2001).

Sendo assim, a diferença de viscosidade encontrada entre as formulações C e F0:2 poderá estar relacionada pela diferença de material graxo presente em sua composição (ítem III.2.1.3 e III.2.1.5 neste capítulo).

Muitas preparações farmacêuticas, loções ou cremes, são sistemas semi-sólidos complexos ou encorpados que contêm excesso de emulsificante, além do requerido, para formar uma camada estabilizante na interface óleo-água. O excesso de tensoativo pode interagir com outros componentes, ou seja, na interface da gotícula ou na fase contínua, para produzir sistemas complexos semi-sólidos polifásicos (FLORENCE; ATTWOOD, 2003; INTERNATIONAL FEDERATION OF SOCIETIES OF CONSMETIC CHEMISTS, 1997).

Cremes estáveis O/A preparados com ceras emulsificantes iônicas ou não-iônicas são compostos de pelo menos quatro fases como mostra a figura III.3: fase oleosa dispersa, fase gel cristalina, fase hidratada cristalina, fase aquosa externa que contém uma solução diluída de tensoativo. Conseqüentemente, o conceito clássico de emulsões como sistemas bifásicos com uma camada monomolecular de um emulgente na interface têm sido revisto (RIEGER, 2001).

É crítica a interação do tensoativo e dos componentes de álcoois graxos componentes de misturas emulsificantes para formar estas estruturas. É também, dependente do tempo, o que lhes confere a designação de "auto-emulsionáveis". A estabilidade total de um creme depende da estabilidade da fase gel cristalina (FLORENCE; ATTWOOD, 2003; INTERNATIONAL FEDERATION OF SOCIETIES OF CONSMETIC CHEMISTS, 1997).

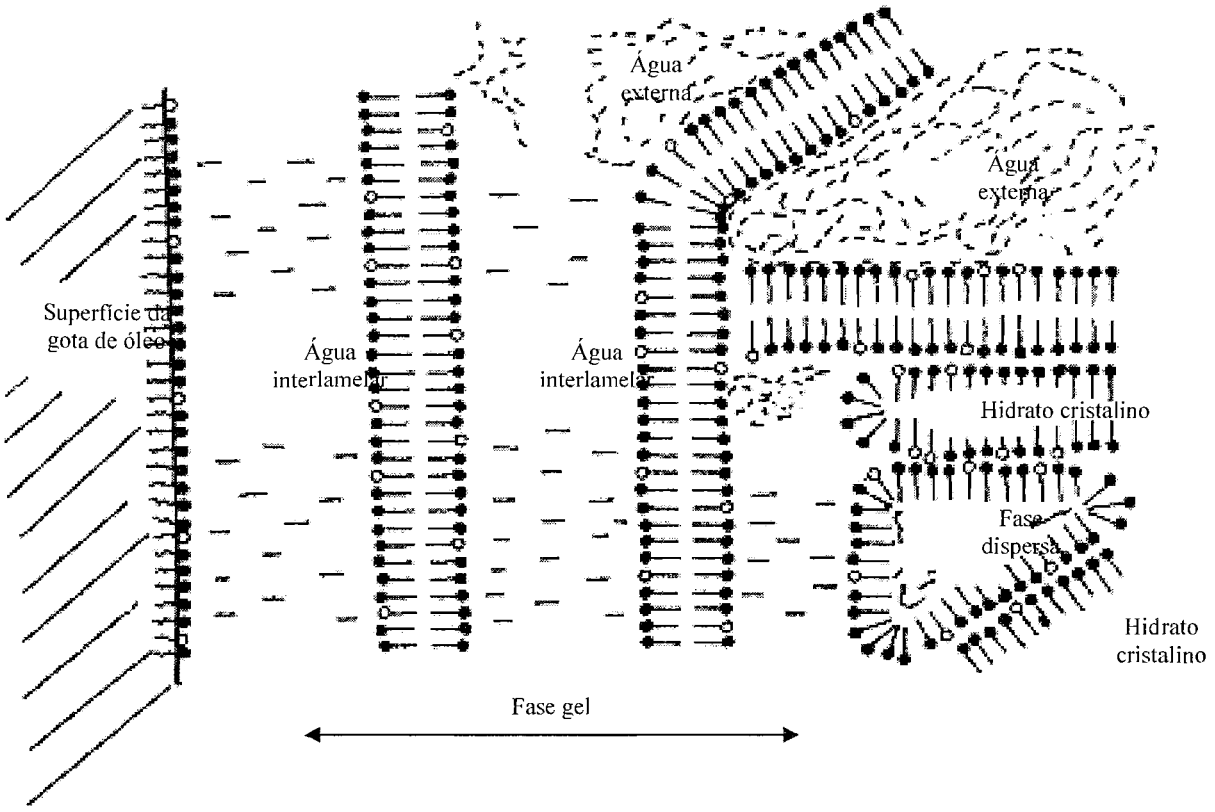


Figura III.3 – Representação esquemática de um creme semi-sólido preparado com álcool cetoestearílico e tensoativo iônico, adaptado de IFSCC MONOGRAPH, 1997 e FLORENCE; ATTWOOD, 2003.

A estabilidade de emulsão é aumentada pela presença de fases de cristais líquidos, devido à formação de multicamadas na interface óleo/água. Desta maneira, essas multicamadas protegem contra a coalescência pela redução das forças de Van der Walls e por retardamento do adelgamento da película entre gotículas adjacentes: a viscosidade da fase líquida cristalina é pelo menos 100 vezes a da fase contínua na ausência destas estruturas (IFSCC MONOGRAPH, 1997; RIEGER, 2001; FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Atipicamente, as formulações D2:0 e E1:1 contém glicerina, um componente hidrofílico, na fase interna (oleosa) da emulsão com a finalidade de auxiliar a solubilização do CTZ. Nesta fase, também está presente o tensoativo iônico responsável pela formação da fase gel cristalina com água interlamelar. Por conseguinte, a glicerina poderá estar interferindo na estabilidade das camadas de cristais líquidos, reduzindo a viscosidade da emulsão.

DAVIS e KHANDERIA (1972) indicaram que a atividade termodinâmica e a viscosidade têm um efeito dominante sobre a liberação da substância ativa do veículo. Sendo assim, a viscosidade poderia interferir no comportamento biofarmacêutico das formulações.

Determinação do teor

De acordo, com os resultados listados na tabela III.4, as formulações apresentaram o valor de teor dentro da faixa especificada pelo fabricante do produto B (90-110%). Esta faixa foi considerada uma vez que não existem valores indicados em compêndios oficiais.

III.4. Conclusão:

- As formulações C, D2:0 e E1:1 apresentaram coloração levemente rósea a partir do 30º dia de preparo. A F0:2 não desenvolveu este aspecto, pois apresenta em sua composição imidazolinidiluréia, conservante compatível com CTZ. Os produtos comerciais apresentaram-se inalterados.
- As formulações C, D2:0, E1:1 e F0:2 apresentaram valores iguais de pH. O produto B apresentou valor dentro da faixa preconizada pelo fabricante (7,5 a 8,5). O valor encontrado para o produto A (referência nacional) poderia ser considerado referência, uma vez que não existe valor em compêndios oficiais para formulações semi-sólidas contendo 20 mg/g de CTZ.
- As formulações D0:2 e E1:1 apresentaram menor faixa de viscosidade, provavelmente devido à adição da glicerina na fase interna (fase oleosa) do creme.
- As formulações comerciais, manipulada e desenvolvida apresentaram teor de CTZ inserido na faixa 95-110% do declarado.

III.5. Referências Bibliográficas*

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V.J.R. *Farmacotécnica*: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p.397-400.

BUCHMANN, S. Main cosmetics vehicles. In: BAREL, A.O.; PAVE, M.; MAIBACH, H.I., eds. *Handbook of cosmetic science and technology*. New York: Marcel Dekker, 2001. p.147-150.

DAVIS, S.S.; KHANDERIA, M.S. Viscoelastic properties of pharmaceutical semi-solids: characterization of the plastibases for bioavailability studies. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.24, p.176-180, 1972.

DEF: dicionário de especialidades farmacêuticas 2002/2003. 31.ed. Rio de Janeiro: Publicações Médicas, 2003. p.95.

FLORENCE, A.T., ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia*. São Paulo: EDUSP, 2003. p.375.

GUPTA, P.; GARG, S. Avanços recentes nas formas de dosagem semi-sólidas para aplicação dermatológica. *Pharm. Technol., Ed. Bras.*, São Paulo, v.6, n.3, p.4-20, 2002.

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

IDSON, B.; LAZARUS, J. Semi-sólidos. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. cap.18, p.907-953.

INTERNATIONAL FEDERATION OF SOCIETIES OF CONSMETIC CHEMISTS. *Introduction to cosmetic emulsions and emulsification*. Weymouth: Micelle Press, 1997. p.33. (IFSCC Monograph, n.4).

LE HIR, A. *Noções de farmácia galênica*. 6.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1997. p.176-185.

MOLLICA, J.A., AHUJA, S., COHEN, J. Stability of pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.67, n.4, p.443-465, 1978.

PERARO, A.C. *Estabilidade física e metodologia analítica para formulações farmacêuticas contendo cetoconazol*. São Paulo, 2001. 116p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

PERSHING, L.K. Dermatopharmacokinetics for assessing bioequivalence of topically applied products in human skin. *Cosmet. Toiletries*, Carol Stream, v.115, n.5, p.43-51, 2001.

PERSHING, L.K.; CORLETT, J.; JORGENSEN, C. *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.38, p.90-95, 1994.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. *Tecnologia farmacêutica.* 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v.1, p.597-662.

RIEGER, M.M. Emulsões. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANING, J.L. *Teoria e prática na indústria farmacêutica.* Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. p.855-906.

SZNITOWSKA, M.; JANICKI, S.; BACZECK, A. Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.76, p.327-335, 2001.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. *Guidance for industry*: nonsterile semisolid dosage forms: scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation. Rockville, 1997. Disponível em: http://www.fda.gov/cder/guidance/1447fnl.pdf. Acesso em: 10 jun. 2000.

WAGNER, H.; KOSTKA, K.-H.; LEHR, C.-M.; SCHAEFER, U.F. pH profiles in human skin: influence of two *in vitro* test systems for drug delivery testing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Amsterdam, v.55, n.1, p.57-65, 2003.

WELIN-BERGER, K.; NEELISSEN, J.A.M.; BERGENSTAHL, B. The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.13, p.309-318, 2001.

WILHELM, K.-P.; CUA, A.B.; MAIBACH, H.I. Skin ageing: effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH and casual sebum content. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.127, p.1806-1809, 1991.

*Referências de acordo com a norma NBR 6023/39 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Capítulo IV - Penetração cutânea *in vivo* de cetoconazol das formulações semi-sólidas, empregando a metodologia *tape tripping*

IV.I. Introdução

A eficácia da via tópica cutânea requer adequada captação do fármaco pela pele, para que o agente ativo possa exercer sua ação farmacológica local. Essa resposta terapêutica dependerá da penetração da substância ativa nas camadas da pele, dos processos de liberação do fármaco da forma farmacêutica que o contém, da velocidade de eliminação do fármaco da pele e do desencadeamento do efeito desejado propriamente dito (PERSHING; CORLETT; JORGENSEN, 1994).

O estrato córneo é o local onde ocorre a maioria das infecções por dermatófitos. Logo, a determinação do fármaco nesse local proporcionaria medida direta da concentração da substância ativa em seu sítio de ação. A determinação do perfil de *concentração do fármaco no estrato córneo em função do tempo* decorrente da aplicação poderia demonstrar a biodisponibilidade/bioequivalência (BD/BE) de produtos de uso tópico. Alguns autores vêm adotando a nomenclatura *dermatofarmacocinética* (DFC) ou *biodisponibilidade de formulações tópicas* para o estudo da resposta terapêutica (SHAH, 1995, SHAH et al., 1998, PERSHING, 2001).

Os métodos para os estudos de DFC devem ser eficientes de modo a remover o estrato córneo juntamente com o fármaco; ter reprodutibilidade quanto à coleta; documentar o número de retiradas das camadas suficiente para representar e discriminar a captação do fármaco dentro da pele; ser sensível a um método analítico para quantificar o fármaco contido nas amostras de estrato córneo retirado. (PERSHING, 2001).

Esta metodologia está sendo denominada de *tape stripping*, podendo-se empregar uma terminologia em língua portuguesa de "remoção do estrato córneo" por fita adesiva.

A "remoção do estrato córneo" por fita adesiva é uma técnica rápida e relativamente não invasiva, sendo empregada neste trabalho com o objetivo de medir a velocidade e extensão da penetração cutânea das formulações antimicóticas comerciais (A e B), manipulada (C) e desenvolvidas (D2:0, E1:1 e F0:2) descritas no capítulo III.

Neste capítulo, também, será desenvolvida uma adequada metodologia analítica para quantificar CTZ nos sistemas em estudo.

IV.2. Metodologia

A avaliação da penetração do CTZ de formulações antimicóticas em voluntários sadios, empregando a metodologia conhecida como *tape stripping* ou "remoção do estrato córneo" por fita adesiva foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP n°. 035/02) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro – CEP (HUCFF/UFRJ) em 07 de outubro de 2002 (Anexo).

IV.2.1. Materiais e Reagentes

Todos os solventes empregados foram de grau analítico ou grau CLAE.

IV.2.2. Equipamentos e Acessórios

1. Agitador magnético (marca Marte, modelo MAG-15) acoplado a um sistema artesanal de aquecimento;
2. Balança analítica (marca Mettler Toledo, modelo AG204);
3. Balões volumétricos de 10, 25, 50, 100 e 1000 mL (marca Quimex);
4. Bécher de 50, 100, 250 e 500 mL (marca Quimex);
5. Espectrofotômetro UV-VIS (marca Shimadzu, modelo 1601);
6. Fita adesiva hipoalergênica (Transpore^{MR}, marca 3M do Brasil);
7. Microbalança (AD-4 autobalance, Perkin Elmer)
8. Pipetas automáticas 20, 200, 1000 e 5000 μL (marca Gibson);
9. Placa de aquecimento (marca Corning);
10. Potenciômetro (marca Digimed, modelo DM21)

11. Provetas de 50, 100, 250, 500 e 1000 mL (marca Quimex)
12. Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) isocrático (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com coluna C18 e pré-coluna (C18), um loop de 20 μL, um detector ultravioleta e integrador eletrônico.

IV.2.3. Estabelecimento das condições analíticas do cetoconazol por CLAE

O CTZ é, quimicamente, cis-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina, com peso molecular de 531,4 e ponto de fusão de 148 a 152°C. Possui pKa de 3,0 e 6,5 e log P = 3,8 (n-octanol:tampão pH 10) (BRION, 1999).

A solubilidade do CTZ foi determinada em diversos solventes: água, etanol, clorofórmio, metanol, éter etílico, tetrahidrofurano, acetonitrila e isopropanol. Adicionou-se a um tubo de ensaio, uma parte do fármaco em massa (50 mg), e sucessivas partes de solvente em volume (50 μL).

A quantidade de CTZ foi identificada e determinada cromatograficamente por um sistema CLAE isocrático equipado com coluna C18, pré-coluna (C18), loop de 50 μL, detector ultravioleta e integrador eletrônico. A fase móvel: acetonitrila:K_2HPO_4 0,01 M foi testada em três condições: 65:35 (vol/vol) (pH 6,0), 60:40 (vol/vol) (pH 6,8) e 50:50 (vol/vol) (pH 6,8) (PERSHING; CORLETT; JORGENSEN, 1994). O comprimento de onda de detecção foi fixado em 242 nm, correspondente ao λ_{max} encontrado por espectrofotometria de varredura na região do UV, da solução de cetoconazol a 25 μg/mL preparada nas três fases móveis testadas. O fluxo foi fixado em 0,7 mL/min.

IV.2. 4. Validação da metodologia analítica

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003a), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Normalmente, os parâmetros analíticos encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (RIBANI et al., 2003).

A *seletividade* ou *especificidade* de um método instrumental de separação é a sua capacidade de diferenciar e quantificar a substância de interesse na presença de outros componentes na amostra (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; BRASIL, 2003a). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Esta foi avaliada comparando uma matriz isenta da substância de interesse (branco) e uma matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, ficando separada dos demais compostos presentes na amostra.

A *linearidade* de um procedimento corresponde a sua capacidade em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; BRASIL, 2003a). A linearidade da curva padrão foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (r^2).

O intervalo da curva padrão deriva do estudo de linearidade do método e depende do objetivo de sua aplicação (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; BRASIL, 2003a). A faixa de variação corresponde ao intervalo entre a concentração superior e inferior da substância analisada que atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade (RIBANI et al., 2003). O intervalo de concentração (0,10 - 10 μg/mL) foi obtido

avaliando-se esses parâmetros para os valores utilizados para a construção da curva padrão obtida em cada experimento com padrão de trabalho de CTZ (lote KET-M1071/Purifarma), cuja pureza foi estabelecida contra padrão farmacopéico USP (lote 35650G3).

A *precisão* representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; BRASIL, 2003a). A precisão é uma medida, normalmente expressa quantitativamente em termos de imprecisão e computada como desvio padrão (s), desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV). É considerada em três níveis: repetitividade (precisão intra-dia), precisão intermediária (precisão inter-dia) e reprodutibilidade (RIBANI et al., 2003a). A precisão foi avaliada pelo desvio padrão (s) e desvio padrão relativo (DPR) e repetitividade.

A *exatidão* representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; BRASIL, 2003a). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição de padrão (RIBANI et al., 2003a). A exatidão do método foi avaliada pelo ensaio de recuperação da quantidade de CTZ extraída, adicionada a um branco da matriz em análise (fita adesiva).

O *limite de detecção* (LD) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; BRASIL, 2003a). O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2003a). O limite de detecção foi calculado pelo método baseado em parâmetros da curva analítica, expresso como:

LD = 3,3 x s/S, onde:

s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação; **S** é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica.

Os parâmetros da curva e a estimativa do desvio padrão destes parâmetros foram calculados empregando-se Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corporation, 1999).

O *limite de quantificação* (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; BRASIL, 2003a).

Como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas e a curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LQ.

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, a partir da equação:

LQ = 10 x s/S

A linearidade, limite de detecção e limite de quantificação foram avaliados a partir das curvas padrão preparadas em cada dia de análise e referentes ao grupo de formulações analisadas (primeiro grupo A, B e C; segundo grupo D2:0, E1:1 e F0:2).

IV.2.5. Seleção e avaliação clínica dos voluntários

Foram selecionados oito voluntários sadios sem histórico de doença de pele e antebraço sem lesões cutâneas que pudessem interferir com os resultados do estudo; do sexo feminino; com idade de 23 a 55 anos, brancos ou pardos e capazes de fornecer seu consentimento livre e esclarecido.

Os voluntários foram recrutados entre a comunidade acadêmica (alunos, funcionários e docentes) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

(CCS/UFRJ); tomaram ciência do experimento, preencheram o Formulário de Cadastro e Voluntários e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo).

O investigador clínico, Profa. Dra. Lúcia Maria Azevedo CRM-5236934-1, Departamento de Dermatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ), examinou a região do antebraço de cada voluntário e questinou-os sobre possíveis doenças de pele como: vitiligo, psoríase, dermatite atópica, sensibilidade a corticóides e antifúngicos. Ao final deste exame dermatológico, todos os voluntários foram considerados aptos para participar do estudo.

Em caso de eventos adversos decorrentes da realização do experimento, o pesquisador clínico ficou disponível para atender os voluntários, conforme consta no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

IV.2.6. Procedimento de Aplicação do Produto

O procedimento de aplicação da formulação e a retirada do EC foram realizados em uma sala com temperatura entre 20 e 22°C, e umidade relativa na faixa de 50-60%. Uma hora antes do experimento, os antebraços do voluntário foram lavados com água corrente e sabonete neutro. Pelo menos 30 minutos antes do início do teste, o voluntário permaneceu na sala para adequar à sua climatização. Cinco ou seis áreas de 2,5 cm^2 foram demarcadas em cada antebraço, para estudo da mesma formulação no período. Cerca de 15 mg da formulação foram aplicados nas áreas demarcadas, com auxílio de um cotonete em quatro áreas de modo uniforme quanto à distribuição e quantidade. As áreas demarcadas correspondem a períodos de tempo pré-determinados de 15, 60, 120 e 240 minutos para a remoção do EC (SHAH et al., 1998) (Figura IV.1.).

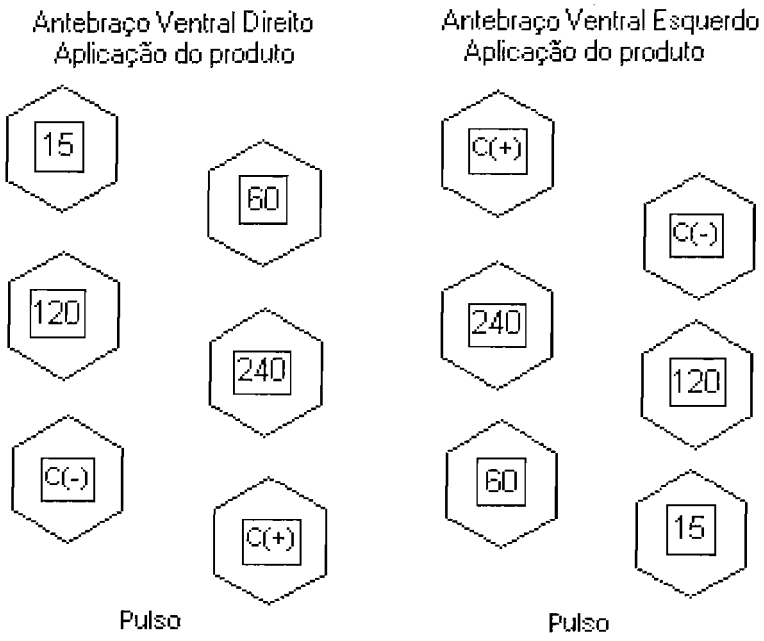


Figura IV.1. – Esquema de demarcação das áreas nos antebraços dos voluntários: na área central do hexágono era aplicada a formulação; o quadrado de 1,56 cm^2 correspondia à área de remoção do EC.

Após cada tempo, o excesso da formulação era removido da área específica limpando-a três vezes com algodão levemente umedecido e deixando secar por 1-3 minutos. A seguir, o EC foi seqüencialmente retirado 11 vezes com a fita adesiva (1,56 cm^2), a qual foi pressionada à pele por um bastão de vidro rolando regularmente seis vezes, a seguir, a fita foi retirada rapidamente (WEIGMANN et al., 1999-a). A primeira fita foi descartada com o objetivo de evitar uma quantidade superestimada de CTZ. Como controle negativo, uma área não tratada também foi demarcada e o EC retirado, e um controle positivo foi realizado pela adição 0,5 μg de CTZ (10 μL de uma solução 50 μg/mL) em cada fita após retirada do EC, perfazendo 5 μg de CTZ num total de 10 coletas do EC). As 10 fitas subseqüentes foram analisadas em conjunto com o objetivo de quantificar a massa total de CTZ, por área, em um determinado tempo. Em cada voluntário foram aplicadas três formulações em 3 períodos diferentes, com um intervalo de 30 dias entre cada período, tempo necessário para eliminação completa do fármaco até a próxima aplicação.

IV.2.7. Validação da metodologia de extração de CTZ em fitas conjuntas

IV.2.7.1. Escolha da condição ótima de extração de CTZ das fitas adesivas

Inicialmente, foi realizado um estudo envolvendo várias etapas, onde foram utilizados diversos solventes, diferentes tempos e temperaturas de extração do CTZ das fitas adesivas. O preparo das fitas adesivas, descrito a seguir, foi o mesmo em todos os estudos.

Em tubos Eppendorff de 2,5 mL, mantidos na horizontal, foram colocadas fitas adesivas Transpore® 3M (1,0 x 1,0 cm^2), com a parte adesiva voltada para cima (1 fita por tubo). Sobre cada fita, foram dispostos 40µl de uma solução de CTZ a 50 µg/mL em etanol. Após a evaporação total do solvente procedeu-se a extração do fármaco, cujas condições foram modificadas, de acordo com a recuperação obtida.

- 1ª etapa: três solventes foram testados: CH_3OH, CH_3OH:H_2O (60:40) e CH_3CN:H_2O (70:30) com 400 µl de cada solvente em cada tubo e vortexados por 2 minutos.
- 2ª etapa: diferentes tempos e temperatura de extração.

O solvente empregado foi CH_3CN:H_2O (70:30) em três condições diferentes de extração: [1] 400 µl de solvente com agitação por 5 minutos; [2] 1 mL de solvente em banho-maria a 50°C por 5 minutos, e agitação por vórtex por 5 minutos; [3] 1 mL de solvente, agitação por vórtex por 1 minuto, aquecimento em banho a 50°C por 5 minutos e nova agitação por mais 1 minuto.

- 3ª etapa: testou-se 3 solventes: CH_3CN:H_2O (70:30), CH_3CN:H_2O (85:15), CH_3CN:CH_3OH:H_2O (40:40:20).

Para cada solvente a condição de extração foi a mesma: em cada tubo adicionou-se 1 mL de solvente, seguido de agitação por 1 minuto em vórtex, aquecimento em banho a 50°C/10 minutos, finalizando com mais 1 minuto de agitação posterior.

As respostas foram obtidas como porcentagem extraída de CTZ em relação ao adicionado. A referência para obtenção desta resposta era uma *spiked solution*, preparada com

40 μl da mesma solução de CTZ pipetada sobre as fitas mais um volume do solvente de extração correspondente, suficiente para completar o volume total de extração, 400 μl ou 1 mL, dependendo do caso.

A resposta obtida em CLAE com os solventes de extração, é uma porcentagem da resposta obtida com a *spiked solution* correspondente.

Na avaliação da penetração de CTZ no EC, por *tape stripping*, seriam obtidas 10 fitas para cada tempo. Essas 10 fitas poderiam ser analisadas conjuntamente, já que a massa contida nas mesmas seria a massa total do fármaco que penetrou na pele, por unidade de área, em um determinado tempo, ou seja, concentração *versus* tempo (SHAH et al., 1998).

IV.2.7.2. Caracterização da recuperação e da precisão da extração de CTZ das fitas adesivas

Após a definição da condição ótima de extração de CTZ nas fitas adesivas, realizou-se a avaliação da exatidão expressa pela recuperação da quantidade de CTZ extraída das fitas em conjunto, que foi realizada em três níveis de quantidade de CTZ adicionada às fitas: 2, 5 e 10 μg com cinco réplicas para cada nível. A precisão das respostas obtidas com o método escolhido foi avaliada pelo desvio padrão (s) e desvio padrão relativo (DPR) aos níveis de repetitividade e precisão intermediária.

Após a "remoção do estrato córneo" pela fita adesiva, estas foram colocadas separadamente em um suporte com a parte adesiva voltada para cima e sobre cada uma foram dispostas quantidades de CTZ da seguinte maneira:

2,0 μg: 20 μL de solução de CTZ a 100 μg/mL em etanol.

5,0 μg: 20 μL de solução de CTZ a 250 μg/mL em etanol.

10,0 μg: 20 μL de solução de CTZ a 500 μg/mL em etanol.

Após a evaporação total do solvente, cada conjunto de fitas foi fixado em uma fina haste de metal e colocado em um tubo de vidro contendo 10 mL de solvente e submetido à extração, de acordo com a condição ótima apresentada em resultados e discussão, e, posteriormente, submetida à quantificação por CLAE estabelecida em IV.2.3. deste capítulo.

IV.2.9. Procedimento de Pesagem do EC nas fitas adesivas

O protocolo de pesagem do tecido foi realizado com o objetivo de detectar a quantidade de EC retirado em cada remoção. O peso da fita adesiva (1,56 cm^2) foi medido antes e após a retirada da pele, em uma microbalança. As fitas foram retiradas de ambos antebraços ventrais de oito voluntários. Cada fita foi pressionada contra a área demarcada na pele por um bastão de vidro, rolando regularmente seis vezes. A seguir, a fita foi retirada rapidamente (como padronizado no protocolo anterior) e pesada separadamente perfazendo um total de 10 fitas (WEIGMANN et al., 1999-a). A primeira fita também foi descartada, como realizado no experimento *in vivo*. O valor do peso médio total do EC foi obtido dos valores médios de cada voluntário, que foi normalizado por área (mg/cm^2). Estes dados foram empregados para calcular a quantidade de CTZ por quantidade de EC retirado (μg de fármaco/mg de EC). Este experimento foi conduzido em uma sala com temperatura ambiente entre 20 e 22°C, e umidade relativa na faixa de 50-60°C.

IV.2.10. Tratamento de dados

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se um modelo de planejamento com dois fatores fixos. Realizou-se uma análise da variância (ANOVA) considerando dois fatores:

Fator 1: F1 = tratamento com dois níveis (tratamento 1 e tratamento 2);

Fator 2: F2 = antebraço com dois níveis (antebraço esquerdo e antebraço direito).

Foram testadas duas hipóteses: comparação entre dois tratamentos formulação A e formulação B; A e C; A e F0:2; C e D2:0; C e E1:1) e comparação entre os antebraços (esquerdo e direito). As hipóteses foram testadas ao nível de significância (α) de 5% às quantidades de fármaco determinadas no EC (μg/mg) para cada tempo de aplicação.

IV.3. Resultados e Discussão

IV.3.1. Validação das condições analíticas do cetoconazol por CLAE

O resultado da solubilidade de CTZ nos diversos solventes está listado na tabela IV.1. segundo a nomenclatura adotada pela USP (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2000), que relaciona partes de solvente requeridas para solubilizar uma parte do soluto.

Tabela IV.1. Solubilidade do cetoconazol segundo nomenclatura adotada pela USP (United States Pharmacopeia, 2000)

Solvente	Relação Solvente / Soluto	Termo Descritivo
Acetonitrila	100:1	Parcialmente solúvel
Água	Acima de 10.000:1	Insolúvel
Clorofórmio	2:1	Solúvel
Etanol	54:1	Parcialmente solúvel
Éter etílico	10.000:1	Muito fracamente solúvel
Isopropanol	350:1	Fracamente solúvel
Metanol	9:1	Solúvel
Tetrahidrofurano	72:1	Parcialmente solúvel

A fase móvel acetonitrila:K_2HPO_4 0,01 M testada nas condições:

1) 65:35 (vol/vol) (pH 6,0): não apresentou boa resolução cromatográfica. Além disso, o tempo de retenção obtido, 3,7 minutos, não permitiu uma boa separação do CTZ de interferentes presentes nas fitas adesivas.

2) 60:40 (vol/vol) (pH 6,8): apresentou melhor resolução cromatográfica e um tempo de retenção de 4,5 minutos, que além de permitir um bom fluxo de análises, foi suficiente para

distinguir o CTZ de interferentes presentes nas fitas adesivas, com o comprimento de onda em 242 nm e o fluxo em 0,7 mL/min (GONÇALVES; VOLPATO, 2001).

Durante a análise cromatográfica de amostras do estudo piloto em voluntários, observou-se interferência de componentes da pele na região do tempo retenção do CTZ obtido anteriormente. Por isso, a fase móvel acetonitrila:K_2HPO_4 0,01 M foi testada em uma terceira condição 50:50 (vol/vol) (pH 6,8), resultando em uma melhor resolução entre o fármaco, interferentes das fitas e a pele. O novo tempo de retenção observado foi em torno de 7,5 minutos. Sendo assim, a fase móvel nestas condições foi escolhida para os estudos *in vivo* e *in vitro*, mantendo o comprimento de onda em 242 nm e o fluxo em 0,7 mL/min previamente fixados.

A figura IV.2 apresenta três curvas padrão para o CTZ, com as respectivas equações da reta e os coeficientes de determinação (r^2), obtidas em dias diferentes. A análise de regressão da curva revelou linearidade adequada dentro da faixa de concentração trabalhada (0,10 – 10,00 μg/mL). O LD estimado para a análise foi de 25 ng/mL e o LQ foi de 80 ng/mL.

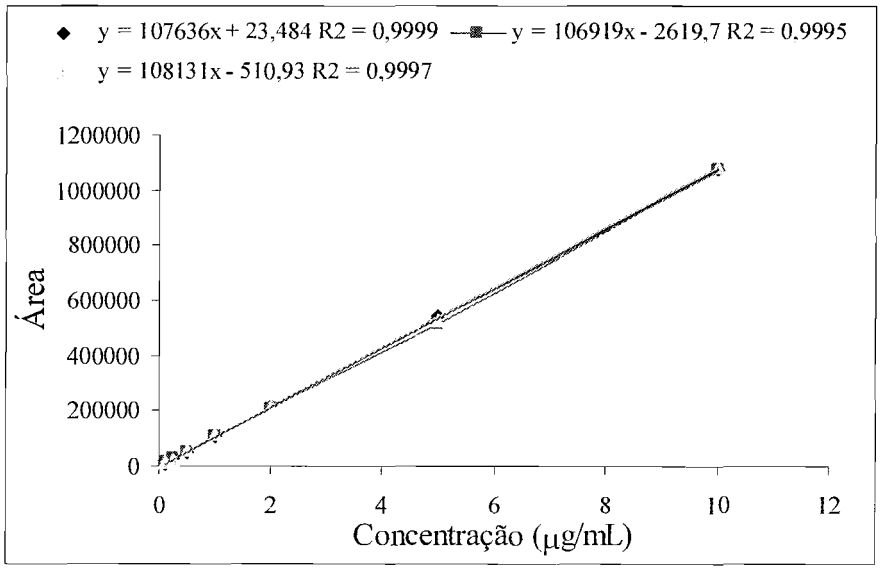


Figura IV.2. Representação gráfica de três curvas padrão do CTZ, obtidas por CLAE, na faixa de 0,10 - 10 μg/mL, em dias diferentes.

IV.3.2. Validação da metodologia de extração de CTZ das fitas adesivas

A técnica "remoção do estrato córneo" por fita adesiva é uma ferramenta útil para determinar a penetração de fármacos na pele, mais precisamente no EC (SHAH, 1995, SHAH et al., 1998, PERSHING, 2001).

Para tal, é importante obter condições ótimas de extração dos fármacos das fitas para posterior análise quantitativa. No presente trabalho, a recuperação de CTZ das fitas adesivas foi obtida através de estudo com diversos solventes, diferentes tempos e temperaturas, conforme descrito em IV.2.7.1 neste capítulo.

Os sistemas simples como metanol e binários como metanol:água (60:40) e acetonitrila:água (70:30) testados com condições de extração realizadas em diferentes tempos e temperaturas, apresentaram recuperações consideradas insatisfatórias na faixa de 30 a 75%. A mistura de solvente ternário, acetonitrila-metanol-água (40:40:20), 10 minutos de aquecimento em banho-maria a 50°C mais 1 minuto de agitação em vórtex promoveu uma recuperação de 84-90% de CTZ das fitas, com ausência de interferência no sistema cromatográfico. Assim sendo, estas condições de extração foram escolhidas para a extração de CTZ das fitas adesivas.

A tabela IV.2 apresenta os resultados obtidos para a recuperação média da quantidade de CTZ extraída das fitas em conjunto, que foi realizada em três níveis de quantidade de CTZ nas fitas: 2, 5 e 10 μg com cinco réplicas para cada nível.

Tabela IV. 2 – Resultados da recuperação média e da precisão da quantidade de CTZ extraída das fitas em conjunto

Quantidade adicionada de CTZ (μg)	n	Recuperação média de CTZ das fitas em conjunto (%)	DP (%)	DPR (%)
2	5	84,95	1,64	1,94
5	5	90,30	2,52	2,80
10	5	87,45	2,14	2,45

Na figura IV.3 apresenta três curvas padrão para o CTZ, com as respectivas equações da reta e os coeficientes de determinação (r^2), obtidas em dias diferentes. A análise de regressão da curva revelou linearidade adequada dentro da faixa de concentração trabalhada (0,50 – 10,00 μg/mL). O LD estimado para a análise também foi de 25 ng/mL assim como o LQ também foi de 80 ng/mL.

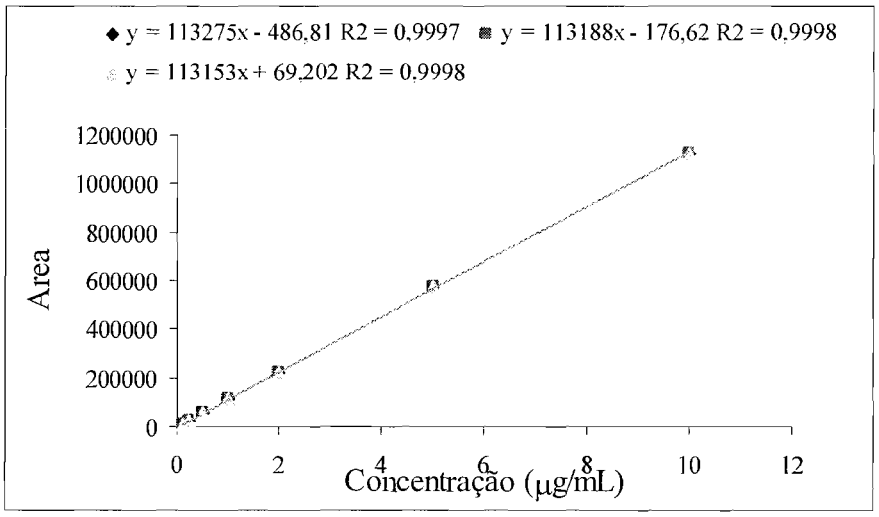


Figura IV.3. Representação gráfica de três curvas padrão do CTZ, obtidas por CLAE, na faixa de 0,50 - 10 μg/mL, em dias diferentes.

IV.3.3. Experimentos de penetração cutânea *in vivo*

Nos experimentos *in vivo*, as formulações foram aplicadas sobre a pele sem efeito oclusivo, existindo a possibilidade de ocorrer uma evaporação da água da base deixando as moléculas do fármaco imersas em uma fase oleosa. Segundo FLORENCE e ATTWOOD (2003), sistemas de emulsão de óleo-em-água quando aplicadas topicamente podem inverter para sistemas de água-em-óleo, o que faria com que o fármaco se difundisse através de uma camada oleosa para alcançar a pele. Componentes não-voláteis da formulação aumentam de concentração na medida em que os componentes voláteis são eliminados; isto pode alterar o estado de saturação do fármaco e, conseqüentemente, sua atividade.

Ao longo dos experimentos de penetração cutânea *in vivo* de CTZ das formulações semi-sólidas, empregando a metodologia *tape stripping*, foi realizado um controle positivo visando verificar se o percentual de recuperação do fármaco das fitas pós-retirada do EC, mantinha-se condizente com o obtido na validação do método de extração.

A tabela IV.3 apresenta a recuperação média do fármaco das fitas pós-retirada do EC de ambos antebraços. Em cada fita foi adicionado 0,5 μg de CTZ (10 μL de uma solução 50 μg/mL), perfazendo 5 μg de CTZ num total de 10 coletas do EC.

Tabela IV.3 – Recuperação média de CTZ das fitas pós- retirada do EC de ambos antebraços em cada experimento (n=6)

Experimento	Recuperação média de CTZ (%)	DP	DPR
1	91,48	1,45	1,58
2	88,92	1,13	1,27
3	85,50	0,93	1,08
4	96,78	0,83	0,86
5	96,56	0,92	0,95
6	88,13	1,14	1,29

No sítio controle negativo, não foi detectado a presença do fármaco através da análise por CLAE, assim como, nenhuma substância endógena interferiu no tempo de retenção do CTZ (7,6 min). As figuras IV.4 e IV.5 mostram os cromatogramas obtidos dos experimentos de *tape stripping* com a formulação referência aplicada nos antebraços direito e esquerdo respectivamente.

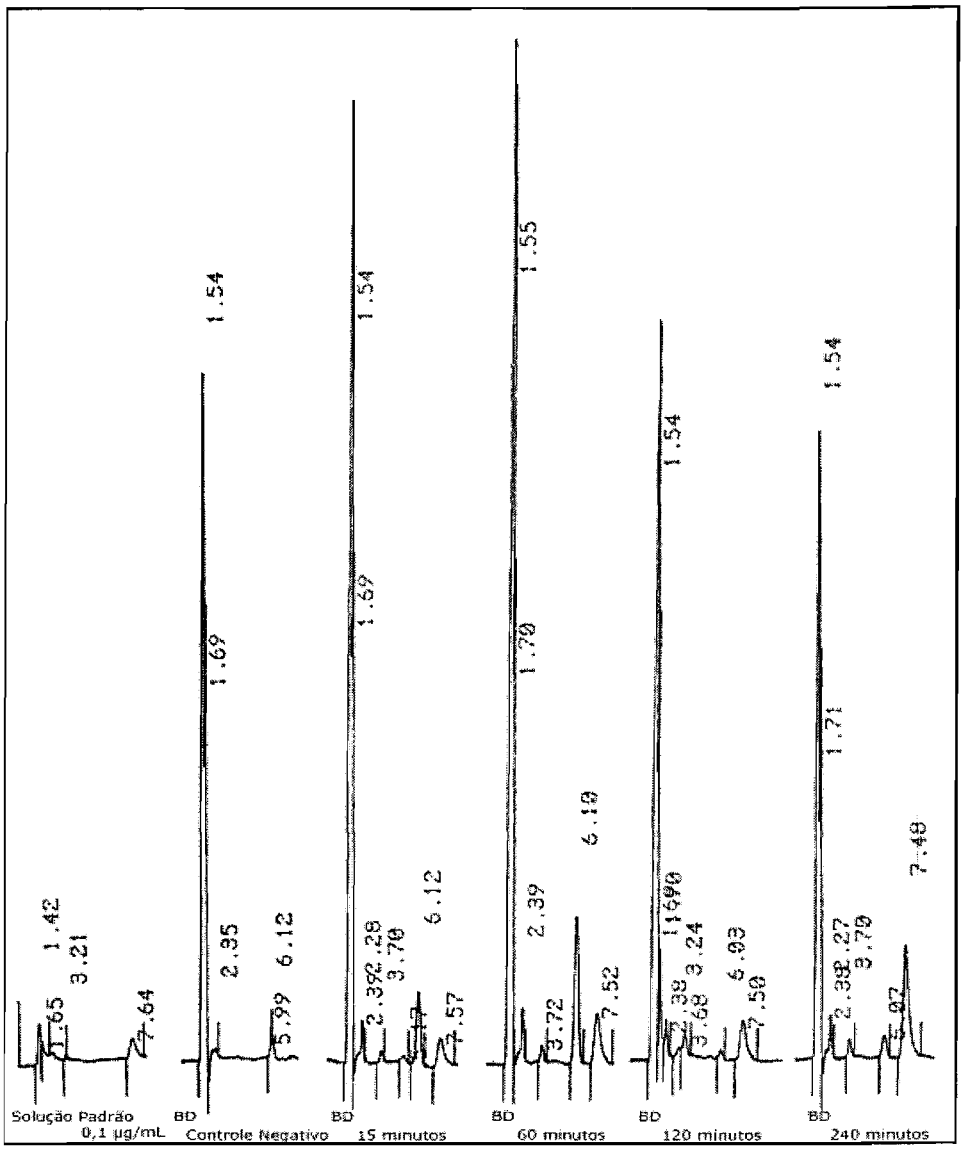


Figura IV.4. - Cromatogramas ilustrativo da solução padrão de CTZ (tempo de retenção = 7,5 ± 0,1 min) e soluções extratoras das diferentes áreas demarcadas nos experimentos de *tape stripping* com a formulação referência aplicada no antebraço direito de um voluntário.

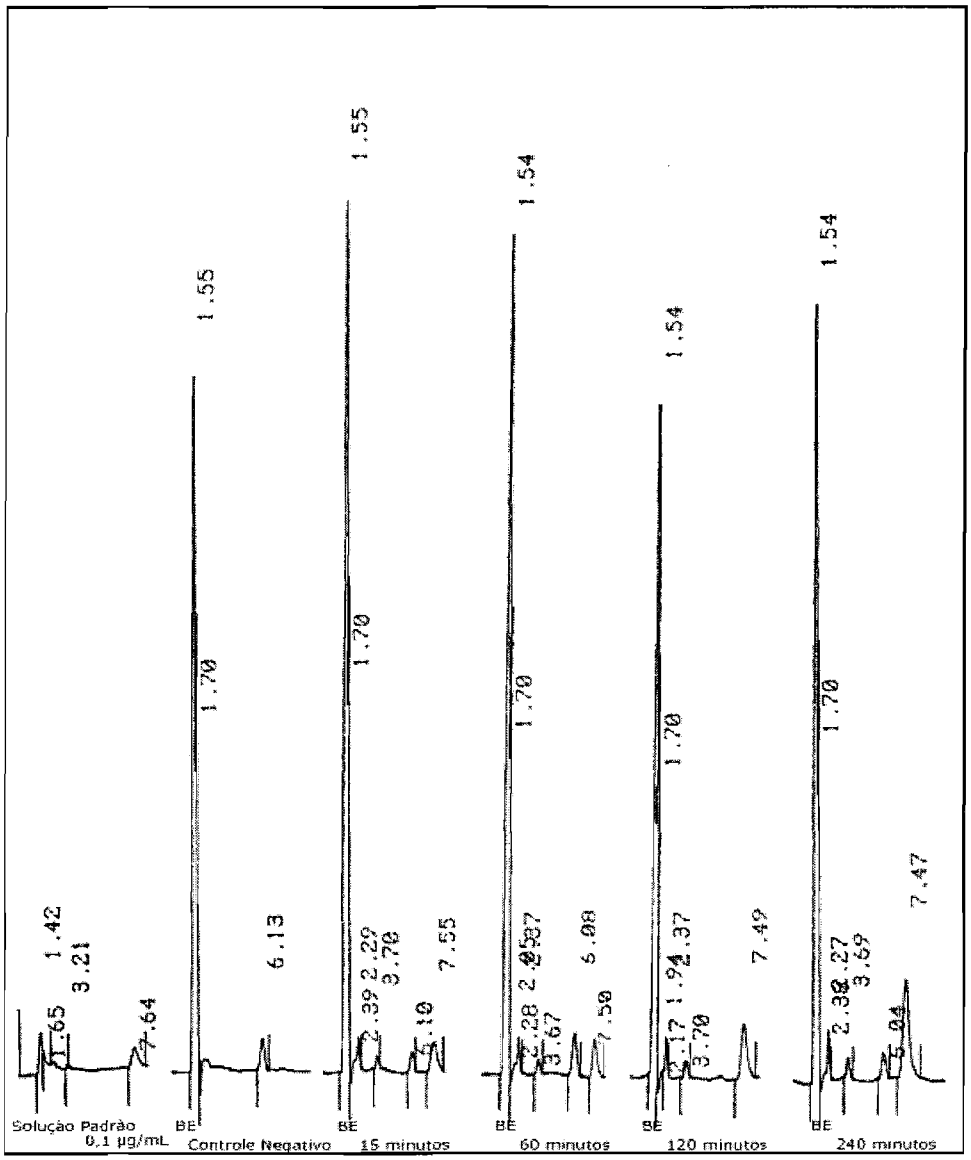


Figura IV.5. - Cromatogramas ilustrativo da solução padrão de CTZ (tempo de retenção = 7,5 ± 0,1 min) e soluções extratoras das diferentes áreas demarcadas nos experimentos de *tape stripping* com a formulação referência aplicada no antebraço esquerdo de um voluntário.

A quantificação do EC removido é de importância relevante para estabelecer a concentração do fármaco na pele após a aplicação da formulação. A pesagem é um método preferido para medir a quantidade removida (WEIGMANN et al., 1999-a; WEIGMANN et al., 1999-b; KALIA et al., 2001; WEIGMANN et al., 2001).

No presente trabalho, o EC de ambos os antebraços dos voluntários foi pesado para avaliar a quantidade do mesmo presente na mesma área de "remoção do fármaco" por fitas (1,56 cm^2) (figura IV.6.).

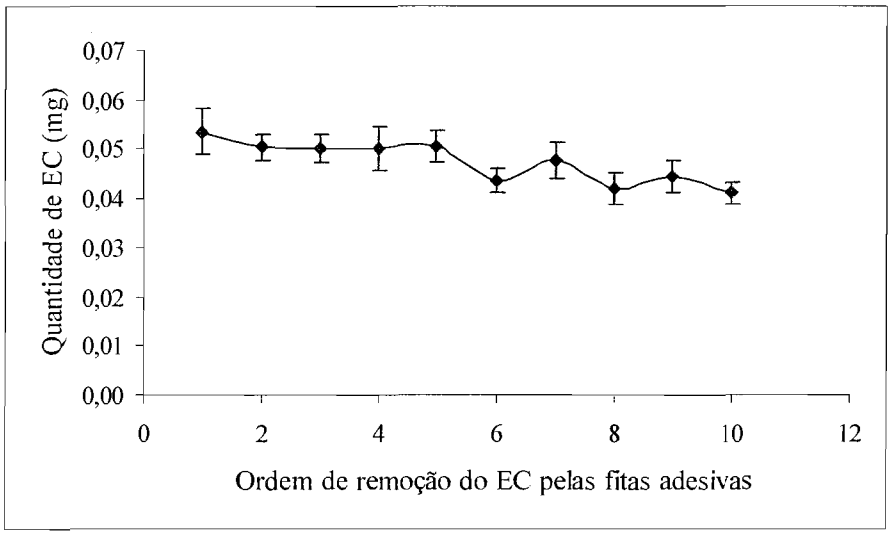


Figura IV.6. – Quantidade média de EC retirado pela fitas adesivas. Erro de barras indica erro padrão da média (e.p.m.).

Assim, o valor total médio de EC retirado dos voluntários (0,474 ± 0,0034 mg de EC) foi normalizado para a área de 1cm^2, fornecendo resultado de 0,303 ± 0,0033 mg de EC/cm^2, o qual foi empregado no cálculo da quantidade de CTZ/quantidade de EC retirado (μg of CTZ/mg of EC).

As tabelas IV.4 e IV.5 apresentam a quantidade média do fármaco presente no EC em μg/mg de EC, obtida após a aplicação de aproximadamente 15 mg de cada formulação (A, B, C, D2:0, E1:1 e F0:2) em ambos antebraços de oito voluntários nos intervalos pré-estabelecidos (15, 60, 120 e 240 minutos).

Tabela IV.4 – Quantidade média de CTZ (média ± erro padrão da média.) presente no EC (µg/mg) obtida após a aplicação das formulações A, B, C (n = 16)

Tempo	A	B	C
15	0,5793 ± 0,2728	0,5047 ± 0,2641*	1,9313 ± 0,4081**
60	2,5973 ± 0,8097	2,7354 ± 0,7344	3,1263 ± 0,7568
120	6,2188 ± 2,4137	5,5602 ± 1,0459	3,7192 ± 0,8258
240	8,0153 ± 2,7564	7,9935 ± 1,1211	4,7654 ± 1,4731

*n = 14; **n = 15

Tabela IV.5 – Quantidade média de CTZ (média ± erro padrão da média.) presente no EC (µg/mg) obtida após a aplicação das formulações D(2:0), E(1:1) e F(0:2) (n = 16)

Tempo	D(2:0)	E(1:1)	F(0:2)
15	1,7267 ± 0,3069*	1,7662 ± 0,6845	1,1399 ± 0,2897
60	2,3435 ± 0,4760	1,7882 ± 0,3446	3,1925 ± 0,5423
120	2,3735 ± 0,2991	1,9929 ± 0,4801	5,4456 ± 0,7688
240	5,5119 ± 1,3161	3,7392 ± 0,7797	5,9932 ± 0,7915

*n = 15;

As formulações foram avaliadas por grupos (primeiro grupo A, B e C; segundo grupo D2:0, E1:1 e F0:2) a partir de curvas padrão preparadas em cada dia de análise. A média do coeficiente de determinação (r^2) encontrado foi 0,9968 ± 0,0014 e 0,9975 ± 0,0003 (n = 20) para o primeiro e segundo grupo respectivamente, indicando manutenção da linearidade da resposta da CLAE nessas condições de análise e dentro da faixa de concentrações 0,50 – 10,00 µg/mL. Isso quer dizer que resultados de concentrações dentro dessa faixa são confiáveis. O LD para a análise foi de 50 ng/mL e o LQ foi de 150 ng/mL.

A figura IV.7 apresenta três curvas padrão para o CTZ, com as respectivas equações da reta e os coeficientes de determinação (r^2), obtidas em dias diferentes.

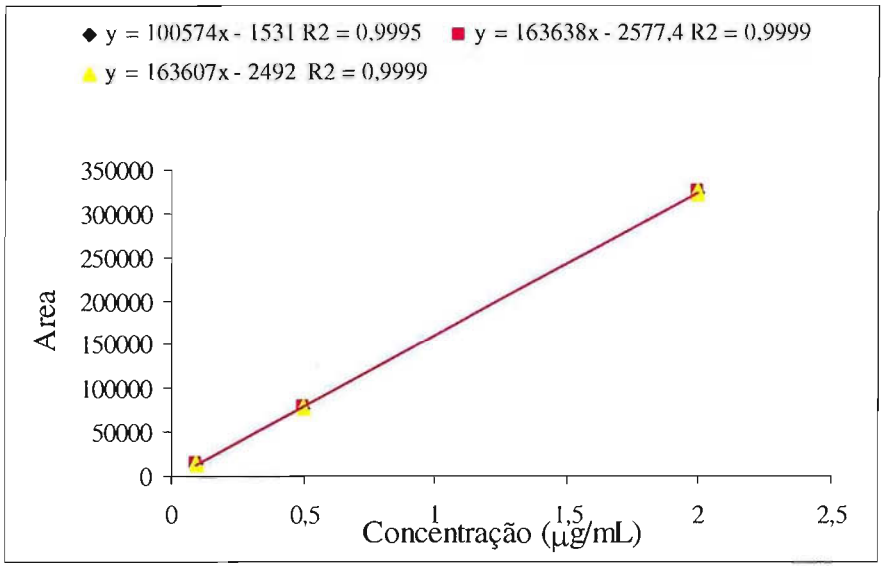


Figura IV.7. Representação gráfica de três curvas padrão do CTZ, obtidas por CLAE, na faixa de 0,50 - 10 µg/mL, em dias diferentes.

As quantidades médias do fármaco presente no EC em µg/mg em função dos tempos (15, 60, 120 e 240 minutos) são apresentadas sob forma de gráfico de acordo com o tratamento estatístico (ver figuras IV.8, IV.9 e IV.10).

A tabela IV.6 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA) entre as formulações A e B. As hipóteses testadas foram:

Hipótese 1: Formulação A = Formulação B *versus* Formulação A ≠ Formulação B.

Hipótese 2: Antebraço Direito = Antebraço Esquerdo *versus* Antebraço Direito ≠ Antebraço Esquerdo.

Tabela IV.6. Resultado do tratamento estatístico (ANOVA) considerando dois fatores: F1 = tratamento e F2 = antebraço entre as formulações A e B em todos os tempos.

Tempo	Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor-p
15	F1	1	0,044518	0,044518	0,106884	0,746151
	F2	1	1,184899	1,184899	2,844835	0,10278
	F1F2	1	0,132242	0,132242	0,317501	0,577598
	Residual	28	11,66225	0,416509		
	Total	31	13,02391			
60	F1	1	0,1525	0,1525	0,04068	0,841614
	F2	1	0,308365	0,308365	0,082258	0,776372
	F1F2	1	2,3116141	2,316141	0,617843	0,438452
	Residual	28	104,9651	3,748753		
	Total	31	107,7421			
120	F1	1	3,469275	3,469275	0,155995	0,695864
	F2	1	0,028937	0,028937	0,001301	0,971481
	F1F2	1	0,299718	0,299718	0,013477	0,90841
	Residual	28	622,7103	22,23965		
	Total	31	626,5083			
240	F1	1	0,003822	0,003822	0,000136	0,990766
	F2	1	0,049588	0,049588	0,001769	0,966747
	F1F2	1	12,40242	12,40242	0,442501	0,51136
	Residual	28	784,7839	28,028		
	Total	31	797,2397			

Onde:

g.l. = grau de liberdade

SQ = soma dos quadrados

QM = quadrado médio

F = valor da estatística F

F1 = fator 1

F2 = fator 2

F1F2 = interação entre o fator 1 e fator 2

Residual = resíduo do modelo

Baseado nos resultados apresentados na tabela IV.5, pode-se concluir que, em todos os tempos, não existe interação entre os tratamentos e os antebraços ($p > 0,05$), as formulações A e B são estatísticamente iguais ($p > 0,05$) e que não existe diferença significativa entre os antebraços direito e esquerdo ($p > 0,05$).

Analogamente, a formulação C foi avaliada estatisticamente em relação ao produto A (referência nacional) e seus resultados estão apresentados na tabela IV.7.

As hipóteses testadas são:

Hipótese 1: Formulação A = Formulação C *versus* Formulação A ≠ Formulação C.

Hipótese 2: Antebraço Direito = Antebraço Esquerdo *versus* Antebraço Direito ≠ Antebraço Esquerdo.

Universidade de São Paulo

Tabela IV.7. Resultado do tratamento estatístico (ANOVA) considerando dois fatores: F1 = tratamento e F2 = antebraço entre as formulações A e C em todos os tempos

Tempo	Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor-p
15	F1	1	14,62399	14,62399	20,57677	9,85E-05
	F2	1	0,013687	0,013687	0,019258	0,890623
	F1F2	1	1,782736	1,782736	2,508407	0,124471
	Residual	28	19,8997	0,710704		
	Total	31	36,3201			
60	F1	1	2,238885	2,238885	0,588173	0,449545
	F2	1	4,010277	4,010277	1,053532	0,313481
	F1F2	1	0,005569	0,005569	0,001463	0,96976
	Residual	28	106,5822	3,806508		
	Total	31	112,837			
120	F1	1	49,98262	49,98262	2,390169	0,133329
	F2	1	0,413684	0,413684	0,019782	0,889153
	F1F2	1	0,005534	0,005534	0,000265	0,987136
	Residual	28	585,5289	20,91175		
	Total	31	635,9307			
240	F1	1	84,49397	84,49397	2,706948	0,111094
	F2	1	2,302841	2,302841	0,073777	0,787908
	F1F2	1	3,173781	3,173781	0,101679	0,752191
	Residual	28	873,9849	31,21375		
	Total	31	963,9555			

Baseado nos resultados apresentados na tabela IV.5, pode-se concluir que apenas no tempo 15 minutos, existe a diferença estatisticamente significativa entre as formulações A e C ($p < 0,05$) e que em qualquer instante, não existe diferença significativa entre os antebraços direito e esquerdo ($p > 0,05$). A figura IV.8 mostra a quantidade de CTZ encontrada nas fitas 2-11, normalizada em microgramas por miligrama de EC em diferentes tempos (15, 60, 120 e 240 minutos); após a aplicação de três formulações: duas comerciais (A e B) e uma manipulada (C). Os dados representam os valores médios e o erro padrão da média (e.p.m.) de fitas removidas de ambos antebraços ventrais de oito voluntários.

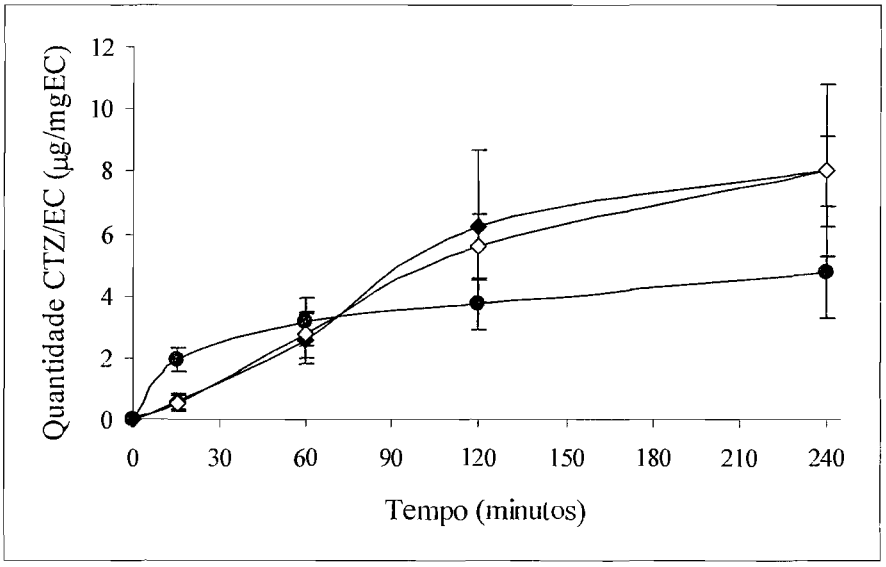


Figura IV.8. – Quantidade de CTZ presente no EC. Erro de barras indica erro padrão da média (e.p.m.). ◆ = produto A; ◇ = produto B; ● = produto C.

Como esperado, a presença do fármaco no EC aumentou em função do tempo. Os produtos A e B apresentaram um perfil similar de captação do ativo ($p > 0,05$ para todos os tempos); o produto C apresentou uma quantidade maior de CTZ no EC no tempo de 15 minutos ($p < 0,05$) (FREITAS et al., 2003), quando comparado aos produtos A e B.

De acordo com o discutido no capítulo III item III.2.1., as formulações D2:0 e E1:1 foram preparadas com o objetivo de avaliar se a incorporação do CTZ em diferentes fases da preparação poderia interferir na captação do fármaco no E.C.

Na formulação D(2:0) a quantidade total do fármaco foi adicionado à fase oleosa e na E(1:1) um por cento do fármaco foi incorporado à fase oleosa e mais um por cento foi incorporado ao creme pronto. Ambas formulações foram comparadas com o produto manipulado, C(0:2), pela Farmácia Universitária (FF-UFRJ), onde o fármaco foi incorporado ao creme base pronto.

A quantidade total de CTZ presente no EC (μg de CTZ/mg de EC) em função dos tempos 15, 60, 120 e 240 minutos foi avaliada estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) considerando dois fatores: F1 = tratamento e F2 = antebraço. Foram testadas duas hipóteses ($\alpha = 0,05$) para as C e D(2:0) (tabela IV.8.):

Hipótese 1: Formulação C = Formulação D *versus* Formulação C ≠ Formulação D.

Hipótese 2: Antebraço Direito = Antebraço Esquerdo *versus* Antebraço Direito ≠ Antebraço Esquerdo.

E entre as formulações C e E(1:1) as hipóteses (tabela IV.9):

Hipótese 1: Formulação C = Formulação E(1:1) *versus* Formulação C ≠ Formulação E(1:1).

Hipótese 2: Antebraço Direito = Antebraço Esquerdo *versus* Antebraço Direito ≠ Antebraço Esquerdo.

Tabela IV.8. Resultado do tratamento estatístico (ANOVA) considerando dois fatores: F1 = tratamento e F2 = antebraço entre as formulações C e D(0:2) em todos os tempos

Tempo	Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor-p
15	F1	1	0,335122	0,335122	0,451467	0,507146
	F2	1	0,143666	0,143666	0,193543	0,663361
	F1F2	1	2,551156	2,551156	3,436845	0,07432
	Residual	28	20,7843	0,742296		
	Total	31	23,8142			
60	F1	1	4,903351	4,903351	2,039609	0,164309
	F2	1	4,605165	4,605165	1,915575	0,177279
	F1F2	1	0,047534	0,047534	0,019772	0,889181
	Residual	28	67,31379	2,404064		
	Total	31	76,86984			
120	F1	1	14,48699	14,48699	5,897133	0,021842
	F2	1	0,049306	0,049306	0,020071	0,888354
	F1F2	1	0,625432	0,625432	0,254591	0,617809
	Residual	28	68,78525	2,456616		
	Total	31	83,94698			
240	F1	1	4,45832	4,45832	0,356391	0,555314
	F2	1	0,727866	0,727866	0,058184	0,811146
	F1F2	1	0,347099	0,347099	0,027747	0,868903
	Residual	28	350,2695	12,50962		
	Total	31	355,8027			

Tabela IV.9. Resultado do tratamento estatístico (ANOVA) considerando dois fatores: F1 = tratamento e F2 = antebraço entre as formulações C e E(1:1) em todos os tempos

Tempo	Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor-p
15	F1	1	0,21812	0,21812	0,111655	0,740758
	F2	1	0,105457	0,105457	0,053983	0,817962
	F1F2	1	2,380671	2,380671	1,218659	0,279021
	Residual	28	54,69847	1,953517		
	Total	31	57,40272			
60	F1	1	14,32593	14,32593	6,652864	0,015443
	F2	1	0,536646	0,536646	0,249215	0,621529
	F1F2	1	1,428934	1,428934	0,663587	0,422171
	Residual	28	60,29375	2,153348		
	Total	31	76,58526			
120	F1	1	23,8406	23,8406	8,361409	0,007332
	F2	1	1,751362	1,751362	0,61424	0,439776
	F1F2	1	0,569419	0,569419	0,199707	0,658395
	Residual	28	79,83546	2,851266		
	Total	31	105,9968			
240	F1	1	8,424497	8,424497	0,961053	0,335317
	F2	1	2,747166	2,747166	0,313392	0,580057
	F1F2	1	1,941726	1,941726	0,221509	0,641538
	Residual	28	245,4452	8,7659		
	Total	31	258,5588			

De acordo com os resultados, as formulações C e D2:0 apresentaram diferenças estatisticamente significativas no instante de 120 minutos, enquanto as C e E1:1, as diferenças foram detectadas nos tempos de 60 minutos e 120 minutos ($p > 0,05$). Além disso, não foram verificadas diferença significativa entre os antebraços direito e esquerdo ($p > 0,05$) em todos os tempos.

A figura IV.9 mostra a quantidade de CTZ encontrada nas fitas 2-11 em diferentes tempos (15, 60, 120 e 240 minutos); após a aplicação dessas formulações. Os dados representam os valores médios e o e.p.m. de fármaco extraído de fitas removidas de ambos antebraços ventrais de oito voluntários.

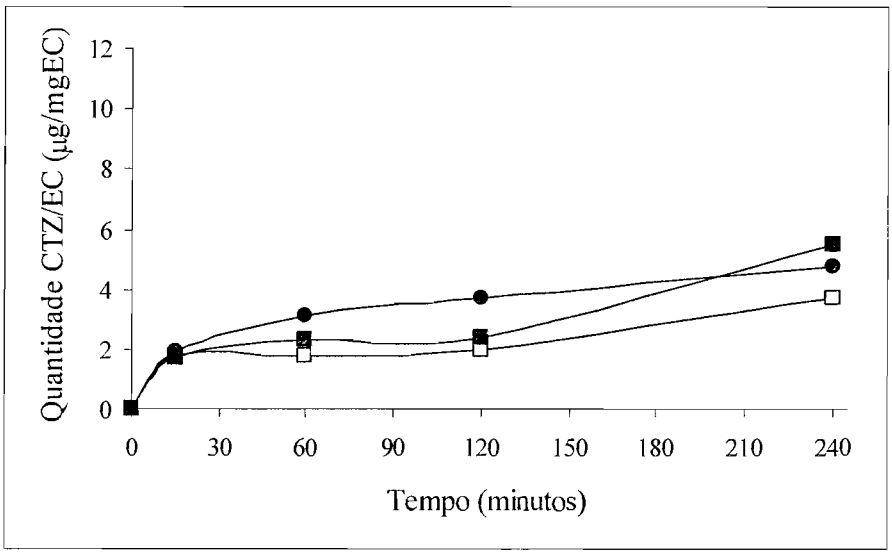


Figura IV.9. – Quantidade de CTZ presente no EC. Erro de barras indica erro padrão da média (e.p.m.). ● = produto C; ■ = produto D2:0; □ = produto E1:1.

A incorporação do CTZ nas diferentes fases da preparação não interfere na presença do fármaco no EC.

A terceira formulação desenvolvida, F2:0 possui em sua composição um agente promotor (propilenoglicol) que pode aumentar a penetração do CTZ nos tecidos cutâneos, assim como, o produto A (referência nacional) possui esse excipiente.

Sendo assim, F2:0, foi comparada estatisticamente com o produto A, uma vez que, seu desenvolvimento visou aumento na biodisponibilidade do CTZ. De acordo com os resultados citados anteriormente, a incorporação do fármaco não interferiu no seu comportamento biofarmacêutico. Por conseguinte, o ativo foi incorporado ao creme base da formulação F0:2.

A tabela IV.10. apresenta o tratamento estatístico (ANOVA) considerando duas hipóteses (F1 = tratamento e F2 = antebraço com $\alpha = 0,05$) para as quantidades de fármaco determinadas no EC (μg/mg) dos produtos A e F(0:2) em todos os tempos:

Hipótese 1: Formulação A = Formulação F(0:2) *versus* Formulação A ≠ Formulação F(0:2).

Hipótese 2: Antebraço Direito = Antebraço Esquerdo *versus* Antebraço Direito ≠ Antebraço Esquerdo.

Tabela IV.10. Resultado do tratamento estatístico (ANOVA) considerando dois fatores: F1 = tratamento e F2 = antebraço entre as formulações A e F(0:2) em todos os tempos

Tempo	Fonte	g.l.	SQ	QM	F	Valor-p
15	F1	1	2,513834	2,513834	5,732162	0,023596
	F2	1	1,971286	1,971286	4,495019	**0,042988**
	F1F2	1	0,002319	0,002319	0,005288	0,942547
	Residual	28	12,2794	0,438549		
	Total	31	16,7668			
60	F1	1	2,833967	2,833967	0,959246	0,335764
	F2	1	2,55966	2,55966	0,866398	0,359911
	F1F2	1	0,227815	0,227815	0,077111	0,783291
	Residual	28	82,7224	2,95437		
	Total	31	88,3438			
120	F1	1	4,781687	4,781687	0,232891	0,63314
	F2	1	2,251195	2,251195	0,109644	0,743016
	F1F2	1	0,612813	0,612813	0,029847	0,864081
	Residual	28	574,8935	20,53191		
	Total	31	582,5391			
240	F1	1	40,94957	40,94957	1,603352	0,294924
	F2	1	2,720887	2,720887	0,106534	0,615811
	F1F2	1	2,720887	2,720887	0,106534	0,8912
	Residual	28	715,1193	25,53998		
	Total	31	761,5107			

De acordo com os resultados apresentados na tabela IV.10, pode-se concluir que as formulações A e F0:2 são estatísticamente iguais ($p > 0,05$, a exceção no tempo 15 min) e que não existe diferença significativa entre os antebraços direito e esquerdo ($p > 0,05$) nos tempos 60, 120 e 240 minutos.

A figura IV.10 mostra a quantidade de CTZ encontrada nas fitas (2-11) da terceira formulação desenvolvida F2:0, A e B, após a aplicação dessas formulações. Os dados representam os valores médios e o e.p.m. de fármaco extraído de fitas removidas de ambos antebraços ventrais de oito voluntários.

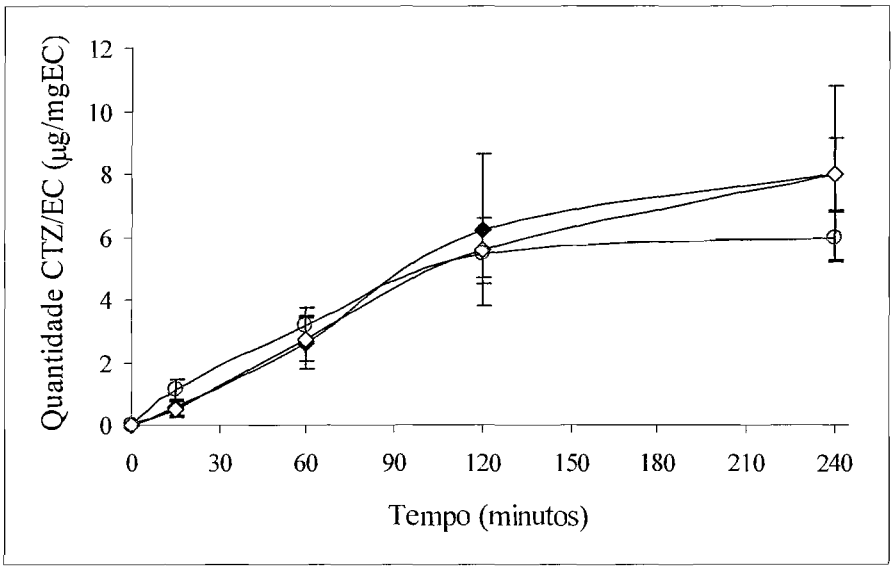


Figura IV.10. – Quantidade de CTZ presente no EC. Erro de barras indica erro padrão da média (e.p.m.). ◆ = produto A; ◇ = produto B; ○ = produto F.

Os produtos A, B e F2:0 apresentam em sua composição propilenoglicol (promotor químico). Este componente tem a propriedade de permear dentro da pele e alterar suas características de solubilidade, promovendo um aumento na velocidade de absorção de diversas moléculas (Hadgraft, 2001).

A determinação da viscosidade das formulações A, B, C, D2:0, E1:1 e F2:0 estão descritas no ítem III.2.2 do capítulo 3. De acordo com os resultados obtidos, a formulação B

apresenta maior viscosidade e a E1:1 a menor. Como pode ser observado, os resultados não influenciaram na captação de CTZ pelo EC dos referidos produtos.

A bioequivalência foi avaliada empregando a quantidade de CTZ presente no EC de ambos antebraços de voluntários sadios de acordo com os critérios das razões ($ASC_{0\text{-}240min}$) entre os produtos B, C e F em relação a A (considerado referência) com intervalo de confiança de 90% (IC 90%).

Para produtos sólidos orais, de acordo com a legislação nacional (BRASIL, 2003b), dois medicamentos serão considerados bioequivalentes se os valores extremos do intervalo de confiança de 90% da razão da média geométrica ($ASC_{0\text{-teste}}/ASC_{0\text{-referência}}$) forem maiores que 0,8 e menores que 1,25. Este limite também foi utilizado nos estudos da determinação da bioequivalência de produtos semi-sólidos como gel de tretinoina 0,025% (PERSHING et al., 2003) e gel de cetoprofeno 2,5% (LODÉN et al., 2004).

A tabela IV.11 apresenta os valores extremos de IC com 90% de área sob a curva para A *versus* B; A *versus* C e A *versus* F(0:2) e suas razões, respectivamente.

Tabela IV.11. – Valores extremos de IC e razão de área sob a curva para formulações A, B, C, e F0:2

$ASC_{0\text{-}240min}$	IC 90%	Razão
A *versus* B	81,91 a 150,83	111%
A *versus* C	50,68 a 114,96	76%
A *versus* F0:2	82,27 a 133,93	105%

Considerando o limite de 80-125%, as formulações não seriam bioequivalentes, existe uma grande diferença entre os produtos A e B, entre A e C; já A e F apresentam intervalo mais próximos dos limites citado, portanto podemos concluir que a formulação do produto F poderia ser indicada a um possível desenvolvimento de genérico do produto A.

IV.4. Conclusões

- A metodologia analítica desenvolvida para quantificar CTZ nos sitemas em estudo foi adequada e satisfatória.

Os estudos realizados para verificar a presença de CTZ no EC, permitiram verificar que:

- O produto C, uma formulação manipulada, na qual o CTZ foi incorporado em um creme base aniônico, apresentou maior quantidade do fármaco no início e menor quantidade no final do experimento, da mesma forma, as formulações D0:2 e E1:1 também apresentaram este comportamento;
- A incorporação de CTZ nas diferentes fases de preparo do creme não interferiu na quantidade de ativo presente no EC;
- O excipiente, propilenoglicol, presente na formulação F(0:2) promoveu a absorção de CTZ no EC;
- A formulação F(0:2) apresentou biodisponibilidade comparável à do produto referência nacional.
- Considerando o limite de 80-125%, os produtos A e B e A e C não podem ser considerados bioequivalentes, pois existe uma grande diferença entre as formulações.
- A formulação do produto F0:2 pode ser indicada a um possível desenvolvimento de genérico do produto A, uma vez que, existe uma pequena diferença entre as formulações;
- O modelo proposto no presente trabalho, empregando a técnica *tape stripping*, mostrou-se adequado para estudos na área da dermatofarmacocinética visando à avaliação da bioequivalência entre formulações semi-sólidas. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados avaliando a influência do número de voluntários utilizados sobre a conclusão da bioequivalência de produtos tópicos.

- Além disso, como os resultados obtidos quando da avaliação do efeito dos antebraços (direito e esquerdo) demonstraram que não houve diferença estatística, propõe-se que o desenho experimental para realização de estudos de bioequivalência entre produtos dermatológicos recomende a aplicação do produto teste em um dos antebraços e do referência no outro, como forma de reduzir a variabilidade dos resultados e aumentar a capacidade preditiva do modelo.

IV.5. Referências Bibliográficas*

ALBERTI, I.; KALIA, Y.N.; NAIK, A.; BONNY, J.-D.; GUY, R.H. *In vivo* assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. *J. Controlled Release,* Amsterdam, v.71, p.319-327, 2001.

BRASIL. Resolução RDC n. 899, de 29 de maio de 2003a. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União, Brasília*, n.104, 02 jun. 2003a. Seção 1, p.56-59.

BRASIL. Resolução RDC n.135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. *Diário Oficial da União*, Brasília, n.104, 02 jun. 2003b. Seção 1, p.28-30.

BRION, J.D. Conazoles. In: ASSOCIATION FRANÇAISE DES ENSEIGNANTS DE CHIMIE THÉRAPEUTIQUE. *Traité de chimie thérapeutique*: principaux antifongiques et antiparasitaires. Paris: Technique et Documentation, 1999. cap.6, p.115-169.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia.* São Paulo: EDUSP, 2003. p.537.

FREITAS, Z.M.F.; BEMVINDO, C.; SANTOS, E.P.; STORPIRTIS, S.; VOLPATO, N.M. Biopharmaceutical studies of commercial 2% ketoconazole creams by tape stripping. In: PHARMATECH, 7, João Pessoa, 2003. *Proceedings*. João Pessoa, 2003b. Bp009, CD-ROM.

GONÇALVES, J.R.O.; VOLPATO, N.M. Analytical conditions optimization for evaluation of skin penetration of ketoconazole by tape stripping. In: PHARMATECH, 6, Recife, 2001. *Proceedings*. Recife: SBTF/APGI, 2001. 358p.

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

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Validation of analytical procedures: methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

KALIA, Y.N.; ALBERTI, I.; NAIK, A.; GUY, R.H. Assessment of topical bioavailability *in vivo*: the importance of stratum corneum thickness. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, Basel, v.14, n.1, p.82-86, 2001.

LODÉN, M.; ÅKERSTRÖM, U.; LINDAHL, K.; BERNE, B. Bioequivalence determination of topical ketoprofen using a dermatopharmacokinetic approach and excised skin penetration. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.284, p.23-30, 2004.

PERSHING, L.K. Dermatopharmacokinetics for assessing bioequivalence of topically applied products in human skin. *Cosmet. Toiletries*, Carol Stream, v.115, n.5, p.43-51, 2001.

PERSHING, L.K.; CORLETT, J.; JORGENSEN, C. *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.38, p.90-95, 1994.

PERSHING, L.K.; NELSON, J.L.; CORLETT, J.L.; SHRISVASTAVA, S.P.; HARE, D.B.; SHAH, V.P. Assessment of dermatopharmacokinetic approach in the bioequivalence determination of tropical tretinoin gel products. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis, v.48, p.740-751, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

SHAH, V.P. Challenges in evaluating bioequivalence of dermatological drug products. *Curr. Probl. Dermatol.*, Basel, v.22, p.152-157, 1995.

SHAH, V.P.; FLYNN, G.L.; YACOBI, A.; MAIBACH, H.I.; BON, C.; FLEISCHER, N.M.; FRANZ, T.J.; KAPLAN, S.A.; KAWAMOTO, J.; LESKO, L.J.; MARTY, J.-P.; PERSHING, L.K.; SCHAEFER, H.; SEQUEIRA, J.A.; SHRIVASTAVA, S.P.; WILKIN, J.; WILLIAMS, R.L. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms: methods of evaluation of bioequivalence. *Pharm. Res.*, Norwell, v.15, n.2, p.167-171, 1998.

UNITED States Pharmacopeia: USP 24.; The National Formulary: NF 19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.945.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. *Guidance for industry*: ICH Q2B Validation of analytical procedures: methodology. Rockville, 1995. (CPMP/ICH/281/95). Disponível em: http://www.fda.gov/cber/gdlns/ichq2bmeth.pdf. Acesso em: 10 jun. 2000.

WEIGMANN, H.-J.; LADEMANN, J.; MEFFERT, H.; SCHAEFER, H.; STERRY, W. Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, Basel, v.12, p.34-45, 1999a.

WEIGMANN, H.-J.; LADEMANN, J.; PELCHRZIM, R.V.; STERRY, W.; HAGEMEISTER, T.; MOLZAHN, R.; SCHAEFER, M.; LINDSCHEID, M.; SCHAEFER, H.; SHAH, V.P. Bioavailability of clobetasol propionate quantification of drug concentrations in the stratum corneum by dermatopharmacokinetics using tape stripping. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, Basel, v.12, p.46-53, 1999b.

WEIGMANN, H.-J.; LADEMANN, J.; SCHANZER, S.; LINDEMANN, U.; PELCHRZIM, R.V.; SCHAEFER, H.; STERRY, W.; SHAH, V. Correlation of the local distribution of topically applied substances inside the stratum corneum determined by *tape stripping* to differences in bioavailability. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, Basel, v.14, n.1, p.98-102, 2001.

*Referências de acordo com a norma NBR 6023/39 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Anexo

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Comissão de Investigação Científica/11E49/DG

CI-132/02 - CIC/DG

Rio de Janeiro, 07 de Outubro de 2002

Do : Coordenador da CIC (Prof. Paulo Mourão)

Ao(a) Profa. Nadia Maria Volpato

Serviço: **Faculdade de Farmácia**

Prezado Pesquisador(a),

Tendo o seu projeto de pesquisa com o título "Estudo comparativo de formulações tópica de Cetoconazol- avaliação da liberação e penetração do fármaco na pele através da técnica d "TAPESTRIPPING". (**aprovado**), estando assim cadastrado nessas Comissões **CEP** e **CIC** sob a seguintes numerações, respectivamente: **CEP:035/02 e CIC:067/02.**

Com isso, a CIC, oferece uma série de serviços ao pesquisador, incluindo confecções d slides, posters e consultoria estatística, para projetos desenvolvidos totalmente ou parcialmente n **HUCFF.**

Agradecemos o envio do projeto a esta Comissão e contamos com sua visita para qu possamos trabalhar em equipe, para o enriquecimento da pesquisa científica no Hospit Universitário Clementino Fraga Filho.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO.
FACULDADE DE FARMÁCIA.
PROGRAMA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FORMULÁRIO DE CADASTRO DE VOLUNTÁRIOS

Voluntário n°: _____

Nome:_____

Idade:_____

Sexo: □ F □ M

Telefone para contato:_____

Cor da pele: □ branca □ parda □ negra □ outra _____

Possui algum problema de pele? _____

Preferência em relação ao dia e hora para o experimento:

_____

Exame Dermatológico: _____

Rio de Janeiro, ____/____/2002.

_____

Assinatura do voluntário

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo comparativo de formulações tópicas de cetoconazol - avaliação da liberação e penetração do fármaco pela pele através da técnica de "tape stripping".

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O abaixo-assinado _____declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto supra citado, de responsabilidade da professora Nádia Maria Volpato, do laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Faculdade de Farmácia /UFRJ, com a participação da médica Dra. Lúcia Maria Azevedo - Profa. Adjunto Dermatologia-HUCFF/UFRJ. CRM-5236934-1.

O abaixo-assinado está ciente que:

- ✓ O objetivo da pesquisa é avaliar a captação (liberação e penetração) de cetoconazol pela pele através da técnica do "tape stripping" "in vivo";
- ✓ Serão aplicadas três formulações diferentes de cetoconazol creme dermatológico no voluntário, com intervalo mínimo de 15 dias entre cada aplicação, em áreas demarcadas nos antebraços direito e esquerdo. Após os tempos determinados será retirada pequena quantidade de estrato córneo, com auxílio de fitas adesivas Transpore ^{MR} (3M). O voluntário permanecerá à disposição do estudo por 5 horas, em três datas a combinar com os realizadores do estudo.
- ✓ A participação nesse estudo não acarretará nenhum benefício terapêutico.
- ✓ Cetoconazol 20 mg creme é indicado para aplicação tópica no tratamento de micoses superficiais incluindo dermatofitoses (*Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea manum* e *Tinea pedis*), candidíase cutânea e pitiriase versicolor.
- ✓ A administração tópica de cetoconazol pode provocar irritação, sensação de ardência, dermatite de contato.
- ✓ Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido estudo.
- ✓ Está livre para interromper a participação no estudo a qualquer momento.
- ✓ Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, não havendo identificação do voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

- ✓ O pesquisador responsável estará disponível nos telefones (21) 2564-7380 e (21) 2466-2724 para ulteriores esclarecimentos que se fizerem necessários.
- ✓ O investigador clínico estará disponível nos telefones 2562-2580 e 2280-7211 para esclarecimentos em caso de reações adversas relacionadas ao estudo.
- ✓ Em caso de evento adverso, o voluntário será atendido pelo pesquisador clínico na sala 05 B 11 no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ).

Rio de Janeiro, ___/___/2002.

Assinatura do voluntário	Assinatura do pesquisador responsável

Capítulo V - Liberação *in vitro* de cetoconazol das formulações semi-sólidas empregando células de difusão tipo Franz com membrana de acetato de celulose

V. 1. Introdução

Muitas doenças de pele são tratadas topicamente com fármacos dissolvidos/dispersos em preparações de consistência semi-sólida. Quando um produto é aplicado topicamente, a substância ativa deve ser liberada do veículo para entrar em contato com a superfície da epiderme e estar disponível para penetrar no EC e posteriormente, em camadas mais baixas da pele (SHAH; ELKINS; WILLIANS, 1999; REFAI; MÜLLER-GOYMANN, 2002).

A formulação tópica é um sistema complexo e a dinâmica de liberação da substância ativa de seu veículo tem sido objeto de investigação por muitos anos.

Em geral, a velocidade de liberação é influenciada pela viscosidade do meio e deve ser mais rápida em soluções do que em suspensões, cremes ou pomadas, e pode refletir o coeficiente de difusão do fármaco entre o veículo e a fase receptora (SHAH et al., 1991).

Um método simples, reprodutível, geralmente aplicado para todas as formas farmacêuticas de uso tópico, foi desenvolvido para medir a liberação *in vitro* da substância ativa presente na formulação.

Nesta metodologia pode ser empregado um modelo bicompartimental, conhecido como célula de difusão vertical, e membrana sintética. Para tal, pode-se empregar membranas artificiais como acetato de celulose, nitrato de celulose e polissulfona (HAIGH; SMITH, 1994), as quais não oferecem resistência à passagem do fármaco do compartimento doador para o compartimento receptor, proporcionando, desta forma, a quantificação do fármaco neste último, em função da partição entre o veículo e o meio aceptor. Este teste de liberação *in vitro* é recomendado pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) GUIDANCE FOR INDUSTRY (1997) como medida de equivalência para produtos de formulações semi-sólidas sujeitas a alterações especificadas pela SUPAC (*Scale-Up and Postapproval Changes*).

De acordo com SHAH; ELKINS; WILLIANS (1999), os testes de liberação *in vitro* também são empregados para monitorar a reprodutibilidade quando houver alteração na

composição da formulação, do equipamento e processo de fabricação, tamanho de lote (*scale-up/scale-down*).

Objetivando avaliar a cedência ou taxa de liberação do CTZ de formulações antimicóticas comerciais (A e B), manipulada (C) e desenvolvidas (D2:0, E1:1 e F0:2) descritas no capítulo III, foi empregado células de difusão vertical tipo Franz e membrana artificial (acetato de celulose).

V.2. Metodologia

V.2.1. Materiais e Reagentes

Todos os solventes empregados foram de grau analítico ou grau CLAE.

V.2.2. Equipamentos e Acessórios

1. Balança analítica (marca Mettler Toledo, modelo AG204);
2. Balões volumétricos de 10, 25, 50, 100 e 1000 mL (marca Quimex);
3. Bécher de 50, 100, 250 e 500 mL (marca Quimex);
4. Células de difusão tipo Franz. Dimensões: 1,13 cm^2 de orifício, 5,7 mL de altura, capacidade de 6,5 mL;
5. Membrana de acetato de celulose (marca Sigma): 27 mm de diâmetro, tamanho do poro 0,2 μm, 43 mm de espessura;
6. Membrana filtrante 0,45 μm (marca Millipore);
7. Pipetas automáticas 20, 200, 1000 e 5000 μL (marca Gilson);
8. Placa de aquecimento (marca Corning);
9. Potenciômetro (marca Digimed, modelo DM21);
10. Provetas de 50, 100, 250, 500 e 1000 mL (marca Quimex)

11. Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) isocrático (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com coluna C18 e pré-coluna (C18), um loop de 20 μL, um detector ultravioleta e integrador eletrônico.

V.2.2. Procedimento do experimento

Células de difusão vertical tipo Franz foram empregadas. Estas células consistem de um compartimento doador e um receptor, entre eles foi colocada uma membrana (figura V.1) (FRANZ, 1975). A área para difusão foi de 1,13 cm^2 e o compartimento receptor possuía um volume de 6,5 mL.

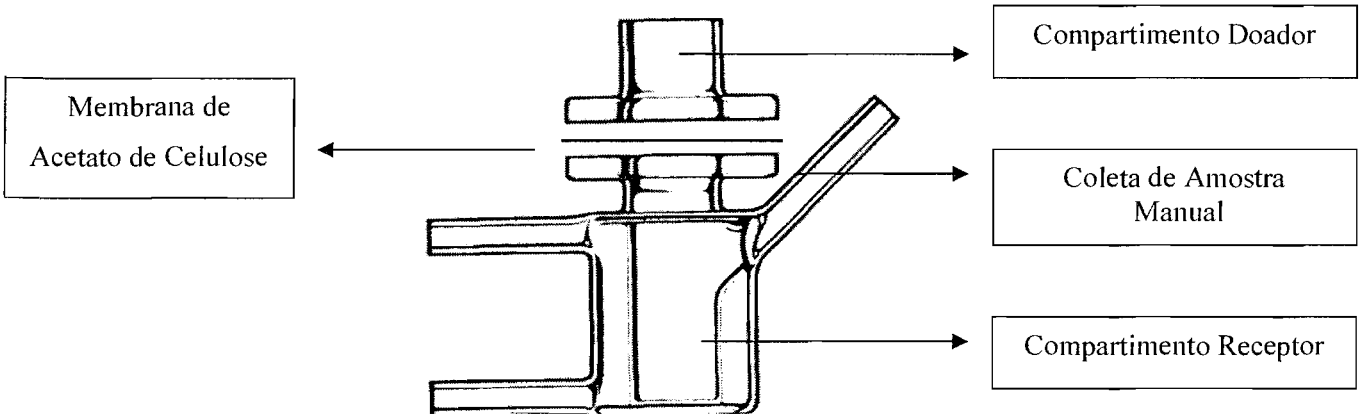


Figura V.1. – Célula de difusão tipo Franz empregada nos estudos de liberação *in vitro*.

A solução receptora empregada foi uma mistura hidro-alcoólica v/v (70:30). Este meio foi selecionado em face de baixa solubilidade do CTZ em água destilada (ca. 5 μg/mL), permitindo assim o estabelecimento de um fluxo do fármaco neste sistema, sem atingir saturação no compartimento receptor. Membranas de acetato de celulose com tamanho do poro de 0,2 μm foram submetidas à hidratação (em água a 100°C durante cinco minutos por três vezes) e montadas nas células de difusão (HAIGH; SMITH, 1994). Cada compartimento receptor foi mantido sob agitação constante (900 rpm) por meio de pequena barra magnética.

A presença de bolhas abaixo da membrana foi sempre monitorada. O sistema de difusão foi preparado 30 minutos antes da aplicação da amostra no compartimento doador (aproximadamente um grama) para efetuar o equilíbrio entre membrana e meio aceptor. Em intervalos de tempo pré-determinados, uma alíquota de 600 μL foi retirada para análise, havendo reposição do volume com solução receptora. A presença do fármaco na solução receptora foi monitorada por 3 horas. As amostras foram submetidas à análise por CLAE de acordo com as condições estabelecidas em IV.2.3. do capítulo IV.

O transporte foi expresso através do fluxo, após equilíbrio, definido como quantidade de fármaco liberado por unidade de área por tempo. Os resultados plotados nas figuras são a média ± erro padrão da média (e.p.m) de seis experimentos e os dados obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se análise de variância (ANOVA – um fator) com nível de significância (α) de 5%, com auxílio do programa Sigma Stat for Windows 1.0 (Jandel Corporation, 1994).

V.3. Resultados e Discussão

Os testes de liberação *in vitro* para produtos tópicos dermatológicos deveriam ser freqüentemente realizados empregando células de difusão, membrana sintética e meio aceptor adequado. A variável chave neste aparato inclui a membrana e a composição do meio receptor, ambos não devem influenciar o grau de liberação do fármaco da formulação em estudo (SHAH; ELKINS; WILLIANS, 1999).

A membrana sintética serve como um suporte para separar a formulação do meio receptor, devendo ser quimicamente inerte para não reagir com a formulação ou com o meio aceptor, e não deve ser velocidade limitante nos processos de liberação do fármaco, a membrana de acetato de celulose corresponde a estas prerrogativas e foi empregada em estudos de liberação *in vitro* (WISSING; MÜLLER, 2002; CSÓKA et al., 2005).

De acordo com ZATZ (1995), o fármaco deve ter solubilidade adequada no meio receptor para manter a condição *sink*. Sendo assim, na mistura hidro-alcoólica v/v (30:70) empregada, a concentração de saturação do CTZ foi de 115 μg/mL. Este meio também foi selecionado por ser compatível com a metodologia analítica empregada (CLAE). Além da proporção citada anteriormente, misturas hidro-alcoólicas 10:90 e 20:80 foram testadas e apresentaram resultados 14 e 36 μg/mL de CTZ, respectivamente, sendo menores que a empregada. Misturas hidro-alcoólicas também foram empregadas em estudos de liberação *in vitro* de produtos contendo glucocorticóides (SHAH et al., 1992) e dipropionato de betabetasona 0,5 % (SHAH; ELKINS; WILLIANS, 1999).

Na determinação da liberação *in vitro* do CTZ, uma amostra de aproximadamente 1g de cada formulação (A, B, C, D2:0, E1:1 e F0:2) foi aplicada no compartimento doador e por conseguinte, a difusão ocorreu sob condição de quantidade infinita de fármaco. Após um pequeno *lag time* inicial, o perfil de liberação foi sempre linear com o tempo, permitindo o cálculo do fluxo no estado estacionário (J_{ss}) (tabela V.1.). Os fluxos foram calculados para cada célula, por regressão linear, a partir do tempo de 60 minutos, partindo da premissa que deste ponto o equilíbrio já estaria alcançado.

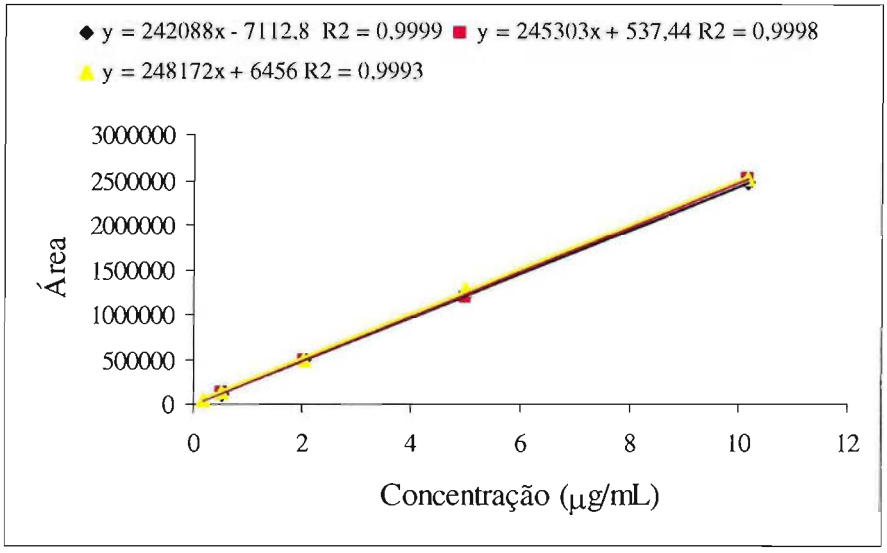
Tabela V.1. Valor do fluxo de CTZ

Formulação	Fluxo (J_{ss}) durante 3 h ($\mu g/cm^2/h$)*
A	2,41 ± 0,158
B	2,16 ± 0,085
C	5,85 ± 0,998
D(2:0)	6,28 ± 0,727
E(1:1)	7,21 ± 0,582
F(0:2)	2,49 ± 0,114

* Corresponde a média ± e.p.m. de seis unidades de ensaio.

As formulações foram avaliadas por grupos (primeiro grupo A, B e C; segundo grupo D2:0, E1:1 e F0:2) a partir de curvas padrão preparadas em cada dia de análise. A média do coeficiente de determinação (r^2) encontrado foi 0,9992 ± 0,0005 e 0,9994 ± 0,0002 (n = 6) para o primeiro e segundo grupo respectivamente, indicando manutenção da linearidade da resposta naCLAE nessas condições de análise e dentro da faixa de concentrações 0,10 – 10,00 μg/mL. O LD para a análise foi de 50 ng/mL e o LQ foi de 150 ng/mL.

A figura V.2 apresenta três curvas padrão para o CTZ, com as respectivas equações da reta e os coeficientes de determinação (r^2), obtidas em dias diferentes.



FiguraV.2. Representação gráfica de três curvas padrão do CTZ, obtidas por CLAE, na faixa de 0,50 - 10 μg/mL, em dias diferentes.

Os resultados plotados na figura V.3 são a média ± e.p.m. de seis unidades de ensaio. Estes dados indicam que a liberação do CTZ da formulação C foi maior que das formulações A e B. O produto C, obtido por manipulação através da incorporação do fármaco ao creme base aniônico, mediante levigação do mesmo em quantidade suficiente de glicerina, provavelmente apresenta boa parte do CTZ na fase externa, onde, inclusive, o fármaco pode estar sob a forma de fina suspensão.

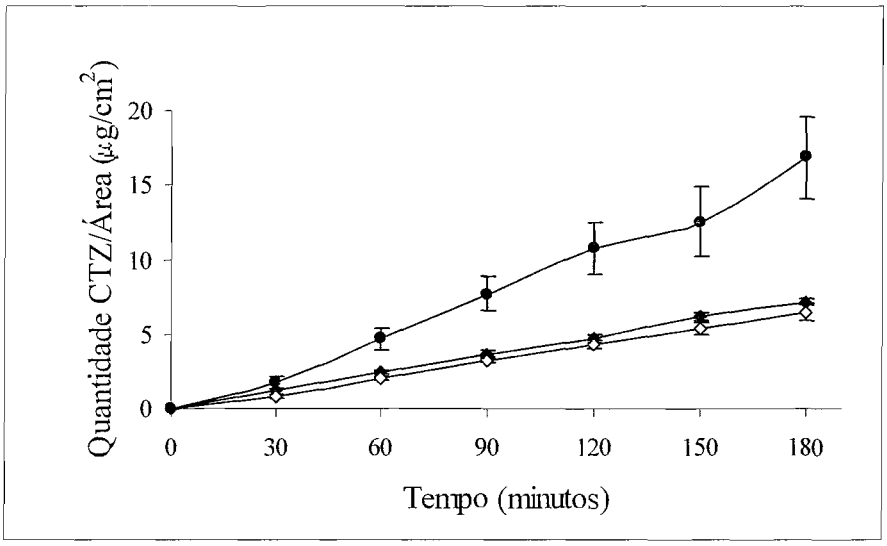


Figura V.3. – Quantidade de CTZ liberada por área. Erro de barras indica erro padrão da média (e.p.m.). ◆ = produto A; ◇ = produto B; ● = produto C.

Este procedimento de preparo associado ao somatório das propriedades individuais de cada componente da formulação resultou em maior atividade termodinâmica do fármaco por parte do produto C, nas condições experimentais, obtendo-se um fluxo duas vezes maior aos fornecidos pelas formulações A e B de preparação industrial. Nestas, provavelmente, o fármaco se encontra dissolvido na fase interna do creme (fase oleosa), dificultando a liberação do mesmo. Ambos produtos possuem os mesmos excipientes declarados na bula, ainda que o aspecto de sua espalhabilidade seja visivelmente distinto. Face aos resultados obtidos, pode-se afirmar que o produto manipulado favoreceu uma maior partição/liberação do fármaco para o meio receptor (FREITAS, 2003). As formulações A e B não são estatiscamente diferentes entre si ($p = 0,192$), para $\alpha = 0,05$.

Em decorrência dessas considerações, as formulações D2:0 e E1:1 foram preparadas com o objetivo de verificar se a incorporação do CTZ em diferentes fases da preparação poderia interferir na liberação do fármaco. Os componentes das formulações citadas acima são os mesmos, como apresentados no item III.2.1. do capítulo III. Na figura V.4, os

resultados plotados são a média ± e.p.m. de seis células. Estes dados, ao contrário do que se poderia esperar, indicam que a liberação do CTZ da formulação E1:1 apresentou maior fluxo em relação às outras duas formulações (C e D2:0), mas a diferença observada não é estatisticamente significativa ($p = 0,478$) para $\alpha = 0,05$. O fármaco incorporado à fase interna, produto D2:0, praticamente possui a mesma atividade termodinâmica que o produto C original (obtido por incorporação do fármaco ao creme base aniônico). Os valores dos fluxos estão discriminados na tabela V.1.

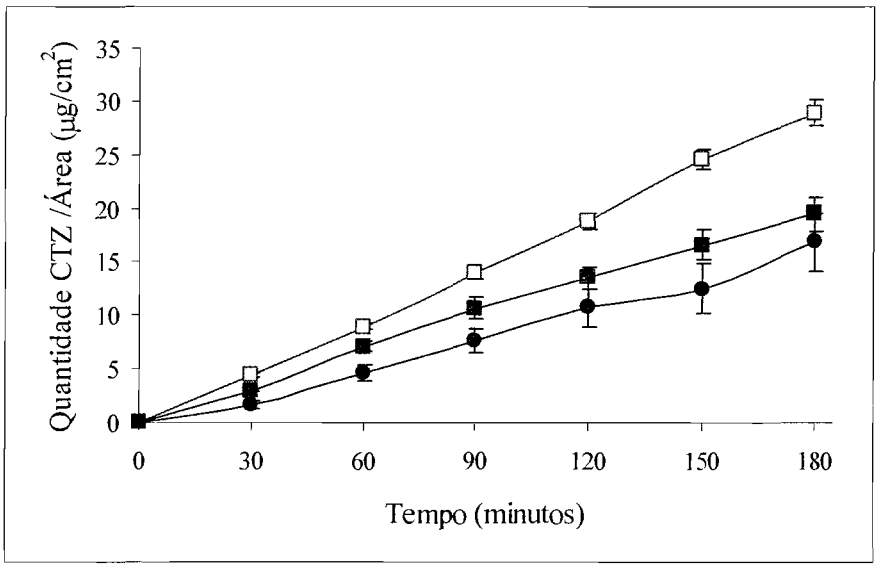


Figura V.4. – Quantidade de CTZ liberada por área. Erro de barras indica erro padrão da média (e.p.m.). ● = produto C; ■ = produto D2:0; □ = produto E1:1.

Observando os dados da figura V.4., pode-se supor então que no produto C, a presença do fármaco não necessariamente resultaria na fase externa, como especulado anteriormente, ou que a localização preferencial do ativo em uma das fases não se manifesta na realidade (esquema 1 da figura V.5.). No produto E1:1, 1% da quantidade de CTZ foi incorporado posteriormente ao creme pronto que contém 1% do ativo preferencialmente na fase interna, resultando numa melhor dispersão do fármaco nas duas fases, de forma mais homogênea e

estável, conferindo maior atividade termodinâmica ao mesmo (esquema 2 da figura V.5). No produto D2:0, 2% do CTZ foi incorporado diretamente na fase interna, uma vez que, esta fase possui características de lipofilia semelhantes à do fármaco, o que poderia dificultar a partição do fármaco para a solução receptora, e este comportamento não foi evidenciado (esquema 3 da figura V.5).

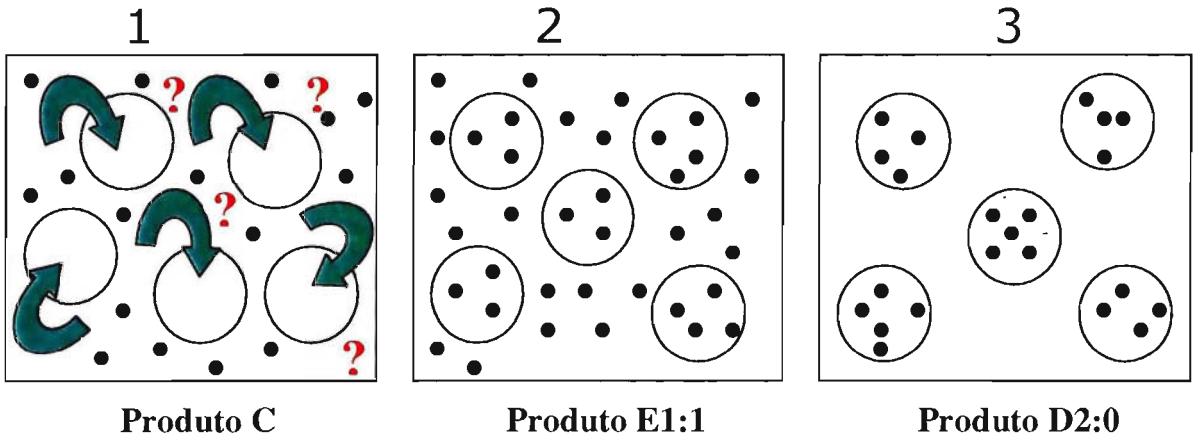


Figura V.5. - Proposta de distribuição do CTZ nas fases aquosa e oleosa das formulações C, E1:1 e D2:0. 1 = produto C; 2 = produto E1:1, 3 = produto D2:0.

Na figura V.6. estão plotados os resultados da média ± e.p.m. de seis experimentos para a terceira formulação desenvolvida, onde foi adicionado propilenoglicol e imidazolidiniluréia, visando possível aumento da biodisponibilidade do fármaco e maior estabilidade da formulação, respectivamente. Esta formulação e os produtos A e B liberam quantidades de CTZ estatisticamente iguais ($p = 0,171$), para $\alpha = 0,05$.

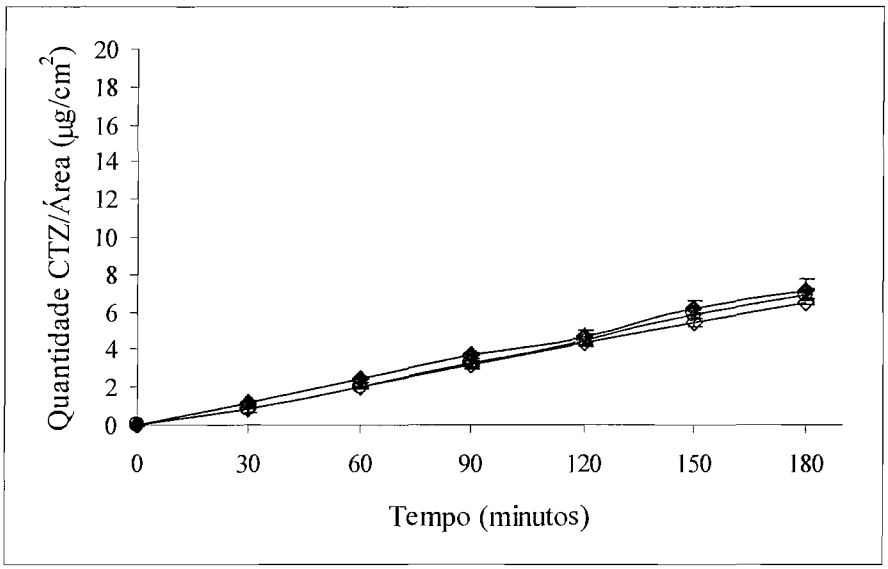


Figura V.6. – Quantidade de CTZ liberada por área. Erro de barras indica erro padrão da média (e.p.m.). ◆ = produto A; ◇ = produto B; ○ = produto F0:2.

Segundo DAVIS e KHANDERIA (1972), a atividade termodinâmica e a viscosidade têm um efeito dominante sobre a liberação da substância ativa do veículo.

De acordo com a citação de LALOR et al. (1994) sobre os estudos realizados por FLYNN e SMITH (1972), o transporte de massa de um fármaco através da membrana é diretamente dependente da atividade termodinâmica do permeante no veículo. Para composições de veículo onde o fármaco está completamente solubilizado e bem abaixo da saturação, o permeante tende a ter alta afinidade pelo veículo e não particiona em direção a membrana. Se a composição do veículo é alterada para aumentar a solubilidade do permeante, o fluxo diminui linearmente. Quando a solubilidade do fármaco na base for aumentada pela adição de propilenoglicol, seu coeficiente de partição, **Kp**, em relação ao compartimento receptor será reduzido (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). Isto explica o comportamento das formulação A, B e F0:2 sobre a liberação de CTZ.

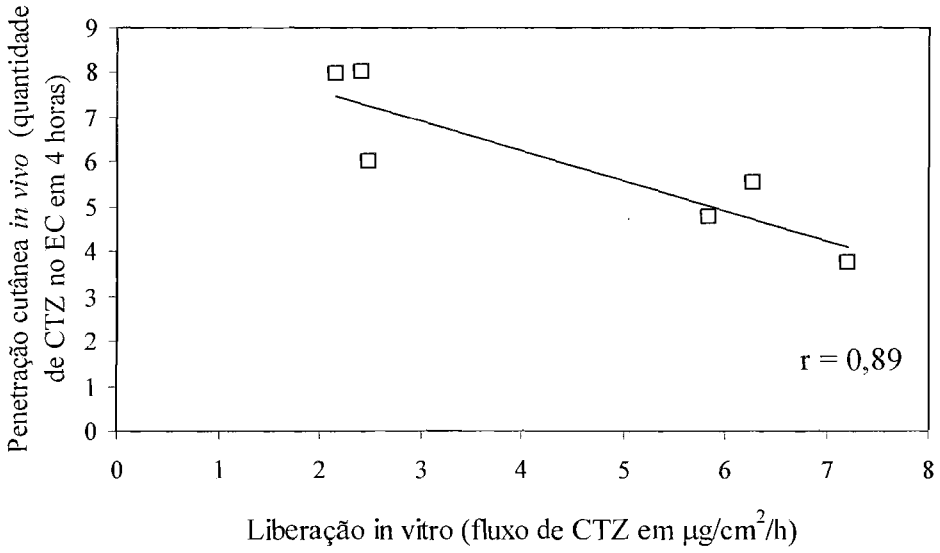
TURAKKA e ALA-FOSSI (1987) realizaram estudos para verificar a influência do propilenoglicol na solubilidade e velocidade de liberação dos fármacos hidrocortisona e

acetato de hidrocortisona em gel de carbopol; observaram menor velocidade de liberação do fármaco a medida que houve um aumento da solubilidade dos referidos fármacos. Sendo assim, o propilenoglicol na concentração de 20% aumentou a solubilidade do CTZ na formulação F(0:2), alterando sua atividade termodinâmica, por conseguinte diminuindo a velocidade de liberação do referido fármaco.

A determinação da viscosidade das formulações A, B, C, D2:0, E1:1 e F2:0 estão descritas no ítem III.2.2 do capítulo 3. De acordo com os resultados obtidos, a formulação B apresenta maior viscosidade e a E1:1 a menor. Como pode ser observado, os resultados não influenciaram o comportamento de liberação *in vitro* do CTZ dos referidos produtos.

De acordo com os resultados obtidos na liberação *in vitro* a formulação F0:2 e os produto A e B liberam quantidades de CTZ estatisticamente iguais ($p = 0,171$) para $\alpha = 0,05$. Nos estudos de captação de CTZ pelo EC, não existe diferença estatistica entre as formulações A e B, assim como entre A e F(2:0).

Em função dos resultados discutidos para a captação de CTZ pelo EC das formulações estudadas e de sua liberação *in vitro*, apresentada neste capítulo, pode-se observar uma correlação inversa ($r = - 0,89$, $p = 0,0183$ para $\alpha = 0,05$) entre o fluxo *in vitro* (obtido nas condições experimentais do trabalho) e a quantidade de ativo presente na camada mais externa da pele ao final de 240 minutos, como representado na figura V.7. As formulações A, B e F0:2 com propilenoglicol apresentaram menor taxa de partição do veículo para o meio aceptor, mas *in vivo* proporcionaram maior captação de CTZ pelo EC.



V.7. Correlação inversa entre o fluxo *in vitro* e a quantidade de ativo presente na camada mais externa da pele ao final de 240 minutos.

V.4. Conclusões

Os estudos de liberação realizados nas células de Franz com membrana de acetato de celulose permitiram verificar que:

- A incorporação do fármaco nas diferentes fases de preparo do creme não interferiu na liberação do CTZ para o meio aceptor.
- As formulações A, B e F2:0 liberam quantidades de CTZ estatisticamente iguais.
- O propilenoglicol alterou consideravelmente a atividade termodinâmica do CTZ no produto F0:2.
- Esta técnica pode ser utilizada para facilitar a seleção de novas formulações no que diz respeito a partição/liberação do fármaco.
- As formulações A, B e F0:2 com propilenoglicol apresentaram menor taxa de partição do veículo para o meio aceptor, mas *in vivo* proporcionaram maior captação de CTZ pelo EC.

V.6. Referências Bibliográficas*

CSÓKA, I.; CSÁNYI, E.; ZAPANTIS, G.; NAGY, E.; FEHÉR-KISS, A.; HORVÁTH, G.; BLAZSÓ, G.; EROS, I. *In vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies. *Int. J. Pharm.,* Amsterdam, v.291, p.11-19, 2005.

DAVIS, S.S.; KHANDERIA, M.S. Viscoelastic properties of pharmaceutical semi-solids: characterization of the plastibases for bioavailability studies. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.24, p.176-180, 1972.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia.* São Paulo: EDUSP, 2003. p.539.

FLYNN, G.L.; SMITH, R.W.J. Membrane diffusion. 3. Influence of solvent composition and permeant solubility on menbrane transport. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.61, n.1, p.61-66, 1972.

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

FREITAS, Z.M.F.; BEMVINDO, C.; SANTOS, E.P.; STORPIRTIS, S.; VOLPATO, N.M. Avaliação da cedência de cetoconazol de formulações tópicas empregando células de franz e membrana artificial. In: RIOPHARMA, 3, Rio de Janeiro, 2003. *Proceedings*. Rio de Janeiro, 2003. CD-ROM.

HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for *in vitro* diffusion experiments. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.2, p.311-330, 1994.

LALOR, C.B.; FLYNN; GORDON; WEINER, N. Formulation factors affecting release of drug from topical formulations. 1. effect of emulsion type upon *in vitro* delivery of ethyl *p*-aminobenzoate. *J. Pharm. Sci.,* Hoboken, v.83, n.1, p.1525-1528, 1994.

PERSHING, L.K.; CORLETT, J.; JORGENSEN, C. *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.38, p.90-95, 1994.

REFAI, H.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. The influence of dilution of topical semisolid preparations on hydrocortisone permeation through excised human stratum corneum. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Amsterdam, v.54, p.143-150, 2002.

SHAH, V.P.; BEHL, C.R.; FLYNN, G.L.; HIGUCHI, W.I.; SCHAEFER, H. Principles and criteria in the development and optimization of topical therapeutic products. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.81, n.10, p.1051-1054,1992.

SHAH, V.P.; ELKINS, J.; HANUS, J.; NOORIZADEH, C.; SKELLY, J.P. *In vitro* release of hydrocortisone from topical preparations and automated procedure. *Pharm. Res.*, Norwell, v.8, n.1, p.55-59, 1991.

SHAH, V.P.; ELKINS, J.S.; WILLIAMS, R.L. Evaluated of the test system used for *in vitro* release of drugs for topical dermatological drug products. *Pharm. Dev. Technol.*, Monticello, v.4, n.3, p.377-385, 1999.

TURAKKA, L.; ALA-FOSSI, N. Influence of propylene glycol on the release of hidrocortisone and its acetate ester from carbopol hydrogel. *Acta Pharm. Fenn.*, Helsinki, v.96, p.15-21, 1987.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. *Guidance for industry*: nonsterile semisolid dosage forms: scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation. Rockville, 1997. Disponível em: http://www.fda.gov/cder/guidance/1447fnl.pdf. Acesso em: 10 jun. 2000.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: *in vitro* release and *in vivo* skin penetration. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.81, p.225-233, 2002.

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

*Referências de acordo com a norma NBR 6023/39 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Capítulo VI - Penetração e permeação cutânea *in vitro* de cetoconazol das formulações empregando pele suína

VI.1. Introdução

A pele de animais de laboratório tem sido freqüentemente empregada nos experimentos de penetração/permeação *in vitro* de medicamentos, com o objetivo de extrapolar os resultados para humanos. Esta metodologia tem sido largamente empregada para estimar a permeabilidade de fármacos na pele, de modo a explicar e predizer a penetração e absorção *in vivo* de substâncias ativas de diversos tipos de formulações tópicas (DÍEZ-SALES et al., 1993; JENNING et al., 2000; SCHMOOK; MEINGASSNER; BILLICH, 2001; BLANCO et al, 2003).

A pele suína tem sido empregada nos estudos de penetração/permeação *in vitro* devido a sua similaridade com a pele humana (SEKKAT; KALIA; GUY, 2002; MEDI; SINGH, 2003). Características histológicas e bioquímicas das peles de porco e humana são comparáveis em relação à espessura e composição da epiderme, densidade dos pêlos, conteúdo dos lipídios e morfologia em geral (MEYER; SCHWARTZ; NEURAND, 1978; GRAY; YARDLEY, 1989; DICK; SCOTT, 1992; FERRY; ARGENTIERI; LOCHNER, 1995; ANDEGA; KANIKKANNAN; SINGH, 2001).

Sistema bicompartimental de difusão vertical e membrana natural (pele suína) foi empregado com o objetivo de avaliar a penetração do CTZ de formulações antimicóticas em camadas mais internas do tecido cutâneo (epiderme vivente e derme), além de investigar eventual permeação do fármaco das formulações comerciais (A e B) e desenvolvida (F0:2) descrita no capítulo III.

VI.2. Metodologia

VI.2.1. Materiais e Reagentes

Todos os solventes empregados foram de grau analítico ou grau CLAE; os reagentes empregados no preparo do tampão PBS pH 7,4 como NaCl, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 eram da marca Sigma.

VI.2.2. Equipamentos e Acessórios

1. Balança analítica (marca Mettler Toledo, modelo AG204);
2. Balões volumétricos de 10, 25, 50, 100 e 1000 mL (marca Quimex);
3. Banho termostatizado (modelo B3, marca Thermo Haake).
4. Bécher de 50, 100, 250 e 500 mL (marca Quimex);
5. Células de difusão vertical com área de superfície de 1,18 cm^2, volume de 7,0 mL e altura de 6,0 mL (marca Hanson Research);
6. Mini-centrífuga (modelo micro D, marca Fisher Scientific).
7. Pipetas automáticas 20, 200, 1000 e 5000 μL (marca Gilson);
8. Pipeta automática para semi-sólidos (modelo Transferpettor Digital 200 – 1000 μL, marca Brand);
9. Placa de aquecimento (marca Corning);
10. Potenciômetro (marca Digimed, modelo DM21);
11. Provetas de 50, 100, 250, 500 e 1000 mL (marca Quimex);
12. Sistema CLAE isocrático (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com coluna C18 (Nova Pack® C_{18} 3,9x150 mm) e pré-coluna (C18), um loop de 50 μL, um detector ultravioleta e integrador eletrônico.

VI.2.3. Preparo da pele suína

Orelhas de porco, com idade entre quatro e seis meses, foram obtidas de abatedouro. Logo após o abate, foram retiradas antes do animal prosseguir para etapa de banho quente. No menor tempo possível, foram transportadas, sob referigeração, ao laboratório, onde foram lavadas sob água corrente para remoção de manchas de sangue. A pele da parte posterior da orelha foi excisada com auxílio de bisturi e pinça e, com auxílio de tesoura e pinça, excesso de tecido adiposo foi retirado da parte inferior da pele. A seguir, pedaços de pele circulares de aproximadamente 11,0 cm^2 foram acondicionados em filme de cloreto de polivinila (PVC) com remoção de ar e devidamente etiquetados e armazenados a -20°C por no máximo quatro semanas antes do uso.

VI.2.4. Validação da metodologia de extração de CTZ da epiderme e derme suína

VI.2.4.1. Escolha da condição ótima de extração de CTZ da epiderme e derme suína

Inicialmente, segmentos de pele de um cm^2 foram imersos em água a 60°C por 60s (BHATIA; GAO; SINGH, 1997) para separação da epiderme da derme com auxílio de bisturi. Os dois estratos cutâneos (epiderme e derme) foram transferidos para tubos de Eppendorf. Os tecidos foram *spiked* com 20 μL de uma solução de CTZ a 40 μg/mL em etanol. Após a evaporação total do solvente procedeu-se a extração do fármaco, cujas condições foram modificadas, de acordo com a recuperação obtida.

1ª Etapa: extração à temperatura ambiente.

Dois sistemas de solvente foram testados: H_2O e o solvente ternário utilizado na extração das fitas adesivas, CH_3CN:CH_3OH:H_2O (40:40:20), 1500 μL de cada solvente foi adicionado em cada Eppendorf e vortexados por 30 segundos intercalados três vezes. Após a

terceira agitação no vórtex, os Eppendorfs foram centrifugados a 6400 rpm por 10 minutos em mini-centrífuga. Os testes foram realizados em triplicata.

2ª Etapa: extração com aquecimento 50°C/10 minutos.

Nesta etapa, os tecidos com os solventes de extração acima foram submetidos à temperatura de 50°C/10 minutos, com agitação em vórtex por 15 segundos intercalados duas vezes durante o aquecimento. A seguir, os Eppendorfs foram centrifugados a 6400 rpm por 10 minutos em mini-centrífuga. Os testes também foram realizados em triplicata.

VI.2.4.2. Caracterização da recuperação e precisão da extração de CTZ da epiderme e derme suína

Depois de definida a condição ótima de extração, a avaliação da exatidão expressa pela recuperação da quantidade de CTZ extraída, foi realizada em 3 níveis de quantidade de CTZ nos tecidos: 1,6; 3,2 e 6,4 μg com 3 réplicas para cada nível e 3 réplicas para o branco (tecido mais solvente). A precisão das respostas obtidas com o método escolhido foi avaliada pelo desvio padrão (s) e desvio padrão relativo (DPR) ao nível de repetitividade.

Os tecidos foram preparados como descrito no item VI.2.2. Diferentes quantidades de CTZ foram adicionados aos segmentos de um cm^2, tanto para epiderme quanto para derme:

1,6 μg: 20 μL de solução de CTZ a 80 μg/mL em etanol.

3,2 μg: 20 μL de solução de CTZ a 160 μg/mL em etanol.

6,4 μg: 20 μL de solução de CTZ a 320 μg/mL em etanol.

Cada tecido foi submetido à extração, de acordo com a condição ótima apresentada em resultados e discussão, e, posteriormente, submetida à quantificação por CLAE.

VI.2.5. Protocolo da penetração/permeação in vitro das formulações contendo CTZ

Os estudos de penetração/permeação *in vitro* do CTZ foram realizados em células de difusão vertical. A pele suína total excisada foi montada sobre a célula de difusão com o estrato córneo faceando o compartimento doador. O compartimento receptor foi preenchido com tampão PBS pH 7,4. As células foram mantidas a 37°C ± 0,5 por banho termostatizado. O líquido receptor foi mantido sob agitação constante (900 rpm) por meio de diminuta barra magnética acoplada a uma pequena hélice, a fim de assegurar sua homogeneidade (Figura VI.1) (BHATIA; GAO; SINGH,1997, RASTOGI E SINGH, 2001).

As peles permaneceram durante 1 hora em contato com o líquido receptor, permitindo, assim, a obtenção de um equilíbrio com o ambiente. A seguir, o produto foi aplicado com auxílio de pipeta automática para semi-sólidos com o objetivo de facilitar a aplicação, o compartimento doador foi preenchido cuidadosamente para evitar a formação de bolhas de ar no contato com a pele (Figura VI.1). Os experimentos foram realizados com uma amostra de aproximadamente 1g aplicada no compartimento doador e, por conseguinte a penetração e/ou permeação podem ocorrer sob condição de quantidade infinita de fármaco. Uma célula era sempre utilizada como branco, isto é, sem o produto.

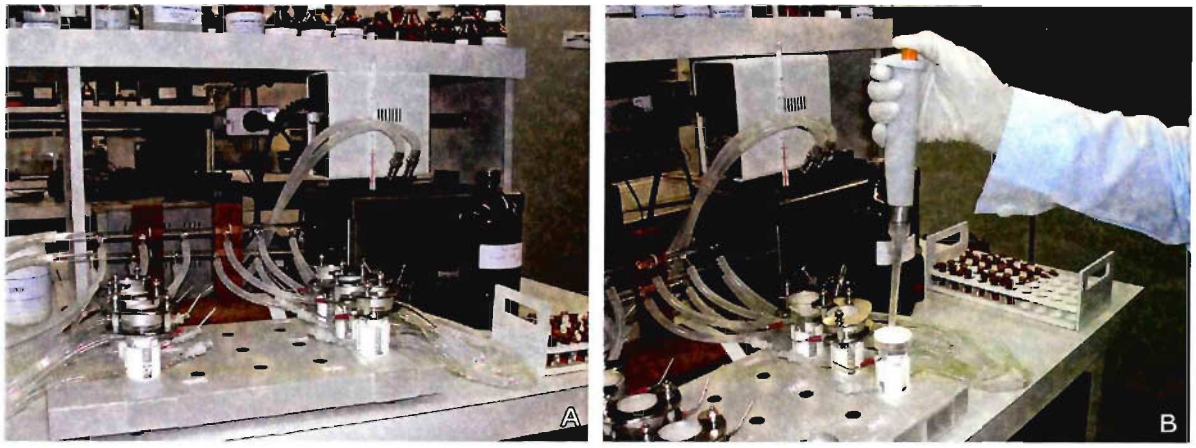


Figura VI.1 – A) Sistema empregado nos estudos de penetração/permeação *in vitro*.
B) Aplicação da amostra.

Após a aplicação da formulação, uma alíquota de 600 μL da solução receptora era retirada para análise a cada intervalo de 2 horas, havendo reposição do volume com tampão novo. A presença do fármaco no meio aceptor foi monitorada por 8 horas.

Ao término de 8 horas, o sistema foi desmontado, a pele foi retirada da célula com auxílio de uma pinça, a formulação foi removida com auxílio de algodão, a pele foi limpa com algodão umedecido e seca com algodão (três vezes). Epiderme foi separada da derme com auxílio de bisturi, conforme demonstrado na seqüência de fotos na figura VI.2.

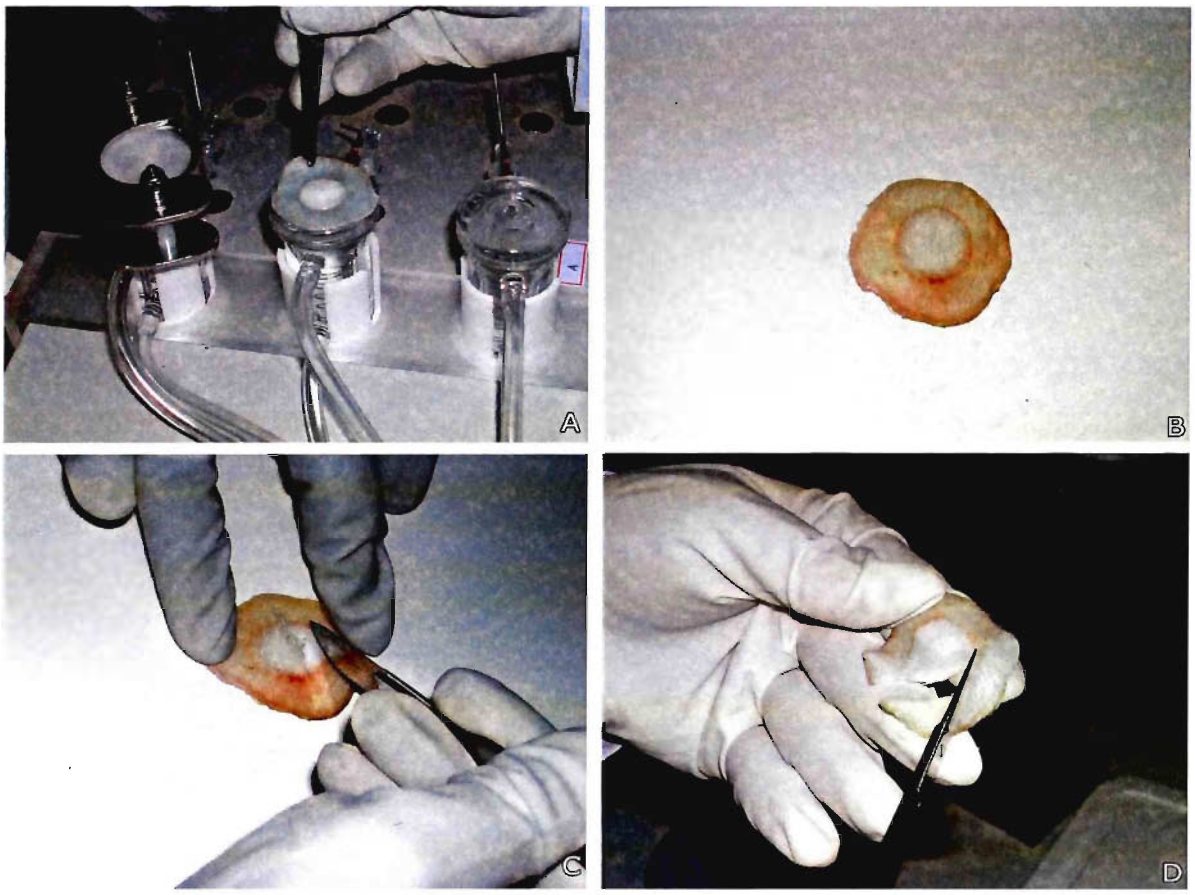


Figura VI.2. – A) Retirada do segmento de pele; B) Pele após remoção da formulação; C) Separação dos estratos cutâneos: epiderme e derme com auxílio do bisturi; D) Derme sendo recortada para processo de extração.

Epiderme e derme foram submetidas ao processo de extração de CTZ conforme apresentado em VI.2.3.

VI.3. Resultados e Discussão

VI.3.1. Validação da metodologia de extração de CTZ da epiderme e derme suína

VI.3.1.1. Escolha da condição e caracterização da seletividade, da recuperação e precisão da extração de CTZ da epiderme e derme suína

A recuperação de CTZ dos tecidos, empregando os diferentes solventes com aquecimento, apresentou aparentemente melhores rendimentos que os obtidos à temperatura ambiente. Porém, os cromatogramas resultantes da extração do CTZ submetido à temperatura de 50°C/10 minutos apresentaram interferentes em demasia, comprometendo a boa resolução do fármaco. Este fato pode estar relacionado à desintegração do tecido mediante as referidas condições.

Face a estes primeiros resultados obtidos, a condição de extração de CTZ escolhida foi o solvente ternário CH_3CN:CH_3OH:H_2O (40:40:20) com agitação em vórtex por 30 segundos intercalado com repouso de quinze minutos (duas vezes) e uma terceira agitação no vórtex sem aquecimento. A tabela VI.1. apresenta os dados de validação para este procedimento de extração de CTZ dos tecidos.

Tabela VI.1. – Recuperação média de CTZ dos tecidos (n=3)

Quantidade adicionada de CTZ (μg)	Recuperação Média de CTZ dos tecidos (%)					
	Epiderme	DP%	DPR%	Derme	DP%	DPR%
1,6	77,7	1,2	1,6	85,6	14,5	16,9
3,2	65,1	23,2	35,7	68,16	23,6	34,6
6,4	90,2	0,42	0,6	74,3	14,9	20,1

A validação da extração com o solvente ternário CH_3CN:CH_3OH:H_2O (40:40:20) apresentou uma recuperação razoável, porém a precisão não se mostrou adequada. Outrossim, a linha de base dos cromatogramas ficou um pouco alterada.. Desta forma, a validação foi repetida com uma proporção mais suavizada dos componentes orgânicos,

$CH_3CN:CH_3OH:H_2O$ (30:30:40), de modo que a amostra tivesse um poder eluente semelhante à fase móvel (HARRIS, 2001). A tabela VI.2. apresenta os dados de validação para o procedimento de extração de CTZ dos tecidos, empregando este o solvente ternário, nas mesmas condições de agitação e temperaturas anteriores.

Tabela VI.2. – Recuperação média de CTZ dos tecidos (n=3)

Quantidade adicionada de CTZ (μg)	Recuperação Média de CTZ dos tecidos (%)					
	Epiderme	DP%	DPR%	Derme	DP%	DPR%
1,6	96,4	3,1	3,21	95,9	10,8	11,34
3,2	103,64	7,61	7,4	95,49	3,9	4,1
6,4	106,9	8,51	7,9	98,2	6,4	6,51

Os resultados foram satisfatórios e no que se refere às curvas padrão de CTZ preparadas no período.

A média do coeficiente de correlação (r) encontrado foi 0,9998 ± 0,0003 para n = 3, indicando linearidade da resposta do CLAE nessas condições de análise e dentro da faixa de concentrações 0,50 – 10,00 μg/mL. O LD para a análise neste período foi de 30 ng/mL e o LQ foi de 100 ng/mL.

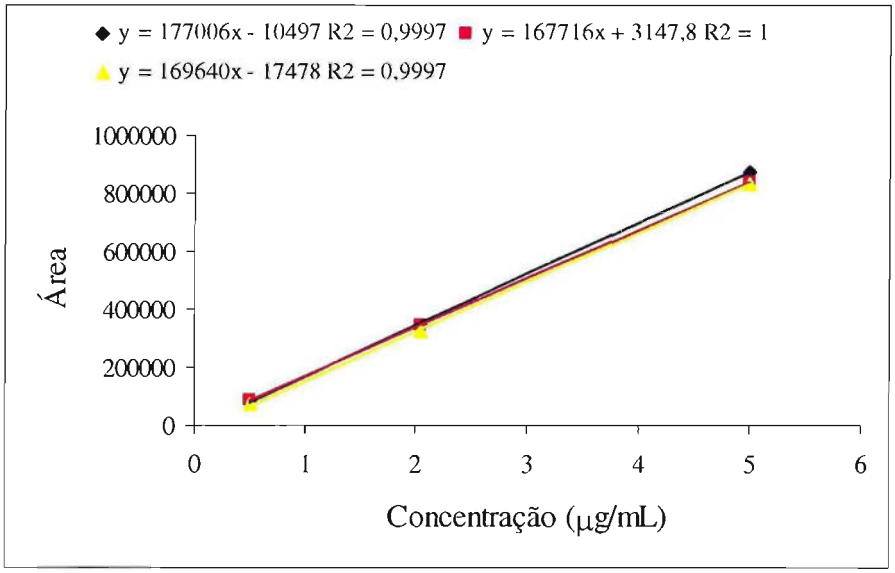


Figura VI.3 – Curva padrão de CTZ 2,0 – 10,00 μg/mL

Na figura VI.4, pode-se observar que os cromatogramas com o solvente ternário $CH_3CN:CH_3OH:H_2O$ (30:30:40) apresentaram uma boa resolução entre o sinal do CTZ e dos interferentes.

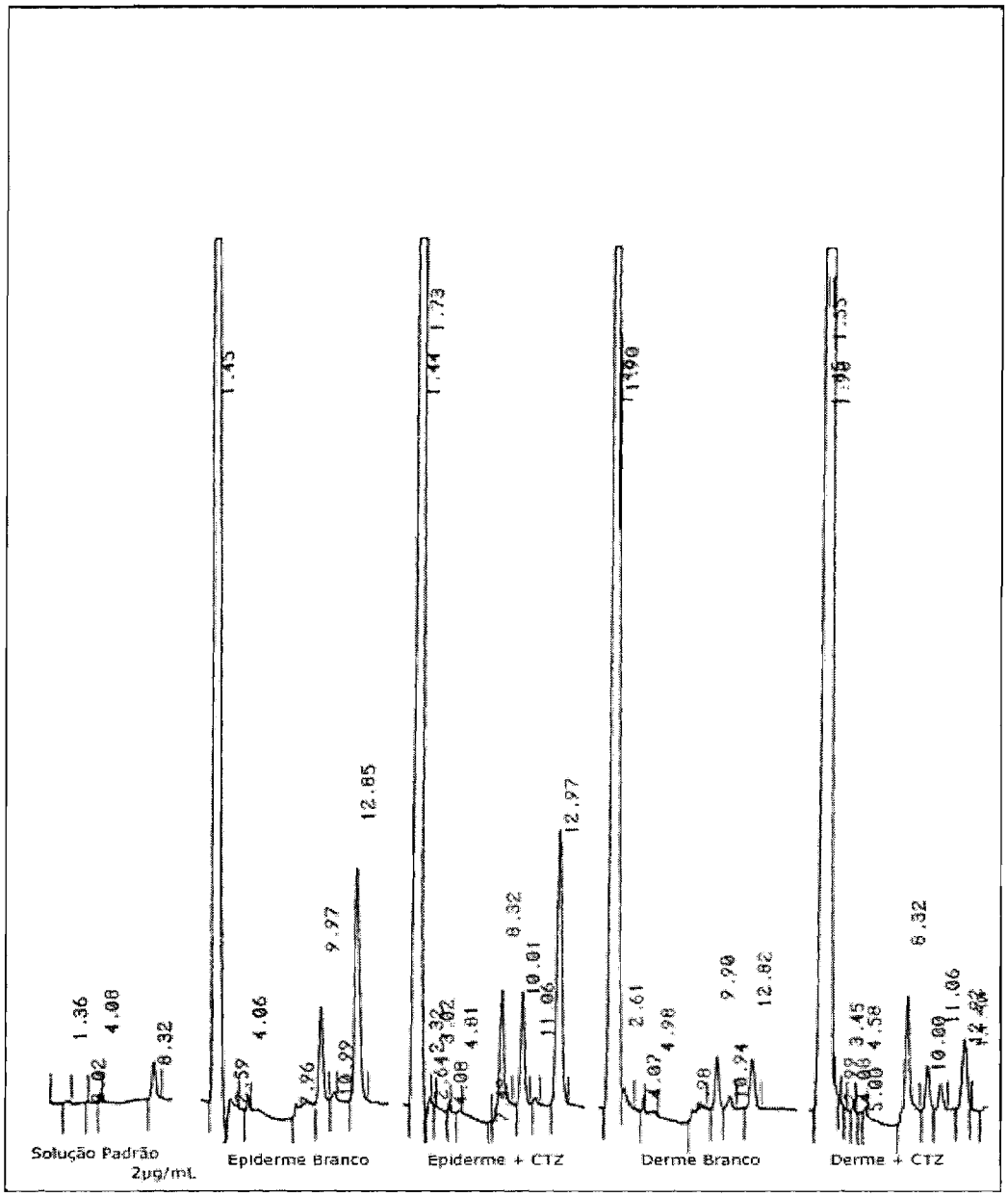


Figura VI.4. – Cromatogramas obtidos da extração de CTZ da pele suína empregando o solvente ternário CH_3CN:CH_3OH:H_2O (30:30:40). Tempo de retenção do CTZ = 8,3 min.

VI.3.2. Resultados da penetração/permeação *in vitro* das formulações contendo CTZ

As espessuras das peles suínas e humanas são muito similares. Uma espessura de aproximadamente 700µm referente à extensão do EC até a derme foi determinada para a pele

humana (TOUITOU; MEIDAN; HORWITZ, 1998). Como a pele suína apresenta uma estrutura muito semelhante à pele humana (MEYER; SCHWARTZ; NEURAND, 1978), ela é considerada adequada para representar a permeabilidade DESTA (NEUBERT; WHLRAB, 1990; SANTOYO et al., 2002) e tem sido extensivamente documentada (BHATIA; SINGH, 1998; JALÓ et al.,2001; ANDEGA; KANIKKANNAN; SINGH, 2001; MEDI; SINGH, 2003; VALENTA; JANISCH, 2003).

Durante o estudo de penetração dos produtos A, B e F0:2, cerca de 1g de cada formulação foi colocada sobre a superfície da pele no compartimento doador e uma alíquota de 600 μL foi coletada do compartimento receptor de cada célula de difusão nos intervalos de 2, 4, 6 e 8 horas.

A monitorização da presença de CTZ no compartimento receptor foi realizada objetivando verificar a permeação do referido fármaco através da pele suína. Na figura V1.5, pode-se verificar que não houve passagem da substância ativa ao compartimento receptor ao longo de 8 horas de experimento. Este comportamento foi o mesmo para todos os produtos.

Os produtos A, B e F0:2 apresentam em sua composição excipientes (item III.2.1.3. do capítulo III) capazes de promover a penetração nos estratos cutâneos, epiderme e derme, mas não se observou a permeação através destes em quantidades suficientes para que a substância ativa alcançasse o compartimento receptor.

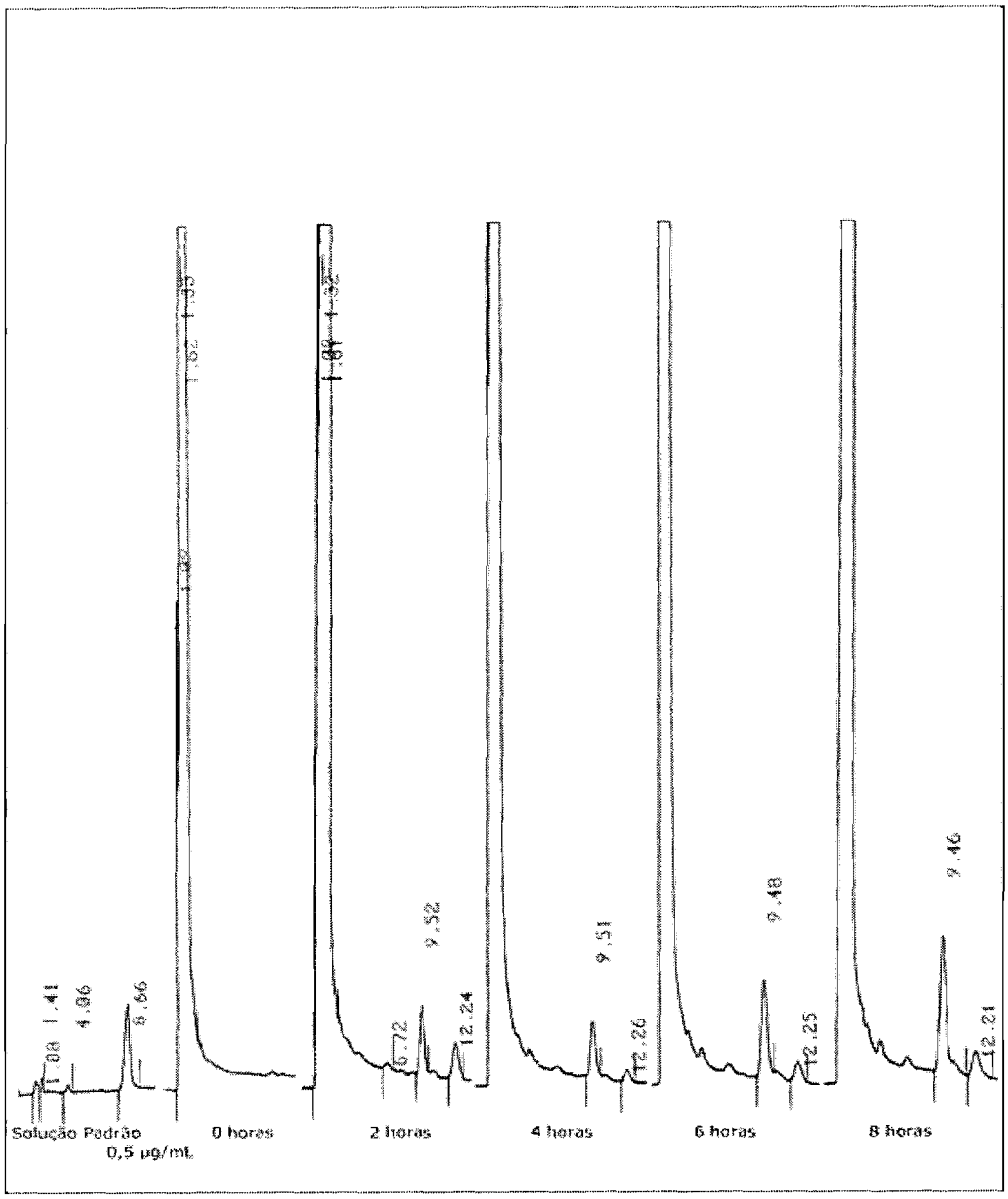


Figura VI.5. – Cromatogramas obtidos do estudo de permeação de CTZ através da pele suína ao ongo de 8 horas de experimento após aplicação do produto A. Tempo de retenção do CTZ = 8,66 min.

Ao final dos experimentos de permeação, a presença de CTZ nos estratos cutâneos foi leterminada após a separação dos mesmos, conforme descrito em V1.2.5. A figura V1.6 nostra a quantidade de CTZ detectado na epiderme e derme, 8 horas após a aplicação das formulações na pele suína, tendo como controle uma célula de difusão montada com pele suína sem formulação. A quantidade de CTZ diminuiu com a profundidade, ou seja, na

derme foi detectado valor menor para o fármaco após aplicação das formulações A, B e F(0:2).

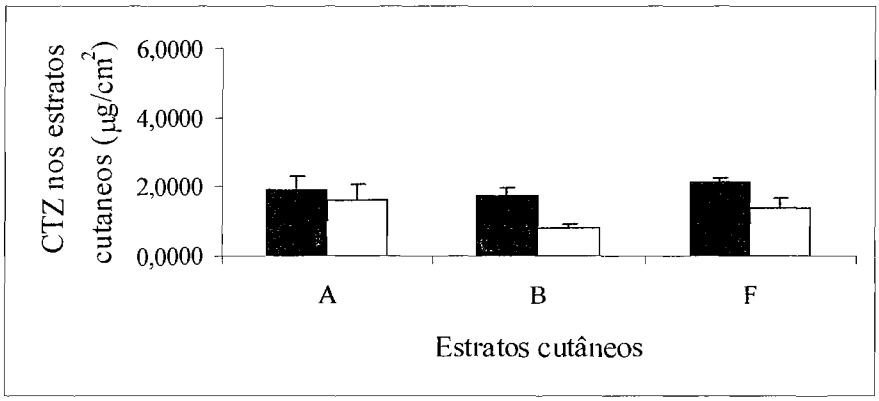


Figura V1.6. Penetração de CTZ, nas camadas da pele, seguido da aplicação dos produtos A, B e F por 8 horas. Cada ponto representa a média ± e.p.m. (n=5). ■ = epiderme e □ = derme.

Estudos de penetração realizados por AYUB (2002) empregando sistema de difusão com pele suína para avaliar o comportamento de formulações antimicóticas contendo propilenoglicol também apresentaram quantidade decrescente de fluconazol nos estratos cutâneos.

As formulações A, B e F0:2 não apresentaram um perfil de penetração cutânea na epiderme e na derme estatisticamente diferente ao nível de 5% ($p = 0,609$ e $p = 0,269$, respectivamente).

Tabela V1.3. – Quantidade de CTZ recuperada dos tecidos cutâneos (n = 5)

Produto	Quantidade de CTZ recuperada dos tecidos cutâneos (µg/cm²)	
	Epiderme	Derme
A	1,9159 ± 0,3858	1,6283 ± 0,4705
B	1,7177 ± 0,2457	0,8037 ± 0,0985
F(0:2)	2,1500 ± 0,1218	1,3800 ± 0,2706

A figura VI.7 apresenta três curvas padrão para o CTZ, com as respectivas equações da reta e os coeficientes de determinação (r^2), obtidas em dias diferentes. A análise de regressão da curva revelou linearidade adequada dentro da faixa de concentração trabalhada (0,50 – 10,00 μg/mL). O LD para a análise neste período foi de 40 ng/mL e o LQ foi de 120 ng/mL.

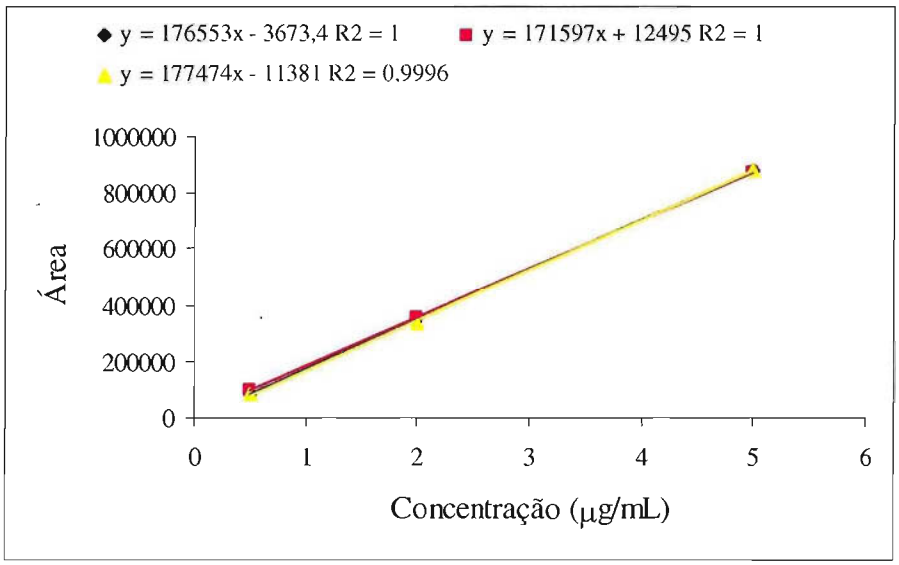


Figura VI.7. Representação gráfica de três curvas padrão do CTZ, obtidas por CLAE, na faixa de 0,50 - 10 μg/mL, em dias diferentes.

VI.4. Conclusão

- Pode-se concluir que os estudos de penetração cutânea conduzidos em pele suina mostraram que as formulações A, B e F0:2 proporcionaram quantidades estatiscamente iguais de CTZ em ambos os tecidos epiderme e derme.

VI.5. Referências Bibliográficas*

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

AYUB, A.C. Desenvolvimento de emulsões O/A contendo fluconazol para o tratamento tópico de micoses superficiais: avaliação da penetração cutânea e absorção percutânea. Belo Horizonte, 2002. 87p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais.

BATHIA, K.S.; GAO, S.; SINGH, J. Effect of penetration enhancers and iontophoresis in the FT-IR spectroscopy and LHRH permeability through porcine skin. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.47, p.81-89, 1997.

BATHIA, K.S.; SINGH, J. Mechanism of transport enhancement of LHRH through porcine epidermis by terpenes and iontophoresis:permeability and lipid extraction studies. *Pharm. Res.*, Norwell, v.15, p.1857-1862, 1998.

BLANCO, M.D.; BERNARDO, M.V.; TEIJÓN, C.; SASTRE, R.L.; TEIJÓN, J.M. Transdermal application of bupivacaine-loaded poly(acrylamide(A)-co-monomethyl itaconate) hydrogels. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.255, p.99-107, 2003.

DICK, I.P.; SCOTT, R.C. Pig ear skin as an *in vitro* model for human skin permeability. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.44, p.640-645, 1992.

DÍEZ-SALES, O.; PÉREZ-SAYAS, E.; MARTÍN-VILLODRE, A.; HERRÁEZ-DOMÍNGUES, M. The prediction of percutaneous absorption. I. Influence of the dermis on *in vitro* permeation models. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.100, p.1-7, 1993.

FERRY, L.L.; ARGENTIERI, G.; LOCHNER, D.H. The comparative histology of porcine and guinea pig skin with respect to iontophoretic drug delivery. *Pharm. Acta Helv.*, Zurich, v.70, p.43-56, 1995.

GRAY, G.M.; YARDLEY, H.J. Lipid composition of cells isolated from pig, human and rat epidermis. *J. Lipid Res.*, Birmingham, v.16, p.434-439, 1989.

HARRIS, D.C. *Análise química quantitativa*. 5.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2001. p.619.

JALÓN, G.A.E.; BLANCO-PRÍETRO, M.J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. PGLA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.226, p.181-184, 2001.

JENNING, V.; GYSLER, A.; SCHÄFER-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.*, Amsterdam, v.49, p.211-218, 2000.

MEDI, B.M.; SINGH, J. Electronically facilitated transdermal delivery of human parathyroid hormone (1-34). *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.263, p.25-33, 2003.

MEYER, W.; SCHWARTZ, R.; NEURAND, K. The skin of domestic mammals as a model for human skin with special reference to the domestic pig. *Curr. Probl. Dermatol.*, Basel, v.7, p.39-52, 1978.

NEUBERT, R.; WOHLRAB, W. *In vitro* methods for the biopharmaceutical evaluation of topical formulations. *Acta Pharm. Technol.*, Stuttgart, v.36, n.4, p.197-206, 1990.

RASTOGI, S.K.; SINGH, J. Lipid extraction and transport of hydrophilic solutes through porcine epidermis. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.225, p.25-33, 2003.

SANTOYO, S.; DE JALÓN, E.G.; YGARTUA, P.; RENEDO, M.J.; BLANCO-PRÍETRO, M.J. Optimization of topical cidofovir penetration using microparticles. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.242, n.1/2, p.107-113, 2002.

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

SEKKAT, N.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Biophysical study of porcine ear *in vitro* and its comparison to human *in vivo*. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.91, n.11, p.2376-2381, 2002.

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

VALENTA, C.; JANISCH, M. Permeation of cyproterone acetate through pig skin from different vehicles with phospholipids. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.258, p.133-139, 2003.

*Referências de acordo com a norma NBR 6023/39 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Conclusão geral

Conclusão geral:

- Os estudos de liberação *in vitro* realizados nas células de Franz com membrana de acetato de celulose permitiram verificar o quanto às formulações liberam o fármaco em questão. Esta técnica pode ser utilizada na seleção de novas formulações no que diz respeito à partição/liberação do fármaco.
- Os estudos empregando células de difusão com membrana natural (pele suína) mostraram que o modelo pode ser utilizado para predizer a penetração e permeação *in vivo* de substâncias ativas de diversos tipos de formulações tópicas.
- A técnica *tape stripping* empregando fita adesiva viabilizou a captação e quantificação do CTZ no EC, podendo ser empregada nos estudos de bioequivalência de formulações antimicóticas semi-sólidas para uso tópico.