UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA LIBERAÇÃO, PENETRAÇÃO E
RETENÇÃO CUTÂNEAS DE CICLOPIROX OLAMINA EM
FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO**

DANIELA SERIKAKU

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Dr^a Vladi Olga Consiglieri

**São Paulo
2006**

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011564

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

S485a Serikaku, Daniela
Avaliação *in vitro* da liberação, penetração e retenção cutâneas
de ciclopírox olamina em formulações de uso tópico / Daniela
Serikaku -- São Paulo, 2006.
193p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Consiglieri, Vladi Olga

1. Formulações farmacêuticas 2. Doenças da pele
3. Antifúngicos : Farmacodinâmica I. T. II. Consiglieri,
Vladi Olga, orientador

615.4 CDD

DANIELA SERIKAKU

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA LIBERAÇÃO, PENETRAÇÃO E
RETENÇÃO CUTÂNEAS DE CICLOPIROX OLAMINA EM
FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientador/Presidente

1°. Examinador

2°. Examinador

São Paulo, Abril de 2006.

À Minha Família,

*Para meu pai Nelson, minha mãe
Yoko e minhas irmãs Ana e Paula:
Sem vocês, não seria possível a
realização deste trabalho.
Sem vocês, jamais teria conseguido
chegar tão longe.
Sem vocês, jamais seria quem eu sou.*

Muito obrigada a vocês todos!

A Hamilton G. Rossi,

Amor intenso, forte, eterno!

Amor com carinho,

Amor com paixão,

Simplesmente, amor!!

Amor para sempre!!

Te amo!!

Pura e simplesmente...

Simplesmente, eternamente.

Muito obrigada pelo seu amor, carinho e apoio!

À Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri,

*Pela grande oportunidade de
realização deste trabalho e
crescimento na área científica,
Pela amizade e paciência,
Pela orientação dedicada e valiosa*

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mitsuko Taba Ohara pela paciência, grande apoio e incentivo.

Aos professores Dra. Telma M. Sakuda, Dra. Gislaine Ricci Leonardi, Dra. Patrícia Santos Lopes e Dr. José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho pela grande contribuição e pelas valiosas sugestões que possibilitaram grande enriquecimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz, pela amizade de sempre.

À Dra. Meire Y. Fushimi, Dra. Sueli Higa, Dra. Solange Santos e Dr. Reginaldo Batista dos Laboratórios Stiefel Ltda., pela grande oportunidade de crescimento profissional, pela colaboração e confiança.

A todos os colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Formulação, Processos e CT&S dos Laboratórios Stiefel Ltda.

À Leila Aparecida Bonadio, pela revisão das referências bibliográficas.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
REVISÃO DA LITERATURA	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 ESTRUTURA, COMPOSIÇÃO E FUNÇÃO DA PELE	9
2.1 Epiderme	10
2.2 Derme	14
2.3 Hipoderme ou Tecido Subcutâneo	15
2.4 Apêndices da pele	15
2.5 Vasos sanguíneos, inervação e músculos da pele	17
3 VIAS DE PENETRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATRAVÉS DA PELE	19
3.1 Via apêndice	21
3.2 Via transcelular	22
3.3 Via intercelular	23
4 DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS PARA USO TÓPICO	24
5 FATORES FÍSICO-QUÍMICOS DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE SUBSTÂNCIAS	26
6 MÉTODOS EMPREGADOS PARA AUMENTO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA	29
6.1 Métodos Químicos – Uso de Promotores de Penetração	29
6.2 Métodos Farmacotécnicos	42
6.2.1 Aumento do grau de saturação do fármaco na formulação	42
6.2.2 Sistemas de liberação	45
6.2.2.1 Ceramidas	45
6.2.2.2 Lipossomas	45
6.2.2.3 Cristais Líquidos	47
6.2.2.4 Ciclodextrinas	49
6.2.2.5 Microcápsulas	51
6.2.2.6 Microemulsões, Emulsões Múltiplas e Nanoemulsões	51
6.3 Métodos Físicos	52
6.3.1 <i>Stripping</i> do estrato córneo	52
6.3.2 Hidratação do estrato córneo	53
6.3.3 Iontoforese	53

6.3.4 Sonoforese	54
6.3.5 Eletroporização ou eletroporação	55
6.4 Métodos Invasivos	55
7 FATORES QUE INFLUENCIAM A LIBERAÇÃO/PENETRAÇÃO CUTÂNEA	56
7.1 Pele	56
7.2 Fármaco	57
7.3 Veículo	58
8 MÉTODOS EMPREGADOS NA AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO/PENETRAÇÃO	60
8.1 Métodos <i>in vitro</i> de liberação/penetração de fármacos	60
8.1.1 Aparelhos utilizados nos métodos de difusão <i>in vitro</i>	63
8.1.2 Membranas utilizadas nos estudos de liberação/penetração <i>in vitro</i>	66
8.1.2.1 Membranas sintéticas	66
8.1.2.2 Membranas naturais	68
8.1.2.3 Membranas obtidas por engenharia de tecidos	76
8.1.3 Temperatura	80
8.1.4 Solução receptora	80
8.1.5 Análise e interpretação dos resultados	81
9 ESTUDOS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE AGENTES ANTIFÚNGICOS	82
10 MICOSES SUPERFICIAIS	83
10.1 Aspectos gerais	83
11 CICLOPIROX OLAMINA	84
11.1 Descrição	84
11.2 Mecanismo de ação	85
11.3 Toxicologia	86
11.4 Farmacocinética	87
11.4.1 Penetração na pele e absorção	87
11.4.2 Distribuição	88
11.4.3 Metabolismo e excreção	88
11.5 Efeitos adversos	89
11.6 Ação antiinflamatória	89
11.7 Dosagem e administração	90
11.8 Propriedades físico – químicas	90
MATERIAL E MÉTODOS	92
1 MATERIAL	93
1.1 Fármaco	93

1.2 Solventes, Reagentes e Matérias-primas	93
1.3 Equipamentos, Acessórios e Vidraria	94
1.4 Membranas	95
2 MÉTODOS	96
2.1 Preparo das formulações	96
2.1.1 Fórmula da loção base	96
2.2 Estudo de estabilidade física das formulações testadas	98
2.2.1 Condições de estocagem e frequência de amostragem	98
2.2.2 Testes preliminares de estabilidade	98
2.2.2.1 Ensaio organolépticos	98
2.2.2.2 Determinação do valor de pH	98
2.3 Determinação quantitativa de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência	99
2.4 Adequação do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência para os estudos de liberação, permeação e retenção cutâneas	99
2.4.1 Pesquisa de interferentes da solução receptora	99
2.4.2 Pesquisa de interferentes do estrato córneo (<i>tape stripping</i>)	99
2.4.3 Pesquisa de interferentes da epiderme e derme	100
2.5 Validação do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência	100
2.5.1 Especificidade	100
2.5.2 Determinação da linearidade do método	102
2.5.3 Exatidão	102
2.5.4 Precisão	102
2.5.5 Robustez	103
2.5.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	104
2.5.6.1 Limite de Detecção	104
2.5.6.2 Limite de Quantificação	104
2.6 Testes de solubilidade para determinação da solução receptora	105
2.6.1 Preparo da solução receptora tampão fosfato pH 7.4 – 10mM isotônica	105
2.6.2 Determinação da solubilidade de ciclopirox olamina na solução receptora	106
2.7 Estudo de liberação <i>in vitro</i> em células de difusão utilizando membrana sintética de éster de celulose	106
2.8 Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i> em células de difusão utilizando pele de porco dermatomizada	106
2.8.1 Obtenção das membranas naturais	107
2.8.2 Preparo do equipamento (Hanson – Microette®)	108
2.9 Estudo <i>in vitro</i> de retenção cutânea	109

2.9.1 <i>Tape Stripping</i>	109
2.9.2 Retenção na epiderme e derme	110
2.10 Análise de resultados	110
2.10.1 Cálculos da quantidade real de fármaco no ensaio de permeação	110
2.10.2 Expressão dos resultados e análise estatística	111
2.11 Qualificação do equipamento empregado nos ensaios de liberação e penetração cutânea	112
2.11.1 Controle da regulação térmica do sistema	113
2.11.2 Qualificação de operação do equipamento	113
2.11.2.1 Teste de programação do controlador SIP	114
2.11.2.2 Velocidade de rotação das células de difusão	115
2.11.2.3 Volume de amostragem	116
2.11.2.4 Verificação do relógio interno do equipamento (<i>Timer</i>) de amostragem automática	117
RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
1 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES TESTADAS	119
1.1 Descrição dos componentes da formulação	119
1.2 Ensaios organolépticos	119
1.3 Determinação do valor de pH	121
2 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CICLOPIROX OLAMINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	124
3 ADEQUAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE CICLOPIROX OLAMINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA OS ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEAS	124
3.1 Pesquisa de interferentes da solução receptora	124
3.2 Pesquisa de interferentes do estrato córneo (<i>tape stripping</i>)	126
3.3 Pesquisa de interferentes da epiderme e derme	126
4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE CICLOPIROX OLAMINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	128
4.1 Especificidade	128
4.2 Determinação da linearidade do método	133
4.3 Exatidão	134
4.4 Precisão	135
4.5 Robustez	136
4.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	137
4.6.1 Limite de detecção	137
4.6.2 Limite de Quantificação	137

5 TESTES DE SOLUBILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DA SOLUÇÃO RECEPTORA	138
6 ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> EM CÉLULAS DE DIFUSÃO UTILIZANDO MEMBRANA SINTÉTICA DE ÉSTER DE CELULOSE	140
7 ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA	142
7.1 Fórmula de loção base e fórmulas A, B e C	142
8 ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE RETENÇÃO CUTÂNEA	144
8.1 <i>Tape Stripping</i>	144
8.2 Retenção na epiderme e derme	147
9 QUALIFICAÇÃO DO EQUIPAMENTO EMPREGADO NOS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO CUTÂNEA	152
9.1 Controle da regulação térmica do sistema	152
9.2 Qualificação de operação	154
9.2.1 Teste de programação do controlador SIP	154
9.2.2 Velocidade de rotação das células de difusão	155
9.2.3 Volume de amostragem	156
9.2.4 Verificação do relógio interno do equipamento (<i>Timer</i>) de amostragem automática	160
CONCLUSÃO	161
APÊNDICE	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele, apêndices e sistema vascular	10
Figura 2. As quatro camadas da epiderme	11
Figura 3. As quatro camadas da epiderme	14
Figura 4. Glândula sudorípara	16
Figura 5. Folículo piloso	17
Figura 6. Principais vias de penetração de substâncias através do estrato córneo	19
Figura 7. Vias de penetração de substâncias através do estrato córneo: via intercelular e via transcelular	20
Figura 8. Otimização da performance do produto durante a fase de desenvolvimento	25
Figura 9. Prováveis sítios de ação de promotores de penetração nos domínios lipídicos intercelulares do estrato córneo	31
Figura 10. Esquema da bicamada lipídica do estrato córneo sob ação de terpenos	39
Figura 11. Estrutura molecular da Ceramida 2	45
Figura 12. Estrutura da ciclodextrina e formação de complexos de inclusão	49
Figura 13. Esquema da célula de difusão para estudos de liberação/penetração <i>in vitro</i>	61
Figura 14. Célula de difusão de fluxo contínuo para estudos de liberação/penetração <i>in vitro</i>	64
Figura 15. Equipamento de penetração cutânea Microette® com 6 células de difusão	65
Figura 16. Orelha de porco obtida após abate do animal	107
Figura 17. Pele de porco dissecada e fixada em suporte de isopor	107
Figura 18. Dermatômização de pele de porco	108
Figura 19. <i>Tape stripping</i> do estrato córneo	110
Figura 20. Sistema de amostragem automática Microette®	112

Figura 21. Controlador SIP do sistema de amostragem automática Microette®	114
Figura 22. Cromatograma do padrão de ciclopirox olamina em metanol .	124
Figura 23. Cromatograma da solução receptora, tampão fosfato pH 7,4, 10mM, sem a presença do fármaco	125
Figura 24. Cromatograma da solução de estrato córneo (EC) em metanol do teste de <i>tape stripping</i>	126
Figura 25. Cromatograma da solução da epiderme e derme em metanol	127
Figura 26. Cromatograma da solução de amostra controle de ciclopirox olamina. Tempo de retenção, 5 minutos	129
Figura 27. Cromatograma da solução de placebo de ciclopirox olamina	129
Figura 28. Cromatograma da solução de amostra de ciclopirox olamina exposta à luz	130
Figura 29. Cromatograma da solução de placebo de ciclopirox olamina exposta à luz	130
Figura 30. Cromatograma de solução de amostra de ciclopirox olamina com exposição ao calor	130
Figura 31. Cromatograma da solução de placebo de ciclopirox olamina com exposição ao calor	131
Figura 32. Cromatograma da solução de amostra de ciclopirox olamina após oxidação	131
Figura 33. Cromatograma da solução de placebo de ciclopirox olamina após oxidação	131
Figura 34. Cromatograma da solução de amostra de ciclopirox olamina após tratamento ácido	132
Figura 35. Cromatograma da solução de placebo de ciclopirox olamina após tratamento ácido	132
Figura 36. Cromatograma da solução de amostra de ciclopirox olamina após tratamento básico	132
Figura 37. Cromatograma da solução de placebo de ciclopirox olamina após tratamento básico	133

Figura 38. Reta de calibração de soluções do padrão de ciclopirox olamina, nas concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL, em metanol, a 300 nm	134
Figura 39. Perfil de liberação de ciclopirox olamina na formulação base, com membrana de éster de celulose	141
Figura 40. Cromatograma da amostra de solução receptora coletada do teste de permeação cutânea <i>in vitro</i> da fórmula de loção base de ciclopirox olamina	142
Figura 41. Cromatograma da amostra de solução receptora coletada do teste de permeação cutânea <i>in vitro</i> da fórmula A, 15% de propilenoglicol	143
Figura 42. Cromatograma da amostra de solução receptora coletada do teste de permeação cutânea <i>in vitro</i> da fórmula B, 15% etoxidiglicol	143
Figura 43. Cromatograma da amostra de solução receptora coletada do teste de permeação cutânea <i>in vitro</i> da fórmula C, 5% ácido oléico	143

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Diferenças na espessura da pele humana e de animais	70
Tabela 2 – Densidade e tamanho dos folículos pilosos da pele humana e de animais	70
Tabela 3 – Parâmetros do método e valores avaliados	103
Tabela 4 – Condições experimentais para o teste de robustez do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência	104
Tabela 5 – Aspecto físico da fórmula de loção base de ciclopirox olamina, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60 e 75%	120
Tabela 6 – Aspecto físico da fórmula A, 15% de propilenoglicol, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60/75%	120
Tabela 7 – Aspecto físico da fórmula B, 15% de etoxidiglicol, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60/75%	121
Tabela 8 – Aspecto físico da fórmula C, 5% de ácido oléico, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60/75%	121
Tabela 9 – Valores de pH da fórmula de loção base, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60/75%	122
Tabela 10 – Valores de pH da fórmula A, 15% de propilenoglicol, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60/75%	122
Tabela 11 – Valores de pH da fórmula B, 15% de etoxidiglicol, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60/75%	122
Tabela 12 – Valores de pH da fórmula C, 5% de ácido oléico, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60/75%	123
Tabela 13 – Resultados dos experimentos de especificidade do método de quantificação de ciclopirox olamina (%p/p) por cromatografia líquida de alta eficiência	128

Tabela 14 – Resultados dos experimentos de especificidade do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência. % (p/p) de piridona	129
Tabela 15 – Acuracidade do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência, a 50%, 100% e 150% da concentração nominal	134
Tabela 16 – Resultado do ensaio de precisão do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência	135
Tabela 17 – Resultados do ensaio de robustez do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência	136
Tabela 18 – Sinais encontrados e utilizados para cálculo de limite de detecção do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência	137
Tabela 19 – Solubilidade de ciclopirox olamina em solução tampão fosfato pH 7.4, 10 mM	138
Tabela 20 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de solução receptora do teste de liberação <i>in vitro</i> da formulação base, utilizando células de difusão e membranas sintéticas	140
Tabela 21 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/cm}^2$) nas amostras de solução receptora do teste de liberação <i>in vitro</i> da formulação base, utilizando células de difusão e membranas sintéticas	141
Tabela 22 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de <i>tape stripping</i> da formulação de loção base	145
Tabela 23 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de <i>tape stripping</i> da fórmula A	145
Tabela 24 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de <i>tape stripping</i> da fórmula B	146
Tabela 25 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de <i>tape stripping</i> da fórmula C	147
Tabela 26 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de retenção na epiderme e derme da formulação de loção base	148

Tabela 27 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de retenção na epiderme e derme da fórmula A, 15% de propilenoglicol	148
Tabela 28 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de retenção na epiderme e derme da fórmula B, 15% de etoxidiglicol	149
Tabela 29 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de retenção na epiderme e derme da fórmula C, 5% de ácido oléico	149
Tabela 30 – Temperaturas dos sensores (S1 a S9) posicionados no lado A do equipamento Microette® durante monitoramento do controle térmico do sistema	153
Tabela 31 – Temperaturas dos sensores (S1 a S9) posicionados no lado B do equipamento Microette® durante monitoramento da qualificação térmica do sistema	153
Tabela 32 – Resultados do teste de programação do controlador SIP.....	154
Tabela 33 – Velocidade de agitação nas células de difusão	155
Tabela 34 – Volume de amostragem de 0,5 mL	157
Tabela 35 – Volume de amostragem de 1,0 mL	158
Tabela 36 – Volume de amostragem de 1,5 mL	159
Tabela 37 – Comparação entre os tempos totais do cronômetro padrão e do relógio interno do equipamento (<i>Timer</i>)	160

LISTA DE ABREVIATURAS

J – densidade de fluxo por unidade de área
 D_m – coeficiente de difusão
 $c_{s,m}$ – solubilidade do permeante na membrana
 c_v - concentração do permeante no veículo
 $c_{s,v}$ – solubilidade do permeante no veículo
EC – estrato córneo
 L – espessura da membrana
DMSO – dimetil sulfóxido
DMAC - dimetilacetamida
DCMS - decilmetilsulfóxido
DMF - dimetilformamida
NMP – N-metil-2-pirrolidona
2P – 2-pirrolidona
CDs – ciclodextrinas
A/O – água em óleo
O/A – óleo em água
A/O/A – água em óleo em água
FDA – Food and Drug Administration
CIM – Concentração Inibitória Mínima
 Q_{real} – quantidade real de fármaco permeada
 $C_{mensurada,t}$ – concentração determinada no tempo t
 V_r – volume da célula de difusão
 V_a – volume de amostra removido
 C_a – concentração da amostra removida
d - densidade
m - massa
v - volume
UR – umidade relativa

RESUMO

Para que um produto de aplicação tópica apresente o efeito terapêutico é necessário que o fármaco seja liberado de seu veículo e atravesse a barreira do estrato córneo, atingindo seus sítios de ação nas camadas da pele nas quais o efeito é esperado. Os estudos de penetração cutânea *in vitro*, utilizando células de difusão de Franz modificadas, podem fornecer resultados úteis quanto à eficácia do produto. As dermatofitoses são micoses superficiais. São manifestações crônicas e resistentes ao tratamento, fato que se explica não só em decorrência da própria natureza destas afecções como também devido à baixa penetração de fármacos antimicóticos na pele. Dentre os antifúngicos disponíveis na terapêutica, ciclopirox olamina é uma substância que tem demonstrado elevada eficácia no tratamento de dermatofitoses. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver formulações de uso tópico contendo 0,5% de ciclopirox olamina e avaliar a performance dessas formulações. Foi possível obter formulações estáveis fisicamente, contendo promotores de penetração cutânea. O sistema de amostragem automática utilizado para realização dos experimentos foi qualificado e apresentou-se em condições adequadas.

ABSTRACT

In order to present the pharmacological effect, a topical product must release the pharmaceutical active ingredient from its vehicle and this active must pass through the stratum corneum barrier, reaching the target layer of the skin, where its effect is desired. *In vitro* skin penetration studies, using modified diffusion Franz cells, can provide useful results regarding the product efficacy. Dermatophytosis is superficial mycosis resistant to treatment due to the disease nature and also to the low penetration profile of the antifungals into the skin. Among the antifungals available in the therapeutic arsenal, ciclopirox olamine has demonstrated a high efficacy in the treatment of dermatophytosis. The objectives of the present work were to develop topical formulations containing 0,5% of ciclopirox olamine and evaluate their performance. It was possible to obtain physically stable formulae, containing skin penetration enhancers. The automatic sampling system used in the experiments was qualified, showing adequate performance.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

As dermatofitoses ou micoses superficiais têm distribuição universal, predominantemente em países tropicais e subtropicais. Com relação à epidemiologia, vários levantamentos realizados no Brasil demonstraram a importância das micoses superficiais em nosso meio. Geralmente, são manifestações crônicas e resistentes ao tratamento, fato que se explica não só em decorrência da própria natureza destas afecções como também devido à baixa penetração de fármacos antimicóticos na pele. Portanto, durante o tratamento antimicótico de dermatofitoses, a substância ativa deve penetrar na epiderme, pois a colonização por fungos geralmente atinge esta área. Muitas vezes, o sucesso terapêutico no controle das micoses superficiais só é possível com tratamento sistêmico de longa duração, cujos fármacos apresentam grande incidência de efeitos colaterais. Assim, a melhoria da eficácia dos produtos de uso tópico é de extrema importância e os estudos de penetração cutânea *in vitro* representam valiosas ferramentas para a sua avaliação (HÄNEL, RAETHER, DITTMAR, 1988).

Os estudos de penetração cutânea *in vitro*, utilizando células de difusão de Franz modificadas, podem fornecer resultados úteis quanto à liberação do fármaco do veículo e quanto a sua penetração na pele ou membranas. É possível, deste modo, selecionar veículos e adjuvantes farmacotécnicos adequados e avaliar a eficácia do produto analisado (SEGERS, ZATZ, 1998).

Dentre os antifúngicos disponíveis na terapêutica, ciclopirox olamina é uma substância que tem demonstrado elevada eficácia no tratamento de dermatofitoses (KOCH, 1982). Apresenta ação fungicida ou fungistática, além da ação antiinflamatória e pode penetrar rapidamente na pele, atravessando o estrato córneo e, atingindo a epiderme, dependendo da sua concentração e dos componentes da formulação. Conseqüentemente, o veículo pode influenciar a liberação e penetração na pele e, portanto, sua eficácia, já que os alvos são a epiderme e derme superior (HÄNEL, RAETHER, DITTMAR, 1988).

Dessa forma, o estudo de penetração cutânea *in vitro* faz-se extremamente importante na fase de desenvolvimento de formulações na escolha da fórmula mais eficiente para o tratamento tópico de micoses superficiais, já que nessa fase, os estudos clínicos são extremamente caros, tornando-se inviável para um *screening* das formulações.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Desenvolver formulações de uso tópico contendo 0,5% de ciclopirox olamina e avaliar sua penetração cutânea.

Para tanto, foram realizadas as seguintes etapas:

- Avaliação da estabilidade física das formulações desenvolvidas;
- Avaliação do perfil de liberação de ciclopirox olamina de formulações de uso tópico por meio de estudos *in vitro* utilizando membrana sintética de celulose;
- Avaliação da permeação cutânea de ciclopirox olamina através de fragmentos de pele de porco;
- Adição de promotores de penetração nas formulações;
- Estudo de retenção cutânea;
- Validação do método analítico para a quantificação de ciclopirox olamina nas preparações farmacêuticas e nos fluidos receptores dos ensaios de liberação, permeação e retenção cutâneas;
- Qualificação do equipamento utilizado nos ensaios de liberação, permeação e penetração cutâneas.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

O interesse em relação aos estudos de penetração de substâncias através da pele tem aumentado significativamente nos últimos anos, devido as suas aplicações e ao aprimoramento de técnicas para a quantificação das substâncias que podem ultrapassar a barreira do estrato córneo (SEGERS, ZATZ, 1998).

A pele ou cútis é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior. Constitui-se em complexa estrutura de tecidos de várias naturezas dispostos e inter-relacionados de modo a adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções. Graças à arquitetura e às propriedades físicas, químicas e biológicas de suas várias estruturas, a pele, como membrana envolvente e isolante, é um órgão capacitado à execução de múltiplas funções: proteção, termorregulação, percepção e secreção (SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 1983). Este tegumento não só protege fisicamente os órgãos internos e limita a passagem de substâncias para o interior e para o exterior do corpo como também estabiliza a temperatura e a pressão sanguínea com os sistemas de circulação e evaporação (BARRY, 1983).

Resumidamente, as principais funções da pele são:

- conter os fluidos e tecidos corporais;
- proteger o organismo de agressões externas;
- receber estímulo externo;
- regular a temperatura corpórea;
- sintetizar e metabolizar compostos;
- regular a pressão sanguínea.

Para que um produto de uso tópico apresente eficácia desejada, é necessário que o fármaco consiga atingir o sítio de ação, após atravessar as biomembranas existentes. Portanto, deve-se entender os princípios básicos da anatomia e estrutura da pele, a complexidade de seu funcionamento e sua composição química.

2 ESTRUTURA, COMPOSIÇÃO E FUNÇÃO DA PELE

A penetração cutânea de diversas substâncias é altamente influenciada pela microestrutura e composição bioquímica da pele.

A pele humana constitui o maior órgão do corpo humano. Em indivíduos adultos, apresenta uma área de aproximadamente 2m² e representa 15% do peso corpóreo (BENY, 2000). Em cada centímetro quadrado de área, há cerca de 10 folículos pilosos, 12 nervos, 15 glândulas sebáceas, 100 glândulas sudoríparas, 3 capilares sanguíneos com um comprimento total de 92 cm, 360 cm de nervos e 3 X 10⁶ células (BARRY, 1983). Toda superfície é composta por sulcos e saliências, particularmente acentuadas nas regiões palmo-plantares e extremidades dos dedos, onde sua disposição é absolutamente individual e peculiar, permitindo, não somente sua utilização na identificação dos indivíduos através da datiloscopia, bem como a diagnose de enfermidades genéticas através das impressões palmo-plantares, os chamados dermatóglifos. É um órgão complexo que separa o meio biológico interno do meio ambiente externo, protegendo contra a perda de água e contra a entrada de agentes externos estranhos ao organismo (SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 1983).

A pele é constituída essencialmente de três camadas de tecidos: camada superior, a epiderme; camada intermediária, a derme ou cório; e camada profunda, a hipoderme ou tecido celular subcutâneo (Figura 1). Suas funções são de promover proteção, nutrição, pigmentação, queratogênese, termorregulação, transpiração, perspiração, defesa e absorção (BENY, 2000).

A pele e suas estruturas acessórias – pêlos, unhas e glândulas – formam o sistema tegumentar (SPENCE, 1991).

Figura 1. Camadas da pele, apêndices e sistema vascular (www.scf-online.com)

2.1 Epiderme

A epiderme é uma camada avascular, derivada da ectoderme, composta por epitélio plano estratificado, constituído de estratos celulares, cuja espessura apresenta variações topográficas desde 0,4 mm nas pálpebras até 1,6 mm nas regiões palmo-plantares. Na epiderme, existem terminações nervosas livres e algumas células migratórias provenientes da derme (BENY, 2000). É composta de quatro camadas de células em diferentes estágios de diferenciação: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea, sendo que o estrato basal separa a epiderme da derme (Figuras 2 e 3) (MORGANTI *et al.*, 2001).

Em algumas regiões do organismo, como palma das mãos e planta dos pés, ainda há o estrato lúcido, representando uma quinta camada (BENY, 2000).

As células da epiderme são geradas na camada basal e migram para a superfície da pele (processo de descamação). Esse processo leva em

torno de 4 semanas e, à medida que ocorre, as células sofrem transformações na aparência e formato (MORGANTI *et al.*, 2001).

Figura 2. As quatro camadas da epiderme: (1) camada basal, (2) camada espinhosa, (3) camada granulosa e (4) camada córnea (www.scf-online.com)

- **Camada basal ou germinativa:** é a camada mais profunda da epiderme, localizada na junção dermo-epidermal, e é formada por uma fileira de células cilíndricas dispostas perpendicularmente (queratinócitos basais). É uma barreira permeável que dá suporte à epiderme e estabelece união com a derme (SPENCE, 1991; BENY, 2000; MORGANTI *et al.*, 2001). A camada basal é essencialmente germinativa, originando as demais camadas da epiderme por meio de progressiva diferenciação celular. Por esse motivo, observa-se sempre nesta camada intensa atividade mitótica. Análises por meio de técnicas com radioisótopos demonstram que o tempo de maturação de uma célula basal até atingir a camada córnea é de aproximadamente 26 dias (SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 1983). Os queratinócitos contêm uma extensa rede de queratina, principalmente as do tipo K5 e K14, cujas estruturas contribuem para evitar a perda de água da pele. Por um processo ainda não totalmente esclarecido, as células da camada basal migram em

direção à camada córnea, adquirindo características de um queratinócito diferenciado (MORGANTI *et al.*, 2001).

- **Camada espinhosa:** é também denominada camada Malpighiana ou corpo espinhoso mucoso de Malpighi. É constituída por várias fileiras de células poliédricas, unidas entre si por desmossomas, achatando-se progressivamente em direção à superfície (BENY, 2000). Ao atingir o estrato espinhoso, as células perdem sua capacidade de se dividir, aumentam em tamanho e o conteúdo hídrico diminui. A síntese de queratinas K5 e K14 é interrompida e se formam filamentos agregados de queratina K1 e K10. (MORGANTI *et al.*, 2001).

Entre as células espinhosas, encontram-se algumas células especiais, chamadas de **células de Langerhans**, que intervêm como mediadores da imunidade celular. Apresentam em sua superfície receptores específicos para a Imunoglobulina E, que captam diferentes antígenos externos, sendo, portanto, responsáveis pela resposta imunológica celular da pele (BENY, 2000).

- **Camada granulosa:** é constituída por células achatadas e arrançadas em cerca de três planos de células, superficialmente a camada basal. Esta camada tem seu nome derivado da presença de grânulos de querato-hialina no citoplasma de suas células (SPENCE, 1991). Estes grânulos são agregados de filamentos de queratina K1 e K10 e possuem tamanho e forma irregulares. O último estágio de diferenciação é o queratinócito, que se encontra em uma matriz intercelular lipídica (MORGANTI *et al.*, 2001).

- **Camada lúcida:** é encontrada somente nas regiões onde a camada córnea é espessa, tais como a palma das mãos e a planta dos pés. É a região mais profunda da camada córnea, situada entre a camada córnea e a granulosa. Consiste em 2 ou 3 camadas de células anucleadas, achatadas e intimamente ligadas, de aspecto homogêneo e transparente (SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 1983; BENY, 2000).

- **Camada córnea ou estrato córneo:** é a camada mais externa e consiste em várias fileiras de células epidérmicas mortas, anucleadas, constituídas em sua maior parte pela queratina. As fileiras superficiais apresentam-se em um processo de descamação contínua (capa descamativa) (BENY, 2000). Apresenta a espessura de 15 a 20 µm (HADGRAFT, 2001).

O estrato córneo exerce ação protetora, impedindo a entrada de microrganismos e substâncias, além de reter água e eletrólitos. Apresenta natureza lipofílica, sendo a principal barreira para a penetração de substâncias (HADGRAFT, 2001).

Há muito tempo foi reconhecido que a epiderme proporciona uma barreira eficiente à penetração de água e de outras substâncias. Vários pesquisadores mostraram que a barreira está localizada no estrato córneo, mas, comumente, acreditavam que as propriedades da barreira estavam confinadas às poucas camadas de células mais profundas. Essa interpretação parecia razoável, baseada no aspecto das seções histológicas padrão que mostram o estrato córneo como uma estrutura de trama de cesta aberta (*stratum disjunctum*), onde somente as poucas camadas inferiores (*stratum compactum*) estão unidas (DOWNING, 1992).

A função exata de barreira do estrato córneo tem sido muito pesquisada nos últimos anos e avanços recentes nas técnicas biofísicas têm esclarecido aspectos importantes do mecanismo de absorção a nível molecular (HADGRAFT, 2001). Além disso, o conhecimento das propriedades físicas e da estrutura molecular destes domínios lipofílicos entre os queratinócitos é essencial para a estratégia de desenvolvimento de produtos de uso tópico e transdérmico (BOUWSTRA, GOORIS, WHITE, 1997).

Figura 3. As quatro camadas da epiderme (MORGANTI *et al.*, 2001)

2.2 Derme

A derme apresenta espessura variável ao longo do organismo, desde 1 até 4 mm, sendo a média cerca de 2 mm (SPENCE, 1991).

Está disposta como uma armação formada em sua maioria por fibras de colágeno agrupadas em fila e entrelaçadas com fibras elásticas e reticulares (BENY, 2000). Consiste, essencialmente, de uma matriz de tecido conjuntivo formada por proteínas fibrosas, cuja composição aproximada é de 75% de colágeno, 4% de elastina, 0,4% de reticulina. Estas proteínas estão localizadas em um material amorfo de mucopolissacarídeo que corresponde a 20% da derme (BARRY, 1983).

As fibras de colágeno e elastina fornecem a estrutura para esta camada. A derme contém uma extensa rede de veias, essencial para a termorregulação, nutrição e reparo da pele e resposta imunológica. Na derme, estão localizados os apêndices da pele, os folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas (YOSIPOVITCH, THENG, 2002).

2.3 Hipoderme ou Tecido subcutâneo

A hipoderme ou panículo adiposo é a camada mais profunda da pele, de espessura variável, composta exclusivamente por tecido adiposo, isto é, células repletas de gordura. Relaciona-se em sua porção superior com a derme profunda, constituindo a junção dermo-hipodérmica, em geral, sede das porções secretoras das glândulas apócrinas ou écrinas e de pêlos, vasos e nervos. Funcionalmente, além de depósito nutritivo de reserva, participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a mobilidade da pele em relação às estruturas subjacentes (BENY, 2000).

2.4 Apêndices da pele

A derme e a epiderme acomodam vários apêndices como as glândulas sudoríparas e sebáceas, folículos pilosos e unhas.

As glândulas sudoríparas (Figura 4) podem ser écrinas ou apócrinas. As primeiras encontram-se dispersas por toda a pele, existindo em maior quantidade nas palmas das mãos, planta dos pés e axilas. A secreção sudoral écrina é incolor, inodora, hipotônica. Sua função é regular a temperatura do organismo. Já as glândulas sudoríparas apócrinas distribuem-se em certos locais no organismo, como axilas, área perimamilar e região anogenital. Secretam pequenas quantidades de secreção de aspecto leitoso a intervalos de tempo longos. Desenvolvem-se na infância e são ativadas na puberdade, porém, o verdadeiro significado desta secreção é desconhecido (SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 1983).

Figura 4. Glândula sudorípara (www.scf-online.com)

As glândulas sebáceas estão presentes em toda a pele, à exceção das regiões palmares e plantares, sendo maiores e numerosas na testa, face, superfície anogenital, orelhas e meio das costas. A secreção formada possui composição variada de lipídeos, cuja concentração varia de espécie para espécie (SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 1983).

Os folículos pilosos são estruturas filiformes, constituídas por células queratinizadas mortas (Figura 5). Do ponto de vista funcional, os pêlos servem como proteção nas áreas como narinas, conduto auditivo, olhos e, no couro cabeludo, como proteção aos raios ultravioleta. Nas áreas intertriginosas, reduzem o atrito e, finalmente, pela sua abundante inervação, fazem parte do aparelho sensorial cutâneo (SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 1983).

Figura 5. Folículo piloso (www.scf-online.com)

As unhas são lâminas queratinizadas que recobrem a última falange dos dedos. A espessura das unhas varia entre 0,5 a 0,75 mm e o crescimento é de cerca de 0,1 mm por dia, sofrendo variações individuais e é influenciado por doenças sistêmicas e fatores locais (SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 1983).

2.5 Vasos sangüíneos, inervação e músculos da pele

Apesar das variações topográficas da disposição vascular da pele, os vasos cutâneos constituem sempre um plexo profundo em conexão com um plexo superficial (SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 1983).

Os vasos linfáticos estão revestidos por uma única camada de células endoteliais, dispostos em alças ao longo da derme papilar, reunindo-se num plexo linfático subpapilar que, através da derme, desemboca num plexo linfático profundo, de localização dermo-hipodérmica (SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 1983).

A pele é ricamente nervada, pois apresenta milhões de terminações microscópicas que permitem identificar os diferentes estímulos do meio

ambiente, alertando o organismo para o perigo exterior. Contém nervos aferentes para as glândulas e músculos eretores e terminações nervosas livres com importante função tátil (AZULAY, AZULAY, 1999).

A musculatura da pele é predominantemente lisa e compreende os músculos eretores dos pêlos, os dartos do escroto e a musculatura da aréola mamária. As fibras musculares lisas do músculo eretor do pêlo aderem por uma extremidade às fibras conjuntivas da derme e por outra, aos folículos pilosos, inserindo-se abaixo das glândulas sebáceas. Quanto à musculatura estriada, encontra-se na pele do pescoço e da face (SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 1983).

3 VIAS DE PENETRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATRAVÉS DA PELE

A pele é particularmente uma barreira efetiva e seletiva para a penetração de diversos tipos de substâncias. A epiderme é o maior elemento controlador deste processo, visto que substâncias hidrossolúveis podem difundir 1000 vezes mais rapidamente até o sistema de capilares quando esta camada não está presente (BARRY, 1983).

Quando uma molécula se move para o interior da pele intacta, inicialmente entra em contato com o material graxo presente na superfície da pele, assim como, com as células mortas, bactérias e outros materiais exógenos que a recobrem (BARRY, 1983).

Para que uma substância consiga penetrar na pele e atingir o seu local de ação, é necessário que, primeiramente, ocorra a difusão e a liberação da mesma do veículo bem como sua partição nas diversas camadas da pele. Sua molécula deve apresentar um balanço entre as propriedades lipofílicas (para difundir-se através do estrato córneo lipofílico) e hidrofílicas (para difundir-se através da epiderme viável e derme superior, que são ambientes hidrofílicos, polares) (PANCHAGNULA, THOMAS, 2000).

Há três importantes rotas de entrada de substâncias através da pele: a via intercelular, a via transcelular e a via apêndice (tanto através das glândulas écrinas, quanto através dos folículos pilosos) (HADGRAFT, 2001). Essas vias estão ilustradas nas Figuras 6 e 7.

Figura 6. Principais vias de penetração de substâncias através do estrato córneo (HADGRAFT, 2001).

Figura 7. Vias de penetração de substâncias através do estrato córneo: via intercelular e transcelular (BARRY, 1983).

Recentemente, várias técnicas têm sido empregadas para visualizar o transporte de substâncias através da pele, dentre elas, as técnicas de microscopia, tais como a microscopia confocal a laser e a microscopia eletroquímica (TURNER, NONATO, 1997).

Independente da via que a molécula irá seguir, transcelular ou intercelular, deverá atravessar as bicamadas lipídicas que preenchem os espaços intercelulares entre os queratinócitos do estrato córneo. Os lipídeos que compõem estas bicamadas são formados principalmente por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres em, aproximadamente, igual proporção molar. Como consequência, a barreira à penetração de moléculas polares está predominantemente localizada no estrato córneo. Quanto mais lipofílica a molécula, mais facilmente irá penetrar na camada córnea, porém, isto não significa que todas as camadas da pele serão atingidas, pois poderá ocorrer acúmulo antes que a mesma alcance a próxima camada, a epiderme aquosa viável (WIECHERS, 2000).

A evidência de que existe duas vias de penetração de substâncias através da pele, um caminho lipofílico e outro, hidrofílico, foi inicialmente

sugerido por MICHAELS, CHANDRASEKARAN, SHAW, 1975. Esses pesquisadores reportaram que quando um permeante existe nas formas iônica e não iônica, a forma não iônica (e, portanto, mais lipofílica) apresenta melhor capacidade de penetração através da pele.

No entanto, baseado em um modelo matemático, POTTS, GUY, 1992, sugerem que exista somente uma via lipofílica na membrana.

3.1 Via apêndice

Os apêndices da pele (foliculos pilosos e glândulas) exercem influência na penetração cutânea, pois são uma via adicional para a entrada de algumas substâncias. Isto porque os apêndices formam verdadeiros “buracos” no estrato córneo, interrompendo sua continuidade (ILLEL *et al.*, 1991).

Esta via apêndice é um atalho, sendo, portanto, a mais rápida para o transporte de íons e moléculas de alta polaridade através dos foliculos pilosos ou das glândulas sebáceas. Depende, portanto, das características físico-químicas do fármaco e do veículo (LAUER, 1999).

SCHEUPLEIN, 1971, descreveu o transporte através dos foliculos pilosos para moléculas polares de tamanho pequeno e para esteróides polares que normalmente não atravessam a pele devido a sua carga ou a seu tamanho molecular. LAUER, 1999, relata o aumento do transporte através da pele em áreas com grande densidade folicular tanto em humanos quanto em animais.

ILLEL *et al.*, 1991, verificou através de experimento de difusão *in vitro* a importância da via apêndice, utilizando várias substâncias como agentes permeantes. Inicialmente, utilizou-se a pele de ratos recém-nascidos, com apenas 1 dia de vida, onde há ausência de foliculos pilosos. O fluxo dos permeantes através da pele desses animais foi comparado ao fluxo através da pele de ratos adultos, onde há grande densidade de foliculos pilosos. Observou-se fluxo menor através da pele de ratos recém-nascidos,

confirmando a contribuição dessa via para a entrada de substâncias através da pele.

Resultados de vários estudos utilizando microscopia confocal a laser têm demonstrado que sistemas particulados, incluindo lipossomas e sistemas poliméricos de microesferas, seguem, preferencialmente, a via apêndice (LAUER, 1999). Substâncias que seguem a via transcelular também utilizam a via apêndice nas fases iniciais da penetração (WIECHERS, 2000).

Com o uso de partículas de tamanho entre 3 e 10 μm , pode-se conseguir penetração de fármacos pelas glândulas sebáceas e do folículo piloso. Partículas maiores que 10 μm não conseguem penetrar através da pele e ficam retidas na superfície da pele, enquanto partículas menores que 3 μm podem penetrar pelos espaços intercelulares entre os queratinócitos (WIECHERS, 2000).

Para substâncias químicas de difusão lenta, a via apêndice pode contribuir ou mesmo ser a via dominante da penetração dérmica, especialmente durante o período imediatamente após a aplicação do produto na pele (UNITED STATES, 1998).

Entretanto, sob condições normais, esta via não é significativa para a penetração de substâncias através da pele devido à pequena área de superfície ocupada pelos apêndices (menos de 1%) (HADGRAFT, 2001).

3.2 Via transcelular

A via transcelular é um caminho vertical no qual as substâncias percorrem alternadamente domínios lipofílicos (matriz lipídica entre as células) e hidrofílicos (interior aquoso dos queratinócitos), havendo repetidamente partilha e difusão. Para que uma substância siga esta via, deve possuir algumas características, como apresentar alguma polaridade, ter caráter anfifílico e apresentar adequado coeficiente de partilha O/A (HADGRAFT, 2001).

Acredita-se que a via transcelular seja altamente resistente à penetração de compostos lipofílicos, o que não ocorre com substâncias hidrofílicas. Além disso, supõe-se que esta também seja a via através da qual a água evapora pela pele (DAYAN, 2005).

3.3 Via intercelular

A via intercelular é um caminho tortuoso em que as substâncias devem difundir-se através da matriz lipídica. ALBERY e HADGRAFT, 1979, demonstraram, em experimentos *in vivo* com nicotinato de metila, que esta é a principal rota de penetração de substâncias através da pele. Com o desenvolvimento de técnicas analíticas, foi demonstrado que os espaços intercelulares contêm uma mistura de ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol. Paralelamente, avanços na microscopia e a aplicação de difração em raios X permitiram observar que estes lipídeos estão arranajados em estruturas de bicamadas (HADGRAFT, 2001). Além de desempenhar importante papel na permeabilidade da barreira do estrato córneo, estas substâncias também contribuem para manter a coesão entre os queratinócitos (MORGANTI *et al.*, 2001). Portanto, a permeabilidade seletiva da pele pode ser explicada devido ao caminho tortuoso que a substância deve percorrer e o processo de partição e difusão alternadas através das estruturas de bicamadas (HADGRAFT, 2001).

O fator limitante do processo de penetração cutânea para as substâncias hidrofílicas é a barreira do estrato córneo, mas para substâncias lipofílicas apolares e insolúveis em água, a epiderme aquosa viável é o passo determinante do processo (BRONAUGH, 1993).

4 DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS PARA USO TÓPICO

O processo de desenvolvimento do veículo da formulação é fundamental para a performance do produto final. O desenvolvimento de produtos para uso tópico envolve várias etapas importantes para que se obtenha o produto final ideal. É essencial definir o nível de penetração cutânea necessário para determinado fármaco e a influência que o veículo pode exercer na eficácia da substância ativa (SILVA, 2001).

O ponto de partida é a seleção da forma farmacêutica mais adequada ao tipo de aplicação (loção, creme, pomada, solução tópica, entre outras) e que esta seja compatível com as propriedades físico-químicas do fármaco (SILVA, 2001).

Deve-se identificar o alvo, ou seja, qual camada da pele o fármaco deve atingir para exercer sua ação. Para isso, deve-se considerar as propriedades da pele, assim como o mecanismo de ação de diferentes ativos farmacêuticos, pois a eficácia do produto final é determinada principalmente por dois fatores: a atividade intrínseca da molécula e sua capacidade de atingir o sítio de ação (WIECHERS, 2000). Por exemplo, o estrato córneo é a barreira primária à penetração, porém também é potencial alvo para muitos fármacos. Hidratantes umectantes, tais como a glicerina, liga moléculas de água a esta camada por meio de um mecanismo físico simples (ZATZ, 2000). Se o local de ação for o estrato córneo e o fármaco lipofílico, este será retido na camada córnea (WIECHERS, 2000).

Em seguida, deve-se avaliar os meios pelos quais os objetivos serão atingidos, podendo-se utilizar diferentes tecnologias e “*delivery systems*” para a obtenção da fórmula ideal. Os sistemas de liberação auxiliam na manutenção da estabilidade do fármaco, facilita o uso do produto e direciona a molécula ativa para o local alvo. Componentes do sistema podem alterar as propriedades de barreira do estrato córneo e promover aumento da penetração através da pele. As formulações obtidas por essas tecnologias deverão ser avaliadas por diferentes métodos para verificar a eficácia do produto final. Devem ser realizados ensaios de penetração e retenção cutânea do fármaco, utilizando tanto metodologia *in vitro* como metodologia

in vivo (modelo animal), além de ensaio de toxicidade cutânea, estudos de biodisponibilidade em voluntários e estudos clínicos. Na escolha da melhor formulação também deve-se considerar outros requisitos como estabilidade do produto, aparência, análise sensorial e ausência de potencial de irritação (ZATZ, 2000).

Paralelamente, deve-se considerar o desenvolvimento e validação de processos industriais e de controle de qualidade. Na Figura 8, pode-se observar o esquema de desenvolvimento para produtos de uso tópico, sugerido por ZATZ, 2000.

Figura 8. Otimização da performance do produto durante a fase de desenvolvimento (ZATZ, 2000).

5 FATORES FÍSICO-QUÍMICOS DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE SUBSTÂNCIAS

A eficácia de produtos de uso tópico é dependente da composição do seu veículo. A capacidade do fármaco em penetrar através da pele e exercer seu efeito é consequência de dois eventos físicos consecutivos. Inicialmente, o fármaco deve ser liberado do veículo e difundir-se para a superfície da pele (WIECHERS, 2000). Em seguida, deve atravessar a barreira do estrato córneo em direção ao seu local de ação. A etapa determinante da eficiência total do processo depende da velocidade da etapa que ocorre mais lentamente (OSTRENGA *et al.*, 1971). O acúmulo da substância em determinada camada da pele também depende da etapa limitante ao processo de penetração (WIECHERS, 2000).

A liberação de um fármaco do veículo e o transporte através da pele é um processo de difusão passivo controlado por fatores físico-químicos dependentes das propriedades moleculares do permeante, do veículo e da pele (ADDICKS, 1990; HADGRAFT, 2001).

Na difusão passiva, há transporte de substâncias por uma membrana semi-permeável, obedecendo a um gradiente de concentração. As leis de difusão de Fick são modelos matemáticos que descrevem este processo. Portanto, estas leis podem ser utilizadas para analisar os dados obtidos no processo de penetração de uma ou mais substâncias através da pele (Hadgraft, 2001). A primeira lei de Fick é utilizada para descrever o *steady state* da difusão e pode ser descrita como (MOSER *et al.*, 2001a):

$$J = \frac{D_m \cdot C_{s,m}}{L} \cdot \frac{C_v}{C_{s,v}} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

J é a densidade de fluxo por unidade de área, ou seja, a quantidade da substância que atravessa a unidade de área por unidade de tempo;

D_m é o coeficiente de difusão do fármaco através da membrana; constante de proporcionalidade que avalia a facilidade com que a substância em difusão move-se no meio em questão;

$c_{s,m}$ é a solubilidade do permeante na membrana;

c_v é a concentração do permeante dissolvido no veículo;

$c_{s,v}$ é a solubilidade do permeante no veículo;

L é a espessura da membrana.

Em muitas situações, o coeficiente de difusão D_m pode ser considerado uma constante (BARRY, 1983).

Três estratégias para aumentar a penetração de substâncias através da pele podem ser postuladas com base na primeira Lei de Fick: aumentar D_m , aumentar $c_{s,m}$ e aumentar a relação $c_v / c_{s,v}$ (MOSER *et al.*, 2001a).

O coeficiente de difusão D_m e a solubilidade do fármaco na membrana $c_{s,m}$ podem ser alterados por componentes adicionados à formulação que alteram a natureza da barreira da pele (os promotores de penetração), ou seja, implica no efeito do veículo na função barreira do estrato córneo (MOSER *et al.*, 2001a).

O aumento da relação $c_v / c_{s,v}$ implica no aumento do grau de saturação do fármaco no veículo. É uma estratégia baseada na interação entre fármaco e veículo (MOSER *et al.*, 2001a).

Ao aplicar um produto de uso tópico ou transdérmico, o fármaco contido na formulação seguirá alguns passos sequenciais antes de ser absorvido pela pele. Inicialmente, há uma difusão ou transporte do fármaco de seu veículo para a superfície da pele; em seguida, este fármaco irá se partilhar para o estrato córneo e se difundirá através dele. Após a passagem através do estrato córneo, o fármaco deve se partilhar do estrato córneo

lipofílico para a epiderme aquosa viável e se difundir através desta e da derme superior. A partir deste ponto, o fármaco será removido pela microcirculação cutânea (HADGRAFT, 2001).

Os fatores físico-químicos importantes que determinam o controle da difusão de substâncias através da pele são partição, difusão e solubilidade. Portanto, para que as formulações sejam otimizadas, tanto no sentido de promover ou retardar a penetração de fármacos, devem-se modificar essas variáveis (HADGRAFT, 2001).

6 MÉTODOS EMPREGADOS PARA AUMENTO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA

A eficácia de fármacos aplicados topicamente é freqüentemente limitada à sua baixa penetração na pele. Para contornar este fato, métodos para melhorar a penetração cutânea de fármacos são muito utilizados como estratégia dos sistemas de liberação.

6.1 Métodos Químicos – Uso de Promotores de Penetração

Promotores de penetração cutânea são substâncias químicas que interagem com os componentes da pele, aumentando o fluxo através da mesma (WILLIAMS, BARRY, 2004).

Muitas substâncias químicas, dependendo da sua concentração e do fármaco em questão, podem atuar como promotores de penetração cutânea, alterando a permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, promovendo um aumento da passagem de fármacos pelo estrato córneo. O promotor de penetração ideal deve apresentar algumas características como ser inerte farmacologicamente, não ser tóxico, irritante ou alergênico, apresentar ação imediata, mas reversível no estrato córneo, ser fisicamente e quimicamente compatível com vários excipientes farmacêuticos, ser excelente solvente para os permeantes, promover adequado sensorial quando aplicado sobre a pele e ser metabolizado sem produzir efeitos colaterais indesejáveis (BARRY, 1983; FUHRMAN *et al.*, 1997).

A atividade de um promotor de penetração pode ser avaliada pela determinação *in vitro* do Fator de Promoção (FP), utilizando-se células de difusão. A substância promotora de penetração a ser testada é aplicada sobre as membranas na forma de solução saturada em determinado veículo durante um certo período de tempo. Após este tratamento, a solução é removida das membranas e aplica-se solução do fármaco. O Fator de Promoção é expresso como sendo (WILLIAMS, 1995):

$$FP = \frac{\text{parâmetro de penetração após tratamento com promotor}}{\text{parâmetro de penetração do controle}}$$

Os promotores de penetração atuam desordenando os lipídeos do estrato córneo e, conseqüentemente, alteram a permeabilidade cutânea, causando aumento do coeficiente de difusão da substância (D_m). Esses são os chamados promotores verdadeiros. Há algumas substâncias que podem aumentar a solubilidade das substâncias na pele (aumento de $C_{s,m}$), causando um efeito solubilizante, o que também leva em um aumento da penetração (MOSER *et al.*, 2001b).

Os promotores de penetração incrementam a passagem de substâncias através da pele por vários mecanismos e o estudo a nível molecular dessas reações tem ajudado a esclarecer esses fenômenos (SANTOS, BAHIA, 1995).

Pode-se considerar que os promotores de penetração atuam por um ou mais dos seguintes mecanismos (SANTOS, BAHIA, 1995):

- desorganização dos lipídeos do estrato córneo;
- interação com as proteínas intracelulares;
- promoção da partilha do fármaco no estrato córneo.

Os mecanismos de ação dos promotores de penetração são geralmente complexos.

Substâncias que atuam desorganizando a estrutura do estrato córneo agem intercalando-se entre os lipídeos da pele, deixando essa estrutura mais fluida, aumentando o coeficiente de difusão do permeante (HADGRAFT, 1999). Esses promotores podem atuar em dois sítios na bicamada lipídica: nas cabeças polares dos lipídeos ou entre as caudas hidrofóbicas, como pode ser observado na Figura 9 (SUHONEN, BOUWSTRA, URTTI, 1999).

Figura 9. Prováveis sítios de ação de promotores de penetração nos domínios lipídicos intercelulares do estrato córneo (SUHONEN, BOUWSTRA, URTTI, 1999).

Uma característica importante para promotores que atuam por esse mecanismo é que apresentam uma longa cadeia carbônica e um grupamento com cabeça polar. O maior problema é que substâncias com estas características tendem a apresentar propriedades irritantes. Os ácidos graxos, como o ácido oléico e a azona promovem aumento da penetração por meio deste mecanismo (HADGRAFT, 1999).

Os ácidos graxos são compostos freqüentemente utilizados como promotores de penetração por desorganizarem a barreira lipídica do estrato córneo, atuando nas caudas hidrofóbicas (MOSER *et al.*, 2001b; SUHONEN *et al.*, 1999). Estas substâncias aumentam o grau de desordem nas cadeias hidrocarbônicas dos lipídeos intercelulares ou diminuem a resistência da barreira pela formação de domínios fluidos dentro das estruturas líquido-cristalinas dos lipídeos. A adição de ácidos graxos de cadeia média a formulações de ácido pireno butírico, aumentou significativamente a penetração deste em metodologia *in vitro*, utilizando pele humana e células de difusão (SCHNEIDER *et al.*, 1996).

Os ácidos graxos e seus ésteres são considerados autênticos promotores de penetração, atuando em dois níveis. Por um lado, provocam danos às membranas e, por outro, aumentam a solubilidade das substâncias

no veículo (SANTOS, BAHIA, 1995). Têm sido amplamente empregados como promotores de penetração de diversas substâncias como estradiol, progesterona, aciclovir, 5-fluorouracil e ácido salicílico, o que indica que estes agentes podem atuar tanto com substâncias lipofílica quanto hidrofílicas (WILLIAMS, BARRY, 2004).

O ácido oléico é um ácido graxo que induz a separação de fases nos domínios lipídicos do estrato córneo, agindo assim, como promotor de penetração (MOSER *et al.*, 2001b).

Várias investigações têm sido conduzidas para elucidar o mecanismo de ação do ácido oléico como promotor de penetração cutânea. É evidente que este interage e modifica os domínios lipídicos do estrato córneo, como deveria de se esperar de um ácido graxo de cadeia longa com configuração *cis* (WILLIAMS, BARRY, 2004).

NAIK *et al.*, 1995, estudaram *in vivo* o mecanismo de ação do ácido oléico por espectroscopia de reflectância total no infravermelho. Utilizando ácido oléico marcado, puderam avaliar separadamente os lipídeos endógenos e o ácido oléico exógeno. Concluíram que o ácido oléico atua não só desorganizando os lipídeos do estrato córneo, mas também, diminuindo a viscosidade dos mesmos nas camadas mais superficiais. Portanto, o ácido oléico apresenta dois mecanismos de ação como promotor de penetração: desorganiza a barreira do estrato córneo interagindo com os lipídeos e causa separação de fases destes domínios, sendo este último o mecanismo predominante.

O ácido oléico tem demonstrado efeito promotor para diversos fármacos, como ácido salicílico e 5-fluorouracil. O ácido oléico é efetivo em concentrações relativamente baixas (tipicamente menos que 10%) e atua sinergicamente com veículos contendo propilenoglicol ou em sistemas ternários contendo dimetilsossorbida (WILLIAMS, BARRY, 2004).

OHARA, TAKAYAMA, NAGAI, 1995, verificaram a influência da temperatura no efeito promotor de penetração do ácido oléico para substâncias lipofílicas e hidrofílicas. Aplicando-se o promotor a 3% em veículo alcoólico e utilizando prednisolona como fármaco modelo lipofílico e

glicose como fármaco hidrofílico, verificou-se que, com o aumento da temperatura, houve aumento do efeito promotor do ácido oléico.

Embora o ácido oléico apresente notado efeito promotor de penetração para diversas substâncias, TOUITOU *et al.*, 2002, verificaram que uma solução alcoólica 10% deste composto é capaz de diminuir significativamente a densidade das células de Langerhans localizadas na camada basal da epiderme. Como estas células apresentam papel importante na resposta imunológica mediada por linfócitos T, deve-se considerar a possibilidade de ocorrer efeito imunossupressor em sistemas terapêuticos dérmicos contendo oleatos.

A azona ou laurocaprano (1-dodecil-aza-ciclo-heptano-2-ona) é uma molécula especificamente designada como promotor de penetração pela *Nelson Research and Development Co.* Apresenta estrutura química de um híbrido de amida cíclica, sendo um composto lipofílico. Apresenta-se como um líquido incolor, transparente e inodoro, com ponto de fusão de -7°C, oleoso, mas sem deixar sensação graxa sobre a pele (WILLIAMS, BARRY, 2004). É uma substância levemente irritante, mas de baixa toxicidade, ativa em pequenas concentrações – de 0,1 a 5%, mais freqüentemente empregada entre 1 a 3%, sendo que sua atividade depende da concentração empregada (SANTOS, BAHIA, 1995).

Apresenta ação promotora de penetração para várias substâncias, como esteróides, antibióticos e agentes antivirais. Assim como para a maioria dos promotores de penetração, sua eficácia depende e é também influenciada pela escolha do veículo em que é aplicada (WILLIAMS, BARRY, 2004).

Embora tenha sido utilizada por mais de 25 anos, o seu mecanismo de ação ainda tem sido investigado. Como o ácido oléico, a azona também parece atuar desordenando os lipídeos do estrato córneo e, assim, aumentar a difusão do fármaco através da pele (MOSER *et al.*, 2001b).

FANG *et al.*, 2003, avaliaram vários promotores de penetração, dentre eles, a azona, utilizando o flurbiprofeno como permeante modelo. Verificaram que, embora haja controvérsia quanto a seu uso, a azona

apresenta efeito levemente irritante sobre a pele, induzindo alto nível de resposta inflamatória.

Vários análogos da azona, amidas cíclicas e acíclicas e derivados do dioxolano foram relatados como agentes promotores de penetração de compostos lipofílicos e hidrofílicos (FUHRMAN *et al.*, 1997).

Alguns agentes como propilenoglicol, etanol e etoxidiglicol atuam como promotores de penetração aumentando a solubilidade do fármaco na pele, aumentando a partilha do fármaco no estrato córneo (MOSER *et al.*, 2001b). Entretanto, no caso de substâncias lipofílicas, o maior problema é sua baixa solubilidade na epiderme aquosa viável. A presença de propilenoglicol nesta região pode ser vantajosa, porém, há poucos estudos que demonstram a significância dos efeitos da solubilidade nas camadas mais profundas da pele (HADGRAFT, 1999).

O propilenoglicol é tipicamente aplicado em formulações de uso tópico como umectante ou cossolvente, em concentrações entre 1 a 10%. Penetra na pele e distribui-se no estrato córneo (HADGRAFT, 1999). É capaz de penetrar no estrato córneo, favorecendo a partilha de substâncias através do mesmo. A capacidade solubilizante de sítios aquosos no estrato córneo é aumentada e o acúmulo de propilenoglicol pode estabelecer um efeito reservatório do fármaco na pele. Entretanto, apenas substâncias altamente solúveis em propilenoglicol apresentam penetração aumentada (BENDAS, NEUBERT, WOHLRAB, 1995).

O propilenoglicol pode apresentar ação sinérgica com ácido oléico e outros agentes promotores de penetração, tais como DMSO, terpenos e pirrolidonas (WILLIAMS, 2004; BENDAS *et al.*, 1995). Embora muito utilizado em formulações de uso tópico, o propilenoglicol demonstrou capacidade em causar respostas inflamatórias na pele, quando avaliado através do uso de culturas de fibroblastos e liberação de prostaglandinas (FANG *et al.*, 2003).

O etanol é o solvente mais empregado em formulações de uso transdérmico e é comumente utilizado como cossolvente juntamente com a água nos experimentos de penetração cutânea *in vitro*. O etanol permeia

rapidamente na pele humana, com um fluxo de aproximadamente $1\text{mg cm}^2/\text{h}$ (WILLIAMS, BARRY, 2004), porém, PENDLINGTON *et al.*, 2001, verificaram que a aplicação tópica do etanol não leva à absorção sistêmica, embora o fluxo de etanol sob oclusão ocorra mais rapidamente.

Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a ação do etanol como promotor de penetração. O etanol pode atuar aumentando a solubilidade do fármaco na membrana e também pode penetrar na pele e reduzir sua função barreira, pois é capaz de extrair os lipídeos do estrato córneo (MOSER *et al.*, 2001b). Além disso, também pode atuar aumentando a atividade termodinâmica das substâncias na formulação, por ser um solvente volátil. Este efeito é mais aparente ao se aplicar uma dose finita do produto na superfície da pele antes da evaporação do álcool; ao ocorrer perda de álcool, a concentração do fármaco no produto aumenta, passando de concentração saturada para supersaturada, aumentando a penetração do fármaco na pele (WILLIAMS, BARRY, 2004).

O efeito promotor de penetração do etanol depende da concentração com que este atinge o estrato córneo. Em geral, o máximo efeito promotor de penetração do etanol é observado em concentrações entre 25 e 75%. Em baixas concentrações (até aproximadamente 30%), o etanol aumenta a penetração de substâncias lipofílicas e, quando presente em altas concentrações, promove aumento da passagem de substâncias hidrofílicas. Estudos de espectroscopia e calorimetria demonstraram que, em baixas concentrações, o etanol é capaz de causar perturbação física à barreira lipídica do estrato córneo, atuando nos grupos polares dos lipídeos, tornando sua estrutura mais fluida e aumentando a solubilidade de substâncias lipofílicas na matriz extra celular (SUHONEN, BOUWSTRA, URTTI, 1999). Em concentrações mais altas (> 50%), provoca mudanças conformacionais das proteínas queratinizadas e extração dos lipídeos do estrato córneo, aumentando a porosidade da pele, promovendo, assim, a passagem de substâncias hidrofílicas (HATANAKA *et al.*, 1995; RASTOGI, SINGH, 2001). Desse modo, os sistemas hidroalcoólicos podem aumentar a passagem de

solutos ionizáveis através do estrato córneo (KURIHARA-BERGSTROM *et al.*, 1990).

HATANAKA *et al.*, 1995, demonstraram que o efeito promotor de penetração do etanol é tempo dependente, pois a delipidização do estrato córneo é um processo progressivo.

O dimetil sulfóxido (DMSO) é um solvente miscível com água e com alguns solventes orgânicos; é aprótico, incolor, inodoro e higroscópico (SANTOS, BAHIA, 1995). Apresenta efeitos bacteriostático, analgésico local, antiinflamatório, diurético e é capaz de aumentar a difusão de algumas substâncias através da pele (BARRY, 1983). O mecanismo através o qual o DMSO age é particularmente complexo e ainda não é bem esclarecido.

O DMSO é amplamente empregado na denaturação de proteínas e sua aplicação na pele humana altera a conformação da queratina intercelular. É possível que a parte altamente polar de sua molécula interaja com a cabeça polar dos grupamentos de lipídeos, desorganizando esta estrutura. Além disso, o DMSO pode facilitar a partição das substâncias do veículo para o estrato córneo devido às suas propriedades solventes (WILLIAMS, BARRY, 2004).

Há vários trabalhos na literatura que descrevem a ação do DMSO e demonstram que é efetivo em promover aumento da penetração tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas, tais como agentes antivirais, esteróides e antibióticos (WILLIAMS, BARRY, 2004). Em geral, o DMSO promove rápida penetração de compostos de baixo peso molecular, atingindo camadas mais profundas da pele (BARRY, 1983). Porém, há provas da existência de efeitos indesejáveis associados ao seu uso para aplicação tópica, tais como formação de eritema e sensação de queimação (SANTOS, BAHIA, 1995). Embora isso ocorra, verificou-se que a irritação local inicial diminui com seu uso contínuo (BARRY, 1983). A sua atividade é dependente da concentração empregada. Uma resposta positiva requer, geralmente, concentrações superiores a 60%, o que torna problemática sua utilização devido aos efeitos negativos sobre a pele (SANTOS, BAHIA, 1995).

Em consequência aos problemas relacionados ao uso do DMSO, outras substâncias quimicamente similares foram desenvolvidas. A dimetilacetamida (DMAC), o decilmetilsulfóxido (DCMS) e a dimetilformamida (DMF) são solventes apróticos com estrutura similar ao DMSO, que apresentam ação promotora de penetração (WILLIAMS, BARRY, 2004).

Porém, foi verificado que, embora o DMF aumente o fluxo da cafeína em 12 vezes, esta substância causa danos irreversíveis nas membranas (WILLIAMS, BARRY, 2004).

O DCMS é um potente agente promotor para substâncias hidrofílicas, porém, é menos efetivo no caso de substâncias lipofílicas (WILLIAMS, BARRY, 2004).

As pirrolidonas podem ser utilizadas como promotores de penetração de várias substâncias. Também são utilizadas quando se deseja estabelecer um reservatório do ativo no estrato córneo e nas unhas (BARRY, 1983).

Vários tipos de pirrolidonas e compostos estruturalmente similares têm sido investigados como potentes promotores de penetração cutânea. Aparentemente, exercem maior efeito promotor para substâncias hidrofílicas, mas também verificou-se efeito para algumas substâncias lipofílicas como 17-benzoato de betametasona, hidrocortisona e progesterona (WILLIAMS, BARRY, 2004).

A N-metil-2-pirrolidona (NMP) e a 2-pirrolidona (2P) são os compostos mais estudados deste grupo. A NMP é um solvente aprótico polar, líquido e miscível com água e álcoois; a 2P também é miscível com estes solventes e é amplamente empregada para a obtenção de excipientes farmacêuticos como a polivinilpirrolidona (WILLIAMS, BARRY, 2004).

Em termos de mecanismo de ação, as pirrolidonas se partilham facilmente no estrato córneo e, dentro do tecido, atuam alterando a natureza solvente da membrana (WILLIAMS, BARRY, 2004).

Apesar de se reconhecer nas pirrolidonas uma marcada atividade promotora de penetração, o seu uso está comprometido, devido ao fato de

estas substâncias induzirem fenômenos de irritação, toxicidade e dor (SANTOS, BAHIA, 1995).

Tensoativos aniônicos, catiônicos e não iônicos têm sido amplamente estudados como promotores de penetração cutânea. Geralmente, são adicionados às formulações como agentes emulsificantes ou a fim de solubilizar fármacos lipofílicos. Portanto, apresentam grande potencial em solubilizar também os lipídeos do estrato córneo (WILLIAMS, BARRY, 2004).

Freqüentemente existe uma correlação entre o potencial irritante de um tensoativo e seu efeito sobre a velocidade de transporte de água e outras substâncias através da pele. Os efeitos máximos do tensoativo numa série homóloga ocorrem, usualmente, com as cadeias C12 ou C14 (ZATZ, 1995).

LÓPEZ, COLLETT, BENTLEY, 2000, avaliaram a influência do grupamento polar de tensoativos no efeito promotor de penetração. Para isso, utilizaram várias substâncias de diferentes lipofilicidades e realizaram experimentos *in vitro* em peles de ratos, com tensoativo Span 20, que apresenta cadeia de 12 átomos de carbono. Foram realizados estudos comparativos com azona e com Tween 20 e verificaram que o grau de etoxilação e a concentração do tensoativo influenciam no efeito promotor.

Os tensoativos facilitam a penetração de várias substâncias. O lauril sulfato de sódio aumentou o fluxo de cloranfenicol através de peles de rato, o Tween 80 aumentou a penetração de hidrocortisona e lidocaína em pele de camundongo sem pêlo (WILLIAMS, BARRY, 2004).

De um modo geral, os tensoativos não iônicos apresentam menor efeito promotor de penetração na pele, enquanto os aniônicos, como o lauril sulfato de sódio, apresentam efeitos mais pronunciados (WILLIAMS, BARRY, 2004).

Terpenos são compostos voláteis, encontrados em óleos essenciais extraídos de flores, frutos e folhas de diversas plantas. Consistem em uma série de compostos, constituídos de unidades de isopreno (C_5H_8) altamente lipofílicos, com coeficientes de partição entre o coeficiente do octanol e da água (Godwin, Michniak, 1999). São compostos que contêm átomos de

GODWIN, MICHNIAK, 1999, avaliaram *in vitro* o efeito promotor de penetração de alguns terpenos, utilizando substâncias de diferentes lipofilicidade como modelo (cafeína, hidrocortisona e acetona de triancinolona). Foram testados onze monoterpenos, em soluções saturadas de propilenoglicol, aplicadas em pele de ratos. Verificaram que houve significativo aumento de penetração da cafeína e da hidrocortisona, porém, o mesmo resultado não foi possível com a acetona de triancinolona.

A uréia é um agente hidratante utilizado no tratamento de diversas afecções cutâneas, tais como psoríase, ictiose ou outras condições de hiperqueratose da pele. Veiculada em emulsões água em óleo, apresenta efetiva hidratação do estrato córneo e melhora a função barreira do mesmo. Também apresenta ação queratolítica, usualmente quando utilizada em conjunto com ácido salicílico. O efeito da uréia como promotor de penetração, provavelmente, resulta da combinação entre o aumento da quantidade de água no estrato córneo e a sua atividade queratolítica (WILLIAMS, BARRY, 2004).

A uréia e alguns análogos foram avaliados como promotores de penetração utilizando o 5-fluorouracil como permeante modelo. Os análogos testados foram a 1-dodeciluréia, a 1,3-didodeciluréia e a 1,3-difeniluréia. Os promotores foram aplicados em pele humana sob a forma de soluções saturadas em três tipos de veículos (dimetil isosorbida, vaselina sólida e propilenoglicol) e foram determinados os coeficientes de permeabilidade *in vitro*. Verificou-se que a uréia e os veículos, isoladamente, não são efetivos no aumento da penetração de 5-fluorouracil. Os seus análogos também se comportaram do mesmo modo, mas foram mais efetivos quando aplicados em propilenoglicol. Os autores confirmaram o efeito sinérgico do propilenoglicol na ação destes promotores de absorção (WILLIAMS, BARRY, 1989).

Muitas substâncias podem atuar como promotores de penetração por meio de dois mecanismos, tanto alterando o coeficiente de difusão como alterando a solubilidade do fármaco na pele. Efeitos sinérgicos também podem ser observados associando-se dois promotores de penetração, por

exemplo, a combinação de azona que tipicamente aumenta D_m e propilenoglicol que aumenta a solubilidade do fármaco no estrato córneo, aumentou significativamente a penetração de metronidazol e estradiol em experimentos realizados por MOSER *et al.*, 2001b, empregando sistemas contendo propilenoglicol e ácidos graxos foram comprovadamente mais efetivos como promotores de penetração que sistemas contendo apenas estes dois compostos separadamente (SCHNEIDER *et al.*, 1996).

Em um estudo com tenoxicam, verificou-se que houve maior aumento da penetração *in vitro* quando foram associados o ácido oléico e o propilenoglicol. Esse sistema desorganizou as camadas multilaminares hidrofílicas e lipofílicas localizadas intercelularmente no estrato córneo, aumentando a passagem do permeante (GWAK, CHUN, 2002).

Há uma série de fatores a serem considerados na seleção do promotor de penetração mais adequado para uma determinada substância, pois os promotores podem apresentar diferentes efeitos entre fármacos de propriedades físico-químicas diferentes. A seleção do promotor é um processo que requer extensivo trabalho durante a fase de desenvolvimento de um produto. Além disso, deve-se também considerar a regulamentação existente, sendo que o uso de substâncias não aprovadas como promotores de penetração requer estudos de segurança pré-clínicos adicionais (PFISTER, 1997).

Nem sempre o melhor promotor é o agente mais seguro. Ácidos graxos insaturados demonstraram acentuado efeito promotor de penetração para flurbiprofeno, porém, quando comparados a outros promotores de penetração como azona, terpenos e surfactantes, também apresentaram maior efeito irritante na pele. Portanto, deve-se sempre considerar o risco-benefício e balancear o uso de uma substância promotora de penetração, pois algumas podem apresentar acentuada toxicidade (FANG *et al.*, 2003).

Pode-se também aumentar a penetração de substâncias por meio da delipidização do EC. A extração de lipídeos do EC pode criar vias adicionais para a passagem de solutos polares. RASTOGI, SINGH, 2001, demonstraram que uma mistura 2:1 clorofórmio:metanol aumentou a

penetração de solutos hidrofílicos através da delipidização do EC, utilizando peles de orelha de porco.

6.2 Métodos Farmacotécnicos

Com o emprego de métodos farmacotécnicos, pode-se obter aumento da penetração de ativos através da pele. Pode-se utilizar uma técnica simples como o uso de agentes solubilizantes e aumento do grau de saturação do ativo na formulação ou tecnologias mais modernas como os sistemas de liberação.

6.2.1 Aumento do grau de saturação do fármaco na formulação

A supersaturação do ativo no veículo, assim como métodos físicos e químicos, pode aumentar a penetração cutânea, com a vantagem de ser uma técnica mais barata e não perturbar a matriz lipídica do estrato córneo (PELLETT, ROBERTS, HADGRAFT, 1997).

Em formulações supersaturadas, a atividade termodinâmica do ativo no veículo está aumentada, o que promove um aumento da liberação do ativo e seu direcionamento para o interior das membranas (MOSER *et al.*, 2001c). Isto porque o potencial químico de gradiente da substância no veículo é substancialmente maior que em formulações saturadas. Para que ocorra equilíbrio, é necessário que esse gradiente também seja aumentado no estrato córneo, o que só poderá ocorrer se os lipídeos da pele permitirem que a substância exista em maior atividade, acarretando em aumento do transporte (PELLETT, ROBERTS, HADGRAFT, 1997).

Embora a estabilidade de formulações supersaturadas possa ser aumentada com a adição de polímeros adequados que evitam ou retardam a recristalização, este tipo de sistema não resiste a longos períodos de estocagem (MOSER *et al.*, 2001c). Em geral, a estabilidade de sistemas

supersaturados depende do grau de saturação, do polímero estabilizante e da sua concentração (HADGRAFT, 2004).

Geralmente, os polímeros estabilizantes utilizados são carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, etilcelulose, polivinilpirrolidona, álcool polivinílico (MOSER *et al.*, 2001c). São necessárias somente pequenas concentrações do polímero (<1%) para que este atue como estabilizante de sistemas supersaturados. O provável mecanismo de ação pode ser por meio da adsorção do polímero no núcleo de cristalização, inibindo sua formação e crescimento, pois a morfologia dos cristais é freqüentemente alterada pela presença de polímero, o que influencia na sua cinética de dissolução (HADGRAFT, 2004).

MOSER *et al.*, 2001c, tentaram correlacionar o tipo de substância permeante e o polímero a ser utilizado para estabilização da sua solução supersaturada. Verificaram que não há correlação entre o polímero e o permeante. Somente após estudo de estabilidade da solução, conseguiram determinar que a carboximetilcelulose foi o melhor estabilizante para solução supersaturada de lavendustina. PELLETT, CASTELLANO, HADGRAFT, 1997, verificaram que a hidroxipropilmetilcelulose evita a recristalização de piroxicam em formulações supersaturadas.

A supersaturação pode ser obtida por diferentes métodos, imediatamente antes ou durante a aplicação do produto de uso tópico sobre a pele. Como a atividade termodinâmica é dependente da afinidade entre o veículo e o ativo, pode-se obter a condição de supersaturação por três métodos: (i) por meio da evaporação do solvente, (ii) pela mistura de solventes e co-solventes e (iii) pela dissolução do ativo por meio de aquecimento (MOSER *et al.*, 2001c).

O método da evaporação do solvente é empregado com uso de solventes voláteis. Com a evaporação do solvente, há aumento da concentração do ativo no veículo, o que aumenta a termodinâmica do sistema. Pela mistura de solventes e co-solventes, pode-se aumentar ou diminuir a afinidade do ativo pelo veículo, o que influencia na sua liberação. Utilizando o aquecimento para dissolução de ativos, pode-se obter maior

solubilidade do mesmo, aumentando sua concentração no veículo (MOSER *et al.*, 2001c).

A complexação e os aumentos de solubilidade tendem a abaixar a atividade de captação pela pele; já, a diminuição da solubilidade eleva a atividade, aumentando a penetração na pele (ZATZ, 1995).

O aumento da concentração do fármaco no veículo pode não ser viável em alguns casos, onde há questões de segurança, regulamentação ou economia para limitar a concentração. Devido a algumas limitações quanto ao aumento da concentração do ativo no veículo, pode-se aumentar a penetração de uma substância empregando soluções supersaturadas, nas quais o potencial químico é muito maior que a apresentada pelas soluções saturadas (HADGRAFT, 1999).

Em estudo utilizando uma substância lipofílica modelo (derivado de lavendustina), MOSER *et al.*, 2001, verificaram que a sua supersaturação obtida por vários métodos em diferentes veículos aumentou a penetração *in vitro* através da pele de porco e que esta foi independente da concentração.

Utilizando piroxicam como permeante modelo, PELLETT, CASTELLANO, HADGRAFT, 1997, verificaram a influência de veículos supersaturados na penetração cutânea *in vitro*. As soluções supersaturadas foram obtidas pelo método da mistura de solventes e co-solventes e, através da técnica de *tape stripping*, foi possível quantificar o fármaco no estrato córneo humano. Os autores também determinaram a quantidade de piroxicam que passou através da pele e a que ficou retida na epiderme e derme. Observaram que quanto maior o grau de saturação, maior a quantidade retida no estrato córneo e na pele, sendo maior no estrato córneo (efeito reservatório).

6.2.2 Sistemas de Liberação

6.2.2.1 Ceramidas

As ceramidas podem aumentar a penetração de substâncias através da pele, pois interagem com os lipídeos intercelulares do estrato córneo, desorganizando a barreira (VÁVROVÁ *et al.*, 2003a).

Figura 11. Estrutura molecular da Ceramida 2 (VÁVROVÁ *et al.*, 2003a).

VÁVROVÁ *et al.*, 2003b, sintetizaram uma série de análogos de ceramidas e verificaram a ação como promotores de penetração cutânea *in vitro*. Os compostos com ação promotora de penetração cutânea mais efetiva foram aqueles que apresentavam cadeia com 10 a 12 carbonos e uma pequena cabeça polar, pois estes causaram maior distúrbio à barreira por meio de sua maior interação com os lipídeos do estrato córneo, fluidizando-os.

6.2.2.2 Lipossomas

Lipossomas são vesículas esféricas formadas por fosfolipídeos e colesterol, que apresentam uma cavidade aquosa central. As paredes das vesículas são constituídas de lamelas concêntricas, compostas de fosfolipídeos que são constituintes naturais das membranas celulares (MAGDASSI, 1997). Esta característica dos lipossomas, em relação à organização das estruturas lipídicas, mimetiza a estrutura do estrato córneo,

fazendo com que estes sejam veículos precisos para a penetração de compostos através da pele (CODERCH *et al.*, 1996).

O tamanho dos lipossomas é determinado principalmente pelo método de preparação. Há vários métodos para obtenção de lipossomas, dentre os quais o de sonicação, com o qual podem ser obtidas vesículas com diâmetro entre 30-40 nm. Com o método por agitação e vórtex, obtém-se vesículas com diâmetro aproximado de 600 nm. O tamanho dos lipossomas afeta a penetração das substâncias encapsuladas. Vesículas pequenas apresentam rápida penetração, alto acúmulo na pele e alto valor de *lag time*, ao contrário de vesículas maiores (TAO, 2000).

Estudos indicaram que os lipossomas aumentam a penetração cutânea de vários componentes, tais como a pirrolidona carboxilato de sódio, um componente do sistema de hidratação natural da pele (MAGDASSI, 1997). Isto porque os lipossomas atuam por meio de sua erupção na superfície da pele, formando uma camada oclusiva de lipídeos (WIECHERS, 2000).

VALENTA, JANISCH, 2003, verificaram que houve aumento da penetração cutânea *in vitro* do acetato de ciproterona quando veiculado em lipossomas. Outra conclusão importante foi o fato de a penetração cutânea depender do tipo de lipídio utilizado na formulação e do tamanho da esfera do lipossoma.

Embora os lipossomas aumentem a penetração de substâncias através da pele, em um estudo com diclofenaco dietilamina, verificou-se que não houve penetração desse ativo quando em veículos contendo lipossomas, independente do tamanho dos mesmos. Isto se explica devido à alta afinidade do fármaco pelos lipossomas, que participaram da formação das lamelas, e dos lipossomas que permaneceram intactos no teste de penetração cutânea *in vitro* em estrato córneo humano (KRIWET, MULLER-GOYMANN, 1995).

Uma das grandes desvantagens dos lipossomas é sua instabilidade e a predisposição de seus constituintes fosfolipídicos à degradação oxidativa (TAO, 2000).

6.2.2.3 Cristais Líquidos

Cristais líquidos são sistemas que apresentam características de sólidos (como a anisotropia óptica e a birrefringência) e propriedades mecânicas de líquidos. O estado líquido está associado à capacidade de fluir, enquanto, o sólido apresenta uma estrutura ordenada e cristalina. Entretanto, a fase de cristal líquido apresenta estados intermediários sendo também chamado de mesofase (BEVACQUA *et al.*, 1991; MULLER-GOYMANN, 2004).

São facilmente detectados por microscopia óptica com polarização, pois desviam o plano de luz polarizada. Podem ser classificados em termotrópicos, nos quais a temperatura é fator determinante para sua obtenção, ou liotrópicos, onde a concentração da substância e os solventes empregados são fatores importantes para sua formação (BEVACQUA *et al.*, 1991).

Dentre os produtos de uso tópico, os mais relevantes são os cristais líquidos liotrópicos, muito comumente utilizados em formulações dermatológicas, por exibirem propriedades hidratantes (NESSEEM, 2001). As substâncias capazes de formar os cristais líquidos liotrópicos são tensoativos anfifílicos, comumente empregados em emulsões (BEVACQUA *et al.*, 1991).

Os cristais líquidos podem formar três diferentes tipos de estruturas: unidimensional ou lamelar, bidimensional ou lamelar e tridimensional ou cúbica. A fase lamelar apresenta-se em forma de estruturas unidimensionais, caracterizada pela presença de cruzeiros maltezes, mosaicos ou cordões. Apresentam aparência de líquido viscoso, translúcido ou turvo. Já na fase hexagonal, formam-se estruturas bidimensionais que podem ser normais (com a parte polar dos lipídeos voltados para a porção interior) ou reversas (com a parte polar dos lipídeos voltados para a porção externa). A fase cúbica é formada por estruturas tridimensionais, com aparência de gel rígido transparente e ressonante (MULLER-GOYMANN, 2004).

Cristais líquidos de fase cúbica são formados espontaneamente quando lipídeos anfifílicos são colocados em contato com água. São estruturas termodinamicamente estáveis, constituídas de bicamadas bicontínuas curvas formadas em três dimensões e separadas por duas redes congruentes de canais de água. Também são veículos interessantes para terapias tópicas, pois são capazes de incorporar e liberar controladamente substâncias de diversos tipos, tamanhos e características físico-químicas (SAHH, SADHALE, CHILUKURI, 2001).

Substâncias ativas lipofílicas ou hidrofílicas podem ser incorporadas em sistemas contendo cristais líquidos com a vantagem de maior proteção contra fotodegradação e termodegradação. Além disso, podem ser liberadas gradativamente para o sítio de ação (BEVACQUA *et al.*, 1991). Outra vantagem marcante de sistemas líquido-cristalinos é o aumento da estabilidade de emulsões, através de um aumento da viscosidade, o que diminui a coalescência devido às mudanças nas forças de Van der Waals (NESSEEM, 2001).

NESSEEM, 2001, verificou que formulações tópicas contendo cristais líquidos são veículos adequados para o itraconazol, pois aumentou *in vitro* a propriedade farmacológica do fármaco contra *Cândida albicans*, além de aumentar a estabilidade do sistema.

A incorporação de cristais líquidos em formulações de uso tópico requer cuidados especiais durante o desenvolvimento, pois alguns óleos ou tensoativos graxos podem destruir a estrutura dos cristais líquidos (BEVACQUA *et al.*, 1991).

BEVACQUA *et al.*, 1991, verificaram que as melhores formulações para incorporação de cristais líquidos são emulsões múltiplas, embora estes sistemas sejam termodinamicamente instáveis.

6.2.2.4 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, constituídos de seis a oito unidades de glicose, ligados entre si através de ligações α -1,4 glicosídicas, com uma cavidade central lipofílica e a superfície externa, hidrofílica. O produto natural consiste de uma mistura de várias ciclodextrinas, principalmente α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e a γ -ciclodextrina (LOFTSSON, 2000; LOFTSSON, MASSON, 2001).

As ciclodextrinas são capazes de modificar algumas propriedades físico-químicas de substâncias ativas por meio da formação de complexos de inclusão por ligações covalentes. Uma das características mais importantes dessa complexação é que o tamanho e a configuração espacial da molécula hóspede devem ser adequados ao tamanho da cavidade da ciclodextrina hospedeira. Normalmente, a α -ciclodextrina, por apresentar cavidade de menor tamanho, forma complexos de inclusão cuja proporção estequiométrica é de 1:1 ou 1:2 com a molécula hóspede. Já a β -ciclodextrina forma complexos 1:1 com a substância hóspede e a γ -ciclodextrina, com maior cavidade, 2:1, embora a proporção estequiométrica dependa também do tamanho da molécula hóspede (IKEDA *et al.*, 2004).

Figura 12. Estrutura da ciclodextrina e formação de complexos de inclusão (DEL VALLE, 2004).

A partir da complexação, pode-se obter aumento da solubilidade do fármaco em meios aquosos, aumento da estabilidade à oxidação e aumento da penetração de fármacos lipossolúveis através da pele, devido à atividade promotora de penetração cutânea das ciclodextrinas (BENTLEY *et al.*, 1997; LOPEZ, COLLETT, BENTLEY, 2000; SCALIA *et al.*, 1998; VOLLMER *et al.*, 1994). Entretanto, dependendo da composição do veículo, as ciclodextrinas podem aumentar ou mesmo diminuir a permeabilidade da barreira. Além disso, as ciclodextrinas hidrossolúveis são capazes de permear nas membranas biológicas com certa dificuldade. Estas observações levam à conclusão de que as ciclodextrinas realmente aumentam a penetração cutânea sem causar mudanças físico-químicas na barreira do estrato córneo (LOFTSSON, MASSON, 2001).

LOPEZ, COLLETT, BENTLEY, 2000, verificaram que complexos de β -ciclodextrina e de β -hidroxipropil-ciclodextrina aumentaram a penetração *in vitro* e a estabilidade da dexametasona na pele. Os complexos de ciclodextrinas aumentaram o fluxo da dexametasona através da pele por aumentar a disponibilidade do fármaco na superfície da pele e, além disso a β -hidroxipropil-ciclodextrina também extrai os lipídeos do estrato córneo.

O mecanismo pelo qual as ciclodextrinas aumentam a penetração cutânea de substâncias não está bem esclarecido. Seu efeito promotor não pode ser explicado apenas pelo aumento da solubilidade das substâncias na fase doadora aquosa. Também não são promotores de absorção clássicos que atuam diminuindo a função barreira da pele. Em estudo *in vitro* utilizando pele de camundongo sem pêlo, MÁSSON *et al.*, 1999, concluíram que as ciclodextrinas atuam como carreadores de fármacos, transportando-os da fase doadora para a via aquosa de penetração no estrato córneo e, daí, para a parte lipofílica da pele.

A encapsulação de substâncias em ciclodextrinas tende a diminuir sua atividade termodinâmica em solução e reduz sua tendência a se partilhar para o estrato córneo. Isto pode resultar em maior retenção dos fármacos na superfície da pele e diminuir a quantidade total permeada. Em casos onde é

desejável um efeito reservatório, tal sistema de liberação pode ser empregado com maior vantagem (ZATZ, 2000).

6.2.2.5 Microcápsulas

Microcápsulas são partículas de diâmetro desde a ordem de submicrons (as chamadas nanocápsulas) até 1000 μm , contendo material de núcleo envolvido por membrana especial. Podem ser utilizadas na proteção de substâncias sensíveis contra a ação do ambiente externo, na conversão de líquidos em pós e na liberação controlada e direcionada de ingredientes ativos. Uma das principais desvantagens da microcápsula é seu alto custo, além do processo de microencapsulação ser um processo complicado (MAGDASSI, 1997).

6.2.2.6 Microemulsões, Emulsões Múltiplas e Nanoemulsões

Microemulsões são sistemas isotrópicos, transparentes ou levemente opalescentes, de baixa viscosidade e termodinamicamente estáveis, usualmente compostos por água, fase oleosa, tensoativos e co-tensoativos. O diâmetro das partículas da fase dispersa está entre 10 e 100 nm. Componentes hidrofílicos e lipofílicos destes sistemas são responsáveis pela ação promotora de absorção das microemulsões. Os componentes lipofílicos do veículo são capazes de aumentar a permeabilidade da via lipofílica do estrato córneo pela sua interação com as cadeias lipídicas das bicamadas. Os constituintes hidrofílicos hidratam os domínios do estrato córneo e as proteínas. Deste modo, um efeito sinérgico favorece o transporte de substâncias contidas nas microemulsões. Além disso, uma redução da tensão interfacial entre o veículo e a pele, faz com que as microemulsões sejam muito superiores às emulsões convencionais quanto a promoção da absorção (NEUBERT, SCHMALFUß, 1999).

Embora as microemulsões aumentem a penetração cutânea de fármacos, deve-se levar em consideração que freqüentemente requerem altas concentrações de tensoativos e co-tensoativos para a sua formação, o que pode resultar em alto potencial de irritabilidade para a pele e solubilização de componentes essenciais do estrato córneo (MAGDASSI, 1997).

As emulsões múltiplas são sistemas complexos, termodinamicamente instáveis, que combinam emulsões A/O e O/A em um único veículo. As emulsões do tipo A/O/A podem ser usadas como sistemas de liberação lenta ou controlada para diversos fármacos (MAGDASSI, 1997).

A liberação de uma determinada substância de uma fase dispersa e sua conseqüente absorção através do estrato córneo são criticamente dependentes das interações entre o material, o solvente e a interface. A complexidade destas interações aumenta com o aumento do número de fases da emulsão múltipla (BEVACQUA *et al.*, 1991).

6.3 Métodos Físicos

Além dos métodos químicos e farmacotécnicos, métodos físicos também podem ser empregados para o aumento da penetração cutânea. Métodos como "stripping" do estrato córneo, hidratação do estrato córneo, iontoforese, sonoforese ou ultra-som e eletroporização são utilizados e avaliados quanto ao aumento da penetração de substâncias através da pele (KOST, MITRAGOTRI, LANGER, 1999).

6.3.1 *Stripping* do estrato córneo

A remoção física da barreira do estrato córneo previamente à aplicação do produto pode aumentar a penetração da substância através da

pele. Essa técnica é empregada pelo uso consecutivo de várias fitas adesivas até remoção de várias camadas córneas (BARRY, 2001).

O método de *tape stripping* também pode ser utilizado em estudos de retenção cutânea para quantificar substâncias retidas no estrato córneo, após estudos de penetração cutânea (BARRY, 2001).

6.3.2 Hidratação do estrato córneo

A hidratação do estrato córneo aumenta a velocidade de penetração da maioria das substâncias, pois a água promove aberturas na estrutura compacta da camada córnea. Agentes oclusivos, hidratantes e formadores de filme geralmente aumentam a penetração das substâncias através do mesmo (BARRY, 2001).

6.3.3 Iontoforese

A permeabilidade da pele pode ser alterada com a aplicação de corrente elétrica. A iontoforese, geralmente utilizada para produtos de uso transdérmico, pode ser definida como o movimento de íons através da pele na presença de um campo elétrico externo. Cargas de alta voltagem podem causar mudanças na estrutura da pele, por meio de um mecanismo envolvendo a eletroporação (PRAUSNITZ, 1996). Há, entretanto, três principais mecanismos que podem explicar o efeito promotor da iontoforese: (a) espécies carregadas podem ser eletricamente repelidas do eletrodo; (b) o fluxo da corrente elétrica pode aumentar a permeabilidade da pele; (c) a eletroosmose pode afetar moléculas não carregadas e peptídeos polares de alto peso molecular. A eficiência do transporte das substâncias depende da polaridade, da valência e da mobilidade das espécies carregadas, assim como os ciclos de descarga de corrente e os componentes da formulação (BARRY, 2001).

Um problema da iontoforese é o dano que esta pode causar aos folículos pilosos, pois a corrente penetra na pele através da via apêndice. Isso ocorre mesmo na presença de baixa densidade de corrente por unidade de área (BARRY, 2001).

Os parâmetros elétricos típicos da iontoforese são: corrente ≤ 25 mA; tempo total de aplicação $T \leq 1$ h; área da superfície do eletrodo $A \leq 100$ cm². A iontoforese é geralmente bem tolerada, embora haja casos de leve irritação da pele e eritema (PRAUSNITZ, 1996).

6.3.4 Sonoforese

A sonoforese ou fonoforese é definida como movimento de substâncias através da pele intacta sob a influência de ondas ultra-sônicas. Os parâmetros das ondas ultra-sônicas, tais como frequência, intensidade e distância do transdutor da pele, devem ser adequadamente selecionados para que a sonoforese atinja eficácia desejada. Essa técnica consiste em aplicar a área a ser tratada com o produto tópico e massageá-la com um eletrodo de ultra-som (KOST, MITRAGOTRI, LANGER, 1999).

Um possível mecanismo pelo qual o ultra-som atua no aumento de penetração de substâncias pela pele é a de que as ondas ultra-sônicas podem interagir com a estrutura de lipídeos localizada nos canais intercelulares do estrato córneo, desorganizando-os. A energia do ultra-som pode atuar facilitando a difusão de substâncias através dos domínios lipídicos (KOST, MITRAGOTRI, LANGER, 1999).

Entretanto, a desvantagem dessa técnica é a ausência de validação quanto à eficácia e segurança do uso em pacientes, além da dificuldade da aplicação na casa do paciente (BARRY, 2001).

6.3.5 Eletroporização ou eletroporação

Na eletroporação, a aplicação de pulsos elétricos baixos cria poros aquosos temporários na camada bilipídica da pele, o que promove vias de entrada de substâncias através da pele (BARRY, 2001).

A eletroporação pode se utilizada em conjunto com a iontoforese e a sonoforese para que haja um efeito sinérgico, principalmente no caso de administração transdérmica de peptídeos (BARRY, 2001).

6.4 Métodos Invasivos

O uso de dispositivos com micro agulhas é um método invasivo, onde a barreira do estrato córneo é transpassada, sendo a substância inserida bem abaixo da barreira. As micro agulhas do dispositivo transdérmico podem ser de silício sólido, sendo revestidas com a substância de interesse ou de metal com furos por onde escoam a substância contida em uma solução. Estas micro agulhas penetram na camada córnea sem danificá-la ou rompê-la. Essa técnica pode ser empregada juntamente com a iontoforese, sendo grande interesse em estar o dispositivo acoplado a um micro chip para que haja um controle da liberação da substância pelas micro agulhas (BARRY, 2001).

7 FATORES QUE INFLUENCIAM A LIBERAÇÃO/PENETRAÇÃO CUTÂNEA

A taxa de penetração cutânea de uma substância depende tanto das características biológicas da pele quanto das propriedades físico-químicas deste composto e do veículo que o contém e que entra em contato com sua superfície. Ou seja, a penetração depende, basicamente da pele, do fármaco e do veículo (BARRY, 1983).

7.1 Pele

Dependendo da idade do indivíduo, sua pele pode ser mais ou menos permeável. Em geral, pele de recém-nascidos, crianças e idosos são mais permeáveis que a pele de adultos (BARRY, 1983; GUIMARÃES, 2001).

O sítio anatômico também pode influenciar na permeabilidade da pele. Isto porque a espessura, a natureza do estrato córneo e a densidade de apêndices varia com a região anatômica. Em geral, a espessura média do estrato córneo é de 10 μ m, mas pode variar, sendo 8.9 μ m na região do abdômen, 9.4 μ m nas costas, 10.9 μ m na coxa e 12.9 μ m no antebraço. As palmas das mãos e a planta dos pés pode chegar a apresentar o estrato córneo com espessura entre 400 a 600 μ m (BARRY, 1983).

O estado e a condição da pele é outro fator que pode alterar a penetração cutânea. Doenças de pele que caracterizam problemas no estrato córneo, inflamação e alteração da queratinização levam ao aumento da permeabilidade da pele. Contrariamente, condições onde há um espessamento do estrato córneo, tais como ictiose ou regiões de calosidade, diminuem a penetração de substâncias na pele (BARRY, 1983).

Em estudo comparativo, a pele asiática foi comparada a pele negra e caucasiana. Não foram encontradas diferenças significativas na estrutura do estrato córneo, responsável pela função barreira da pele. A descamação do

estrato córneo entre asiáticos e caucasianos foi praticamente a mesma, porém, maior em negros (YOSIPOVITCH, THENG, 2002).

O estado de hidratação da pele pode influenciar na sua permeabilidade. Quanto maior o grau de hidratação da pele, maior a penetração de substâncias através da mesma. Embora o exato mecanismo pelo qual a penetração cutânea é aumentada não esteja bem esclarecido, sabe-se que a hidratação causa aumento do tamanho dos queratinócitos, aumento da temperatura da região e altera o equilíbrio entre a água e a matriz lipídica do estrato córneo. Todos estes efeitos levam à redução da função barreira do estrato córneo (HAIGH, SMITH, 1995).

Sob condições normais, o estrato córneo é parcialmente hidratado. Agentes hidratantes, umectantes, oclusivos ou veículos capazes de evitar a perda transepidérmica de água aumentam o conteúdo de água no estrato córneo (HAIGH, SMITH, 1995).

7.2 Fármaco

As características físico-químicas do fármaco permeante podem influenciar na sua penetração cutânea, pois destas dependem o seu comportamento no veículo, assim como sua interação com as membranas da pele (BARRY, 1983).

Em geral, moléculas grandes se difundem lentamente através do estrato córneo. Substâncias com boa solubilidade tanto em óleos quanto em água apresentam alta permeabilidade (HADGRAFT, 2004).

Moléculas com propriedades lipofílicas e hidrofílicas provavelmente penetram no estrato córneo mais rapidamente, pois há uma evidência da existência de domínios lipofílicos e hidrofílicos na barreira da pele (GWAK, CHUN, 2002).

Muitos permeantes são ácidos fracos ou bases fracas. A penetração irá depender do grau de ionização e como esta ionização influencia na solubilidade do permeante no veículo e na sua partição na pele. Há poucos

estudos que investigam este fato, mas há indícios de que há maiores vantagens em termos de penetração se o fármaco for empregado na sua forma ionizada. Além disso, a presença de alguns íons poderia ter certa influência na polaridade dos lipídeos das bicamadas do estrato córneo, levando a uma promoção da penetração de moléculas com carga (HADGRAFT, 2004).

Além disso, alguns fármacos podem também participar da microestrutura do sistema do veículo, devido às interações moleculares, principalmente se este apresentar propriedades anfifílicas e/ou mesogênicas, influenciando na penetração cutânea (MULLER-GOYMANN, 2004).

7.3 Veículo

A composição da formulação pode alterar a liberação de ativos do veículo e a sua penetração através da pele. Produtos para uso tópico geralmente contêm diversos excipientes, tais como agentes tensoativos, emolientes, conservantes, quelantes, antioxidantes, espessantes e umectantes. Qualquer destes adjuvantes pode interagir com o fármaco e com a pele e exercer grande influência na sua liberação e penetração (BARRY, 1983).

A penetração cutânea de ativos depende de certas características da formulação do veículo. Dentre estas características, estão o pH e a viscosidade (SILVA, CAMPOS, 2001).

Em estudo de penetração cutânea *in vitro* com células de Franz e pele de cobaias, utilizando um gel não iônico de ácido ascórbico, verificou-se que a quantidade de ativo que permeou variou de acordo com o pH da formulação (SILVA, CAMPOS, 2001).

Para substâncias não iônicas, o pH da formulação não exerce efeito considerável na penetração, ao contrário do que ocorre com compostos ionizáveis, onde o efeito do pH é fator determinante. Dependendo do pH da

formulação, a substância pode se apresentar ionizada ou não ionizada. As moléculas não ionizadas e, portanto, sem carga, apresentam maior penetração cutânea que as carregadas (ZATZ, 1991).

Outra característica da formulação que pode levar a um aumento da penetração é o fato de o veículo promover oclusão. A vaselina sólida é o veículo oclusivo mais conhecido e mais eficaz (ZATZ, 1995). Com a oclusão, há diminuição da perda transepidérmica de água, levando a um aumento do grau de hidratação da pele, o que ocasiona maior penetração (BENDAS, NEUBERT, WOHLRAB, 1995).

Veículos contendo fosfolipídeos podem formar estruturas coloidais que podem influenciar na liberação e penetração cutânea de substâncias. O fármaco pode participar da microestrutura do sistema e, dependendo da concentração da mesma, dos fosfolipídeos e da quantidade de água, pode-se obter vários tipos de estruturas coloidais, tais como vesículas multilamelares, cristais líquidos e microemulsões (KRIWET, MULLER-GOYMANN, 1995).

Em um estudo *in vitro*, KRIWET, MULLER-GOYMANN, 1995, correlacionaram a estrutura coloidal do veículo com a liberação do diclofenaco dietilamina do mesmo e com a penetração através do estrato córneo humano. Para microemulsões, onde há menor concentração de fosfolipídeos, observou-se que a liberação do ativo é mais rápida e para géis isotrópicos, com alta concentração de fosfolipídeos, a liberação foi mais lenta, devido à alta viscosidade do veículo e do maior número de camadas lamelares formadas. Quanto à penetração, houve relação linear entre a taxa de liberação e o coeficiente de permeabilidade do diclofenaco através do estrato córneo. Portanto, os autores concluíram que a composição do veículo contendo diclofenaco influenciou tanto a liberação como a penetração.

8 MÉTODOS EMPREGADOS NA AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO/PENETRAÇÃO

A penetração de substâncias através do estrato córneo pode ser medida por técnicas *in vitro* ou *in vivo*.

Freqüentemente é muito difícil mensurar a penetração tópica de uma substância *in vivo*, pois a quantidade penetrada é, muitas vezes, muito baixa e as técnicas não invasivas não são sensíveis o suficiente para detectá-las (HADGRAFT, 2004).

As técnicas *in vitro* têm sido freqüentemente utilizadas devido à maior facilidade e controle das condições experimentais, se comparadas a métodos *in vivo*. A coleta de amostras utilizando células de difusão pode ser realizada com maior precisão e facilidade, ao contrário da amostragem sanguínea, coleta de urina ou fezes durante os experimentos *in vivo* (BRONAUGH, COLLIER, 1993). Além disso, as técnicas *in vivo* determinam a penetração e a absorção de substâncias de modo indireto, ou seja, muitas vezes o fármaco é antes metabolizado pelo organismo e o tempo para a coleta da droga excretada deve ser suficiente para que não ocorram erros (BARRY, 1983). Entretanto, a precisão das técnicas *in vitro* depende da própria metodologia em termos de modelo de membrana, condição experimental e método analítico (WISSING, MULLER, 2002).

8.1 Métodos *in vitro* de liberação/penetração de fármacos

Idealmente, os testes de produtos para uso tópico deveriam ser realizados *in vivo*, em humanos, o que é praticamente impossível, principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento de uma formulação, onde a toxicidade e o potencial de irritação de novos fármacos ou produtos não estão bem estabelecidos (KRIWET, PARENTEAU, 1996).

Devido às dificuldades das metodologias *in vivo*, as técnicas *in vitro* para determinação da velocidade de penetração de substâncias foram

desenvolvidas, apresentando algumas vantagens, pois várias formulações podem ser testadas e avaliadas em um período de tempo relativamente curto e a baixo custo. Entretanto, os testes de liberação *in vitro* não podem substituir estudos clínicos ou ensaios de biodisponibilidade (ZATZ, 1998).

Estudos de liberação/penetração cutânea *in vitro* são bastante úteis durante a fase de desenvolvimento de produtos para uso tópico.

Os objetivos dessa metodologia *in vitro* são a seleção e otimização da formulação, a avaliação da exposição dérmica a substâncias químicas tóxicas e a avaliação do efeito das substâncias na função barreira da pele (KRIWET, PARENTEAU, 1996).

O método padronizado mais aceito para monitoramento de produtos farmacêuticos semi-sólidos é a determinação da velocidade de liberação de fármaco em relação ao tempo. Recentemente, com o aumento do interesse e com a recomendação do FDA (UNITED STATES, 1998), é de grande importância o uso de sistema de difusão em células de Franz para a liberação de fármacos de preparações de uso tópico (SOLICH, OGROCKA, SCHAEFER, 2001). As células de difusão de Franz (Figura 13) são constituídas de um compartimento doador e outro receptor, separados por uma membrana artificial ou natural (MOSER *et al.*, 2001a).

Figura 13. Esquema da célula de difusão para estudos de liberação/penetração *in vitro* (www.hansonresearch.com).

De modo geral, nos estudos de liberação/penetração cutânea *in vitro*, a pele ou membrana sintética é posicionada sobre uma célula de difusão. A formulação é aplicada sobre a superfície da membrana, permitindo que o fármaco difunda-se através da membrana artificial ou natural para uma solução receptora. Em intervalos de tempos pré-estabelecidos, amostras da solução receptora são coletadas do compartimento receptor e o fármaco é quantificado por metodologia analítica adequada (BENTLEY, 1994; WIECHERS, 2000).

Os estudos de liberação têm como objetivo verificar como os fármacos são liberados do veículo sob as condições do teste (ADEMOLA, 1997). Os estudos de liberação de semi-sólidos *in vitro* podem ser considerados como equivalentes aos estudos de dissolução de formas farmacêuticas sólidas. Em ambas as técnicas, a cinética de liberação da substância ativa de uma forma farmacêutica é determinada (ZATZ, 1998). Geralmente, são utilizadas membranas sintéticas, sendo que estes estudos são empregados como uma ferramenta para o controle de qualidade lote a lote e para prever a toxicidade de formulações de uso tópico (ADEMOLA, 1997).

Nos estudos de penetração cutânea *in vitro*, a formulação deve ser aplicada sobre a superfície de fragmentos de pele durante um tempo que simule a exposição. Produtos enxaguáveis devem ser mantidos por apenas alguns minutos, enquanto produtos *leave-on* devem permanecer por um tempo de exposição de pelo menos 24 horas (BRONAUGH, YOURICH, 2000).

Antes do final do estudo, a formulação é removida da superfície da pele com um solvente adequado. A pele poderá, então, ser fracionada em diferentes camadas e o fármaco é extraído e quantificado para que se determine a localização do material permeado. Nos estudos de metabolismo, quantifica-se o metabólito em amostras de fluido receptor e pele utilizando cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia em camada delgada (BRONAUGH, YOURICH, 2000).

Também é importante determinar a recuperação ao final do experimento. A recuperação é a soma da quantidade de material não penetrado removido da superfície da pele, a quantidade de material que ficou retida na pele e no fluido receptor. A recuperação deve ser de pelo menos 80% da dose aplicada (BRONAUGH, YOURICH, 2000).

Em um estudo envolvendo 12 compostos de diferentes propriedades físico-químicas, verificou-se que há uma boa correlação dos dados de perfil de penetração obtidos *in vivo* e *in vitro*. O estudo *in vitro* utilizou como membrana a pele humana e foram utilizadas células de difusão (FRANZ, 1975).

Embora seja observada uma boa correlação *in vivo/in vitro*, KIERSTAN *et al.*, 2001, desenvolveram um método espectrofotométrico para estudar os processos de penetração de substâncias através de membranas. Nesse sistema, utilizou-se um modelo diferente de célula de difusão, onde não há a necessidade de consecutivas amostragens da solução receptora para se obter o perfil de penetração.

8.1.1 Aparelhos utilizados nos métodos de difusão *in vitro*

Há vários tipos de aparelhos de diversos modelos empregados nos experimentos de liberação/penetração *in vitro*. Estes aparelhos são denominados células de difusão, que podem apresentar diferentes tipos de funcionamento. Em geral, há dois tipos principais: as células de difusão de compartimento único e as de dois compartimentos.

Os sistemas de dois compartimentos apresentam um compartimento doador, onde é adicionado o produto semi-sólido, e o compartimento receptor, onde se situa a solução receptora, que será amostrada em diferentes intervalos de tempo durante o estudo (ZATZ, 1998).

Basicamente, podem ser constituídos de sistema estático ou de sistema de fluxo contínuo. No sistema estático, o volume de solução receptora é mantido sempre constante, onde a cada volume de coleta, há a

reposição deste volume. Já no sistema de fluxo contínuo, a solução receptora é constantemente renovada, mantendo-se um fluxo constante. Ambos os tipos de células de difusão podem ser utilizados para estudos com dose finita ou infinita.

Figura 14. Célula de difusão de fluxo contínuo para estudos de liberação/penetração *in vitro* (www.hansonresearch.com).

As células de Franz (Figura 14) são células de difusão verticais de dois compartimentos modificadas, constituídas de material inerte, como o vidro ou Teflon. Apresentam, externamente, uma jaqueta de vidro por onde circula a água de um banho térmico para manutenção da temperatura do sistema. No compartimento doador, é adicionado o produto a ser testado, na superfície de uma membrana. No compartimento receptor, a solução receptora é constantemente mantida sob agitação por meio de uma barra magnética e um espiral. Pelo braço coletor, são retiradas amostras da solução receptora em intervalos de tempo pré-determinados. O braço de reposição permite que o mesmo volume coletado de solução receptora seja repostado no compartimento receptor com nova solução receptora (ZATZ, 1998).

Esse tipo de célula de difusão pode ser encontrado em um sistema de coleta automática da Hanson Research, o equipamento Microette® (Figura 15). Nesse sistema, em intervalos de tempo programados, a agitação da

solução receptora é interrompida, um determinado volume de nova solução receptora é injetado na célula de difusão por um sistema de bombeamento por seringas e o mesmo volume de solução receptora do compartimento receptor é coletado por um tubo de coleta diretamente para *vials* dispostos ordenadamente em um carrossel (ZATZ, 1998).

Figura 15. Equipamento de penetração cutânea Microette® com 6 células de difusão (www.hansonresearch.com).

Em 1987, o FDA e o *American Association of Pharmaceutical Scientists* publicaram recomendações para condução de estudos de penetração cutânea. Quanto ao *design* das células de difusão utilizadas nos estudos *in vitro*, recomenda-se que sejam constituídas de material inerte, como vidro, aço inoxidável ou Teflon. Deve-se assegurar que não há perdas do fármaco durante a condução do estudo e a célula de difusão deve permitir a total homogeneização da solução receptora, assim como o controle de temperatura do sistema (ZATZ, 1998).

8.1.2 Membranas utilizadas nos estudos de liberação/penetração *in vitro*

8.1.2.1 Membranas sintéticas

As membranas sintéticas são utilizadas nos estudos de liberação de substâncias do veículo. São estáveis e apresentam grande uniformidade entre os lotes produzidos e obtidos comercialmente (HAIGH, SMITH, 1994).

A membrana a ser utilizada deve ser inerte. Na sua escolha, deve-se considerar também a solução receptora mais adequada ao tipo de estudo, pois deve haver compatibilidade entre membrana, solução receptora e fármaco. Além disso, as membranas utilizadas nos estudos de liberação são porosas, adsorvendo a solução receptora, que se torna parte da membrana. O fármaco deve migrar da forma farmacêutica para a superfície da membrana e desta para o líquido que preenche seus poros antes de atingir o compartimento receptor, onde ocorre a coleta (ZATZ, 1998). Essa difusão depende do tamanho e forma molecular do fármaco e de suas interações eletrostáticas com a membrana (HAIGH, SMITH, 1994).

Vários tipos são utilizados, como membranas de nylon, acetato de celulose, mistura de ésteres de celulose, PVDF, PTFE, polipropileno, polissulfone e copolímeros acrílicos. Geralmente, o tamanho do poro é de 0,45 μm , mas pode haver variação, dependendo da substância estudada (ZATZ, 1998).

As membranas de acetato de celulose são hidrofílicas, utilizadas para o estudo de liberação de substâncias hidrofílicas, de tamanho entre 8000 a 15000 daltons. Contém vários aditivos como plastificantes e conservantes, que podem interferir no teste de liberação. Para eliminar estes aditivos, deve-se preparar a membrana, fervendo-a em água purificada, pois, normalmente, estes são compostos solúveis em água (HAIGH, SMITH, 1994).

CARR, CORISH, CORRIGAN, 1997, realizaram um estudo com tubos de diálise de acetato de celulose (Visking® cellulose) e pele humana de

cadáver (estrato córneo) para comprovar que o veículo influencia na liberação e penetração de sulfato de salbutamol e nicotina.

As membranas de nitrato de celulose também são utilizadas para o estudo de substâncias hidrofílicas. Apresentam porosidade de 0,20 a 0,45 μm . Deve-se estabilizá-las no fluido receptor previamente ao teste (HAIGH, SMITH, 1994).

As membranas de nitrato de celulose previamente impregnadas com miristato de isopropila podem simular a barreira do estrato córneo. SANTOYO *et al.*, 1996, utilizaram essa membrana artificial e realizaram o ensaio de penetração com piroxicam, comparando os resultados obtidos com a pele de rato. Verificaram que, embora o fluxo seja maior através da membrana artificial, há correlação entre os resultados, concluindo que a membrana de nitrato de celulose impregnada com miristato de isopropila pode ser utilizada no screening de formulações para prever a penetração de piroxicam.

Membranas de elastômero de silicone (Silastic Sheet[®], Dow Corning) são membranas lipofílicas, de baixa porosidade e altamente permeáveis a substâncias não ionizáveis. São relativamente inertes e sua natureza lipofílica representa um meio ideal para a partição e difusão de fármacos lipofílicos (HAIGH, SMITH, 1994).

Algumas membranas poliméricas artificiais foram preparadas e testadas a fim de prever a penetração de substâncias tanto lipofílicas quanto hidrofílicas. YAMAGUCHI *et al.*, 1997, prepararam uma membrana polimérica para mimetizar a pele. Esta membrana apresentava domínios lipofílicos e hidrofílicos, sendo constituída de polidimetilsiloxano polimetilacrilato (parte lipofílica) e poli-2-hidroximetacrilato (parte hidrofílica). Verificaram o comportamento da membrana em relação à penetração de vários fármacos de diferentes propriedades físico-químicas e compararam com a pele humana e a de rato sem pêlo. Concluíram que houve grande correlação entre os resultados do modelo artificial e da membrana humana.

8.1.2.2 Membranas naturais

Nos estudos de permeação ou penetração cutânea são utilizadas as membranas naturais.

A pele humana é a melhor membrana a ser utilizada nos estudos de penetração cutânea, pois nenhum modelo animal fornece resultados de valores de penetração idênticos àqueles obtidos com pele humana (BRONAUGH, YOURICH, 2000). Há, entretanto, algumas desvantagens, pois é necessário uma aprovação legal para o uso deste tipo de membrana, além de haver grande variabilidade entre as peles de diferentes indivíduos e de diferentes sítios anatômicos, além da presença de metabolismo e biotransformação. Podem-se utilizar a pele inteira, o estrato córneo mais epiderme ou somente o estrato córneo (HAIGH, SMITH, 1994).

A pele inteira é obtida de cadáveres ou de cirurgia de redução de mamas ou abdômen por meio da dermatomização. Apresenta espessura de aproximadamente 500 μm . Nos estudos em que se utiliza pele inteira, deve-se considerar que no organismo o fármaco não necessita atravessar a derme, pois a vascularização desta região já permite absorção. Portanto, esta é uma barreira adicional à difusão do fármaco introduzida pela metodologia *in vitro*, principalmente para substâncias lipofílicas (HAIGH, SMITH, 1994).

Nesses casos, utiliza-se o estrato córneo mais epiderme, obtidos com a dermatomização ou com o método de separação por calor. Na dermatomização, obtém-se, com uso de dermatômetro, a espessura de 200 μm , que contém estrato córneo e parte superior da epiderme. No método enzimático, a pele é aquecida a 60°C durante 1 minuto. Após este tratamento, o estrato córneo mais epiderme separa-se facilmente da derme com auxílio de um bisturi. O estrato córneo é utilizado isoladamente quando se sabe que este é a principal barreira para a substância estudada. O estrato córneo é obtido com a degradação do tecido viável por enzimas ou pelo uso do *tape stripping* (HAIGH, SMITH, 1994).

A pele humana pode ser estocada congelada por períodos prolongados de tempo e, no momento do uso, deve ser descongelada à temperatura ambiente (HAIGH, SMITH, 1994). Também pode ser utilizada sem congelamento, até 24 h após sua obtenção e mantida apenas refrigerada a 4°C. Verificou-se que a permeabilidade da pele estocada por 1 ano a -20°C se mantém a mesma que a pele não congelada (BRONAUGH, STEWART, 1986).

Devido à limitação do fornecimento de pele humana e à necessidade de aprovação do projeto do estudo por um Comitê de Ética em Pesquisa, há vários estudos que correlacionam e comparam diferentes modelos de peles de animais para os experimentos de penetração cutânea *in vitro* (BRONAUGH, STEWART, CONGDON, 1982; LIN *et al.*, 1992).

BRONAUGH, STEWART, CONGDON, 1982, determinaram a densidade de folículos pilosos e a espessura da pele de vários animais e correlacionaram sua permeabilidade com a da pele humana. Verificaram que, quanto mais espesso o estrato córneo, menor a constante de permeabilidade da membrana (Tabela 1).

Deve-se considerar que a pele de animais é muito diferente da pele humana em termos de espessura e composição do estrato córneo, principalmente na densidade de folículos pilosos e glândulas (Tabela 2). Portanto, são mais permeáveis que a humana (HAIGH, SMITH, 1994) e, particularmente para substâncias lipofílicas, apresentam pouca correlação *in vivo/in vitro* (BRONAUGH, STEWART, 1986).

Os modelos animais podem, entretanto, ser utilizados em estudos preliminares ou durante a fase de desenvolvimento de formulações de uso tópico como um *screening* (BRONAUGH, YOURICH, 2000).

Tabela 1 – Diferenças na espessura da pele humana e de animais (HAIGH, SMITH, 1994).

Espécie		Estrato córneo (μm)	Epiderme (μm)	Pele inteira (μm)
Humana		16,8	46,9	2,97
Porco		26,4	65,8	3,43
Rato (Fêmea)				
Dorso		18,4	32,1	2,09
Abdomen		13,7	34,8	0,92
Rato (Macho)				
Dorso		34,4	61,1	2,80
Abdômen		13,8	30,4	1,66
Camundongo	sem	8,9	28,6	0,70
pêlo				
Camundongo		5,8	12,6	0,84

Tabela 2 – Densidade e tamanho dos folículos pilosos da pele humana e de animais (BRONAUGH, STEWART, CONGDON, 1982).

Espécie		Sítio Anatômico	Número de folículos/ cm^2	Diâmetro dos folículos (μm)
Humana		Abdomen	11 ± 1	97 ± 3
Porco		Costas	11 ± 1	177 ± 4
Rato		Costas	289 ± 21	25 ± 1
Camundongo	sem	Costas	75 ± 6	46 ± 1
pêlo				
Camundongo		Costas	658 ± 38	26 ± 1

A pele de vários animais como o rato, o camundongo sem pêlo, porco, cobra e coelho já foi utilizada em estudos de penetração cutânea (BRONAUGH, STEWART, CONGDON, 1982; LIN *et al.*, 1992).

A permeabilidade da pele humana foi comparada a uma membrana sintética de celulose e a diferentes tipos de peles de animais em um estudo de penetração *in vitro* utilizando os fármacos teofilina, diclofenaco de sódio e ácido benzóico. Foram testados estrato córneo e epiderme viável de sapo, pele de cobra, camundongo sem pêlo, ratos Sprague-Dawley e pele de porco. Essas membranas foram comparadas à pele humana obtida da região da coxa e prepúcio. As membranas mais permeáveis foram a sintética e a pele de sapo. Com todos os fármacos testados, a pele humana foi a menos permeável (LIN *et al.*, 1992).

A pele de animais do grupo dos roedores é uma membrana conveniente e mais facilmente obtida devido à possibilidade do uso de animais isogênicos e menor custo. No caso de fármacos antiinflamatórios esteróides, a pele de camundongo sem pêlo tem sido intensamente utilizada devido a sua similaridade com a pele humana em termos de penetração (BRONAUGH, STEWART, CONGDON, 1982).

BRONAUGH, STEWART, SIMON, 1986, verificaram a penetração *in vitro* e *in vivo* de vários tipos de compostos através de diferentes membranas dermatomizadas. Foram testadas a pele humana dermatomizada (200 μm), a pele de rato não estocada e com remoção de pêlos (300 μm), a pele de ratos Fuzzy não estocada e sem remoção de pêlos (200 μm) e a de camundongo sem pêlos inteira e não estocada. Dentre essas membranas, a mais permeável foi a de camundongo sem pêlo e a menos permeável foi a pele humana. A melhor correlação com o estudo *in vivo* foi obtida quando se utilizou a pele humana nos estudo *in vitro*. Conclui-se também que a pele de rato dermatomizada com espessura menor que 350 μm apresenta dano quanto à integridade.

Quando se utilizam membranas animais para os testes de segurança e eficácia de produtos, os resultados podem ser superestimados, pois estas membranas são muito mais permeáveis que a pele humana, devido à sua organização. SCOTT, WALKER, DUGARD, 1986, compararam a permeabilidade da pele humana à de animais laboratoriais como rato, rato sem pêlo, camundongo sem pêlo, cobaios e coelhos. Para isso, empregaram

duas substâncias, a água com hidrogênio marcado e o íon dicloreto de paraquat. Utilizando células de difusão, concluíram que, para a água com hidrogênio marcado, a permeabilidade de todas as membranas é semelhante, exceto para a pele de cobaio, que foi muito mais permeável que a pele humana. Para o dicloreto de paraquat, todas as membranas foram mais permeáveis que a pele humana (na ordem de 40 vezes), sendo a de camundongo sem pêlo a mais permeável.

A pele de camundongo é de fácil obtenção, relativamente mais barata quando comparada a outras espécies e de fácil manuseio. Como desvantagem, é mais permeável que a pele humana e o estrato córneo é menos espesso (HAIGH, SMITH, 1994).

BRONAUGH, STEWART, CONGDON, 1982, verificaram que para substâncias de rápida penetração, a pele de camundongos é muito mais permeável que a pele humana, a de camundongos sem pêlos e a de mini porcos.

A pele de camundongos sem pêlo apresenta maior similaridade à pele humana que o de camundongo em relação ao número de folículos pilosos. Animais homozigóticos que possuem o gen recessivo *hr* desenvolvem uma capa de pêlos e, com 10 dias de vida, os pêlos são perdidos do folículo. Esparsamente, pêlos finos nascem em diferentes estágios da vida do animal, mas também são logo perdidos. O número e o diâmetro dos folículos pilosos se aproxima muito da pele humana e uma grande vantagem quando se trabalha com este animal é a possibilidade de se utilizar animais isogênicos. Normalmente, é utilizada a pele inteira, pois a pele é bem menos espessa que a humana, sendo impossível separar o estrato córneo da epiderme ou dermatomizá-la. Uma desvantagem desse modelo é apresentar um estrato córneo bem menos espesso sendo, portanto, muito mais permeável (HAIGH, SMITH, 1994).

A pele de rato também é de fácil obtenção, relativamente barata e de fácil manuseio. Pode-se utilizar a pele dermatomizada ou inteira, sendo esta última mais empregada. Verificou-se que o comportamento é similar à pele humana para algumas substâncias, apresentando adequada correlação *in*

vivolin vitro. Porém, como desvantagens, apresenta grande variabilidade e é mais permeável que a pele humana (HAIGH, SMITH, 1994).

Em um estudo comparativo entre a permeabilidade da pele humana e a pele de rato, foram utilizados vários promotores de absorção (n-metil 2-pirrolidona, DMSO, lauril sulfato de sódio, dodecil-L-pirolglutamato e dodecilazacicloheptan-2-ona). Para todos os promotores empregados, verificou-se que a pele de rato é muito mais permeável que a pele humana, sendo que, para alguns promotores, o aumento de absorção foi de até 4 vezes (PRÍBORSKÝ, MÜHLBACHIAVÁ, 1990).

Poucos autores realizaram trabalhos com pele de porco-da-Índia. A pele destes animais é histologicamente muito semelhante à pele humana, porém, é mais permeável (HAIGH, SMITH, 1994).

A pele de coelhos também foi testada em estudos de penetração cutânea. É um bom indicador de toxicidade dermal, devido à rápida absorção, porém, é muito mais permeável que a pele de outros modelos animais e que a humana. Portanto, apresenta pouca correlação *in vivo/in vitro* (HAIGH, SMITH, 1994).

Devido à grande correlação e semelhança à pele humana, tanto histologicamente quanto em termos de permeabilidade, a pele de macaco também é uma alternativa interessante. Entretanto, devido ao difícil manuseio dos animais em laboratório, este modelo é pouco utilizado (HAIGH, SMITH, 1994).

O modelo animal mais relevante é o porco ou mini-porco, devido suas semelhanças com a pele humana, tanto histologicamente quanto às propriedades bioquímicas e densidade de folículos pilosos. Além disso, há vários estudos que comprovam a similaridade da permeabilidade da pele humana a pele de porco, principalmente quando se utiliza a pele dermatomizada em vez da pele inteira (HADGRAFT, 2004).

SEKKAT, KALIA, GUY, 2002, avaliaram as propriedades biológicas da pele de orelha de porco para verificar a correlação com a pele humana. Utilizaram as medidas de impedância e de perda transepidérmica de água (TEWL) para avaliação da barreira. Após retirada do estrato córneo, pela

técnica de *tape stripping*, a perda transepidermal de água aumentou em 5 vezes, indicando um aumento da permeabilidade devido à ausência da função barreira da pele. À medida que o estrato córneo foi removido, a impedância, em um primeiro momento, diminuiu rapidamente e, em seguida, mais gradualmente. Tanto para os resultados de impedância quanto para as medidas de perda transepidermal de água, houve grande correlação com os resultados obtidos *in vivo* com pele humana.

Em um estudo *in vivo*, BARTEK, LABUDDE, MAIBACH, 1972, compararam a permeabilidade da pele humana com pele de porco, rato e coelho. Verificou-se que a pele de porco foi a membrana que mais se assemelhou à pele humana, em termos de permeabilidade. As peles de coelho e rato foram as mais permeáveis.

De fato, a permeabilidade da pele de porco é bastante similar à humana, incluindo o seu comportamento na presença de alguns promotores de penetração. ANDEGA, KANIKKANNAN, SINGH, 2001, verificaram o efeito promotor de alguns álcoois graxos em pele de porco e em pele humana, utilizando a melatonina como permeante modelo. Observaram que há uma relação entre o comprimento da cadeia carbônica e o efeito promotor do álcool graxo, tanto na pele de porco quanto na humana. O máximo efeito promotor foi observado com álcoois graxos com cadeias de 10 átomos de carbono e que, em geral, com o aumento do nível de insaturação, aumenta o efeito promotor da melatonina. Essa ação, porém, é diminuída quando há ligações triplas na molécula do álcool graxo.

PRÍBORSKÝ, MÜHLBACHOVÁ, 1990, utilizando n-metil 2-pirrolidona como promotor de absorção, comparou a permeabilidade da pele humana com a de vários animais (rato, camundongo, porco e coelho). Verificou que a pele humana é a menos permeável e a pele de roedores, a mais permeável. A membrana que mais se assemelhou à humana, neste estudo, foi a pele de porco.

Várias substâncias podem apresentar velocidade de penetração semelhantes quando se utiliza o estrato córneo humano e a pele de cobra. De fato, é utilizado somente o estrato córneo da cobra, que é descartado

naturalmente durante sua muda. Com isso, não há prejuízo do animal e a amostra de estrato córneo não necessita de prévio tratamento químico ou estresse de temperatura antes do seu uso. Além disso, como o animal sofre várias mudas ao longo da vida, é possível obter amostras de estrato córneo de um mesmo indivíduo, eliminando as variações interindividuais (HAIGH *et al.*, 1998). Como o tecido não é vivo, pode ser mantido em temperatura ambiente por relativamente longos períodos de tempo e pode ser facilmente transportado. Devido à ausência de folículos pilosos, não haverá a penetração via apêndices (HAIGH, SMITH, 1994).

A pele de cobra apresenta escamas rígidas, de tamanhos variáveis, dependendo da espécie e da região do corpo. Com o emprego da microscopia eletrônica, HAIGH *et al.*, 1998, examinaram as superfícies do estrato córneo de três espécies de cobras. As escamas da parte dorsal são menores que da superfície ventral e a espessura do estrato córneo da região ventral é maior que o da região dorsal, fato que se explica por a cobra rastejar e necessitar de um estrato córneo resistente à atritos. Nesse mesmo estudo, os autores realizaram estudos da penetração de progesterona, comparando o estrato córneo de três espécies de cobra. Avaliaram também se haveria diferenças significativas ao se utilizar a região ventral ou dorsal. Verificaram que o estrato córneo da região dorsal é mais permeável que o da região ventral para as espécies *Naja melanoleuca* e *Python sebae natalensis*, entretanto, para a espécie *Bitis nasicornis*, não houve diferenças significativas. Além disso, concluíram que a penetração da progesterona é diferente quando são utilizadas espécies diferentes de cobras (HAIGH *et al.*, 1998).

Devido a esses problemas, o estrato córneo de cobra não pode ser utilizado como um modelo geral para substituir a pele humana em ensaios de penetração cutânea, embora as estruturas dos estratos córneos sejam muito semelhantes (HAIGH *et al.*, 1998).

O melhor modelo animal para os estudos de penetração depende do composto de interesse e do veículo utilizado (BRONAUGH, STEWART, CONGDON, 1982).

Seja qual for a membrana natural utilizada nos estudos de absorção/penetração cutânea, a integridade da barreira é extremamente importante para a condução do experimento. Esta pode ser verificada através de métodos físicos, como determinação da Perda Transepidérmica de Água (TEWL) (UNITED STATES, 1998).

8.1.2.3 Membranas obtidas por engenharia de tecidos

As membranas de epiderme humana reconstituída obtidas por engenharia de tecidos representam novas alternativas para os estudos de penetração e penetração de substâncias. São tecidos gerados *in vitro* que mimetizam o tecido de origem (PONEC *et al.*, 2000).

A pele artificial pode ser obtida a partir de células epidermais humanas. REGNIER *et al.*, 1993, reconstituíram a epiderme *in vitro* a partir de pele obtida de cirurgia plástica. O modelo *in vitro* foi comparado ao estrato córneo humano quanto à permeabilidade. Verificou-se que a epiderme reconstituída apresenta propriedades qualitativas semelhantes à pele humana, porém, é quantitativamente mais permeável.

Comparando microscopicamente a pele reconstituída com a pele humana, verifica-se que há grande semelhança em termos de morfologia e arquitetura dos tecidos. Marcadores de diferenciação e ultra-estruturas clássicas estão presentes em sítios adequados, além de haver toda a expressão dos polipeptídeos característicos de queratina epidermal (REGNIER *et al.*, 1992).

Analizando microscopicamente o estrato córneo do modelo de pele artificial sob polarização, verifica-se que há presença de cruzes malteses, indicando a presença de fases lamelares líquido-cristalinas, assim com as existentes no estrato córneo humano (KRIWET, PARENTEAU, 1996).

GODWIN, MICHNIAK, CREEK, 1997, desenvolveram um método de obtenção de epiderme humana reconstituída, onde os queratinócitos e os fibroblastos humanos são cultivados em uma matriz de colágeno. Avaliaram seu comportamento utilizando hidrocortisona como fármaco modelo e

algumas substâncias como promotores de penetração. Comparando os resultados obtidos com os experimentos realizados com pele de camundongo sem pêlo e com pele humana, verificaram que a pele artificial é muito mais permeável que a pele humana e a de camundongo sem pêlo. A maior correlação foi observada com o promotor azona.

Outro modelo *in vitro* foi construído por WINKLER, MULLER-GOYMANN, 2002, em que um gel de colágeno contendo fibroblastos foi utilizado como um equivalente à epiderme e os queratinócitos como o estrato córneo. Compararam este modelo com a pele humana em um estudo com o ácido δ -aminolevulínico e verificaram que a epiderme reconstituída *in vitro* é mais permeável que o tecido de origem, devido à diferenças estruturais da barreira.

O processo de maturação da função barreira da epiderme humana reconstituída cultivada em um meio quimicamente definido foi avaliada e caracterizada por GARCIA *et al.*, 2002, pela análise morfológica do tecido. Constataram que é necessário um período de, pelo menos, 16 dias na interface ar-líquido para que uma barreira adequada seja formada.

REGNIER *et al.*, 1992, também compararam a permeabilidade da epiderme humana reconstituída com a pele humana utilizando água com hidrogênio marcado. Por meio da medida de fluxo da água através da pele realizada em experimento em células de difusão estáticas, verificaram maior permeabilidade da pele artificial.

Em um estudo de penetração utilizando a cafeína como fármaco modelo, observou-se que o modelo *in vitro* de epiderme é muito mais permeável que a pele humana, porém, este modelo é consistente e reprodutível, pois vários lotes de epiderme humana reconstituída foram analisados durante 1 ano (GARCIA *et al.*, 2002).

Vários modelos *in vitro* de epiderme humana reconstituída também podem ser obtidos comercialmente no mercado. São modelos tridimensionais que procuram mimetizar a epiderme humana tanto estruturalmente quanto bioquimicamente. Os modelos TestskinTM LSE, Skin 2Z2000TM, EpiDermTM e Graftskin LSETM apresentam epiderme e derme

reconstituídos. Já os modelos EpiskinTM e SkinEthicTM HRE apresentam somente a epiderme reconstituída e não apresenta derme.

Nesses modelos, queratinócitos humanos são cultivados em um meio de cultura de tecidos quimicamente definido otimizado, sob um filtro suporte inerte por 17 dias (DE WEVER, CHARBONNIER, 2002).

Para todos os modelos *in vitro* de epiderme humana reconstituída, é importante utilizar um meio de cultura de tecidos quimicamente definido a fim de se evitar a baixa reprodutibilidade entre lotes (DE WEVER, CHARBONNIER, 2002).

PONEC *et al.*, 2000, avaliaram três modelos de pele humana reconstituída obtidos comercialmente: EpiDermTM, SkinEthicTM e EpiskinTM. Foram utilizados os métodos de Microscopia Eletrônica e Cromatografia Líquida em Camada Delgada. Como o uso da Microscopia Eletrônica, observaram a morfologia ultra-estrutural do sistema e concluíram que, em geral, a arquitetura dos tecidos reconstituídos é muito semelhante a da pele humana. Em todos os modelos estão presentes o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso e o estrato córneo. Porém, com a cromatografia líquida em camada delgada, avaliaram a composição dos lipídeos epidermais (fosfolipídeos, glucosfingolipídeos, ceramidas, ácidos graxos livres, lanosteóis e ésteres de colesterol) e verificaram diferenças quantitativas em relação à composição da pele humana, o que pode resultar em maior permeabilidade.

DOUCET, GARCIA, ZASTROW, 1998, avaliaram o modelo de epiderme humana reconstituída SkinEthicTM HRE quanto à difusão de dez substâncias de diferentes propriedades físico-químicas, comparando com os resultados obtidos com pele humana inteira. Verificaram que, para estas substâncias, o modelo *in vitro* é mais permeável que a pele humana e que esse modelo requer ainda uma validação antes de se correlacionar com o *in vivo*.

A pele humana reconstituída também foi testada em comparação à pele humana, pele de rato e de porco. Foram avaliados os modelos SkinEthicTM HRE e Graftskin LSETM, realizando-se um estudo de penetração

in vitro utilizando células de Franz de sistema estático. Foram verificados o perfil de penetração de quatro ativos dermatológicos, o ácido salicílico, a hidrocortisona, o clotrimazol e a terbinafina. Foi concluído que as peles reconstituídas não foram modelos ideais para substituir a pele humana nesses estudos de penetração cutânea e que a pele de porco apresentou resultados semelhantes aos obtidos com pele humana (SCHMOOK, MEINGASSNER, BILLICH, 2001).

De modo geral, poucos estudos têm sido esclarecedores quando se utilizam modelos de epiderme humana reconstituída, mas muitos autores observaram maior permeabilidade destes modelos *in vitro* quando comparados a membranas naturais (HADGRAFT, 2004). Além disso, há poucos trabalhos descritos na literatura que avaliam o efeito do veículo da formulação nestes modelos.

8.1.3 Temperatura

Geralmente, a temperatura da solução receptora é mantida constante a 32°C, temperatura da superfície da pele. Um aumento da temperatura pode resultar em um aumento da taxa de liberação e a utilização de temperaturas diferentes de 32°C (como, por exemplo, 37°C) pode ser justificável. Entretanto, temperaturas altamente excessivas devem ser evitadas, pois pode ocorrer fusão do produto ou podem causar mudanças físicas significativas. Em muitos casos, um determinado laboratório deve decidir qual temperatura utilizar e mantê-la como padrão para todos os estudos de liberação/penetração (ZATZ, 1998).

8.1.4 Solução receptora

Em um estudo utilizando células de difusão de fluxo contínuo, observou-se que o perfil de liberação do fármaco é extremamente dependente da composição da solução receptora (ROLLAND *et al.*, 1992).

A solução receptora ou meio receptor deve coletar o ativo sem limitar seu transporte através da membrana e deve exibir boas propriedades solventes para o ativo em questão. A solubilidade do fármaco deve ser no mínimo dez vezes a concentração mais alta esperada na solução receptora para evitar que a sua solubilidade seja fator limitante do processo de difusão (ZATZ, 1998).

A composição da solução receptora não deve afetar a integridade da barreira ou alterar as propriedades de permeabilidade da pele. Para compostos hidrofílicos, recomenda-se o uso de uma solução salina ou tampão, enquanto que, para moléculas lipofílicas, adiciona-se soro de albumina bovina ou outros cossolventes, tais como tensoativos não iônicos (UNITED STATES, 1998). Embora o etanol a 40% e o metanol a 50% tenham sido freqüentemente utilizados como cossolventes, deve-se considerar que a difusão em sentido contrário pode ocorrer e, com isso,

reduzir a função barreira do estrato córneo (MOSER *et al.*, 2001a). Além disso, uma solução receptora adequada não deve ter alta viscosidade e não deve interferir no método de quantificação do permeante (ZATZ, 1998).

8.1.5 Análise e interpretação dos resultados

A velocidade de penetração de um fármaco do compartimento doador para o compartimento receptor através de membrana é determinada pela medida da quantidade permeada em função do tempo (MOSER *et al.*, 2001a).

9 ESTUDOS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE AGENTES ANTIFÚNGICOS

A penetração de agentes antifúngicos na pele depende de vários fatores como natureza do fármaco, comportamento do veículo, estado e local da pele (GOODMAN, BARRY, 1989).

Quando o mesmo fármaco é veiculado em formulações diferentes, deve-se considerar a concentração do fármaco no veículo, o coeficiente de partição desta substância entre o estrato córneo e o veículo e o coeficiente de difusão deste fármaco no estrato córneo. A concentração do fármaco é importante, pois a taxa de difusão é proporcional à sua concentração no produto. O coeficiente de partição é uma medida da capacidade de o fármaco em liberar-se do veículo e é definido como equilíbrio da sua solubilidade na superfície do estrato córneo e no veículo. O coeficiente de difusão indica a extensão em que a matriz da barreira restringe a mobilidade da substância. Além disso, a penetração cutânea, isto é, a passagem do fármaco através do estrato córneo, envolve sua dissolução no veículo, a difusão deste na forma dissolvida (soluto) no veículo para a superfície da pele e a penetração através das camadas da membrana. Na pele, principalmente no estrato córneo, a passagem é mais lenta e, portanto, é o fator limitante do controle da penetração (GOODMAN, BARRY, 1989).

10 MICOSES SUPERFICIAIS

10.1 Aspectos gerais

Micoses cutâneas superficiais ou “tinhas” são as infecções mais comuns do tegumento cutâneo. São causadas por fungos dermatófitos que comprometem a pele e seus apêndices, principalmente as áreas mais queratinizadas, envolvendo também as semi-queratinizadas e as mucosas. Em geral, as micoses cutâneas são crônicas e podem causar leve resposta inflamatória no local afetado (ABRAMS, HANEL, HOEHLER, 1991; HAY, 1985).

O quadro clínico de uma infecção específica está relacionado com a parte afetada do corpo. Termos descritivos de micoses superficiais referem-se às áreas anatômicas sendo, *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea pedis*, *tinea manuum* (KOVACS, HRUZA, 1995).

Atualmente são conhecidas cerca de 39 espécies de dermatófitos, porém, somente 11 infectam o homem. Vários fatores condicionam a incidência de dermatofitoses, dentre eles, condições ecológicas, promiscuidade, sudação, presença de animais domésticos, água contaminada, entre outras (HAY, 1985).

O termo dermatófito designa fungos geralmente em vida parasitária que têm afinidade pela queratina e dependem da mesma para sobrevivência. As manifestações clínicas são variadas, comprometendo mãos, pés, unhas, região inguino-crural e pele glabra (HAY, 1985).

Os fungos também causam micoses profundas de curso crônico que comprometem estruturas internas, provocando formação de estruturas granulomatosas ricas em células gigantes e estimulando o organismo a produzir anticorpos. São exemplos de micoses profundas: esporotricose, paracoccidioidomicose, criptococose e cromomicose (ABRAMS, HANEL, HOEHLER, 1991).

As micoses superficiais mais comuns são causadas por fungos chamados dermatófitos, como *Cândida albicans* e *Malassezia furfur*, caracterizando várias manifestações clínicas (HAY, 1985).

Incluem-se no diagnóstico de micoses superficiais as ceratofitoses, que são exclusivamente superficiais, como a pitíriase versicolor, apesar de serem causadas por uma bactéria difteróide, também se enquadram nesta classificação (HAY, 1985).

A terapia antifúngica tópica para tratamento de micoses superficiais inclui agentes de diferentes grupos químicos, sendo os mais conhecidos os imidazóis, tais como o cetoconazol, o nitrato de miconazol, o clotrimazol, dentre outros. Também são utilizados os polienos, como nistatina, as alilaminas, como naftifina e terbinafina e as hidroxipiridonas como ciclopirox olamina (KOVACS, HRUZA, 1995).

11 CICLOPIROX OLAMINA

11.1 Descrição

Ciclopirox olamina, também conhecido sob a designação do código Hoe-296 e, mais recentemente sob o nome comercial de Batrafen, é um agente antifúngico aprovado nos EUA, Europa e Japão, para tratamento de várias dermatofitoses (CULLEN *et al.*, 1985; KOCH, 1982).

Pertencente ao grupo das piridonas, ciclopirox olamina é derivado da cicloexilpiridona, uma hidroxipiridona que não apresenta relação estrutural com derivados imidazólicos ou outros agentes antifúngicos comumente utilizados na terapia contra dermatofitoses. Apresenta atividade fungicida e fungistática de amplo espectro, especialmente contra dermatófitos. Além disso, demonstrou-se que ciclopirox olamina também apresenta ação *in vitro* contra a maioria de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Sua atividade antibacteriana

mostrou-se superior se comparada a outros antimicóticos, particularmente contra Gram-negativas (ABRAMS, HANEL, HOEHLER, 1991; KORTING, GRUNDMANN-KOLLMANN, 1997).

Em estudo comparativo com outros agentes antifúngicos, ciclopirox olamina foi o que apresentou ação antifúngica mais rápida (HÄNEL *et al.*, 1998). Em teste *in vitro*, o valor de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de ciclopirox olamina foi determinado e comparado com o do antifúngico clotrimazol. No total, foram testadas 23 espécies de 11 gêneros de fungos patogênicos. Frente a todos os dermatófitos testados, o clotrimazol mostrou-se mais ativo que ciclopirox olamina, comparando-se os valores de CIM. Entretanto, em 4 dentre 9 espécies de leveduras, como *Cândida krusei* ou *Cândida guilliermondii*, ciclopirox olamina apresentou-se mais efetivo que o clotrimazol. Foi observado que ciclopirox olamina apresenta atividade uniforme *in vitro* contra a maioria dos fungos patogênicos testados (HÄNEL, RAETHER, DITTMAR, 1988).

Após avaliação de formulações de cremes contendo antimicóticos, constatou-se que ciclopirox olamina apresenta ação fungicida mais potente. Formulações disponíveis no mercado foram testadas e comparadas quanto à ação *in vitro*. Ciclopirox olamina foi comparado com outros agentes antifúngicos, dentre os quais oxiconazol, naftifina e bifonazol (HÄNEL, RAETHER, DITTMAR, 1988).

11.2 Mecanismo de ação

Ao contrário de outros agentes antifúngicos, o mecanismo de ação de ciclopirox olamina não está relacionado à inibição da biossíntese de esteróis dos fungos (ABRAMS, HANEL, HOEHLER, 1991; KORTING, GRUNDMANN-KOLLMANN, 1997).

Ciclopirox olamina atua capturando compostos essenciais para as células fúngicas e, em altas concentrações, alterando a permeabilidade celular. Ciclopirox olamina fixa-se seletivamente e de forma irreversível em diferentes estruturas e organelas celulares de fungos (parede e membrana celular, mitocôndrias, ribossomos e microssomas). A ação seletiva está baseada na afinidade exclusiva por estas estruturas específicas dos fungos, que são inexistentes ou bioquimicamente diferentes das células humanas (KORTING, GRUNDMANN-KOLLMANN, 1997).

Recentemente, demonstrou-se que a molécula de ciclopirox olamina quelata metais polivalentes como Fe^{3+} e Al^{2+} , sugerindo que seu mecanismo de ação também envolve a inibição de enzimas metais-dependentes e, conseqüente, inibição do metabolismo energético da célula do fungo (KORTING, GRUNDMANN-KOLLMANN, 1997, JUE, DAWSON, BROGDEN, 1985).

11.3 Toxicologia

A toxicidade de ciclopirox olamina foi testada em vários modelos animais. Em teste de toxicidade aguda, uma solução a 1% foi aplicada por 24 horas em coelhos e os animais não apresentaram indícios de toxicidade local ou sistêmica. A toxicidade a longo prazo foi testada pela aplicação desta solução em coelhos saudáveis durante 20 dias. O maior efeito adverso observado foi a presença de áreas ligeiramente ruborizadas na pele dos animais (KORTING, GRUNDMANN-KOLLMANN, 1997).

Administrações subcutâneas de ciclopirox olamina até 10 mg/kg em ratos causaram freqüentes reações locais e a aplicação tópica de um creme a 1% em pele de cobaio e coelhos causaram mudanças reversíveis na epiderme, porém, sem produzir efeitos sistêmicos. Muitos sintomas foram específicos em pele de

pequenos animais roedores, mas não para o homem (KORTING, GRUNDMANN-KOLLMANN, 1997).

Ciclopirox olamina não apresentou potencial carcinogênico ou mutagênico em nenhum dos testes realizados em camundongos. Teratogenicidade e embriotoxicidade foram testadas, com a injeção de doses diárias de 10 mg/kg de peso corpóreo em peles de camundongos, e não foram observados efeitos teratogênicos (KORTING, GRUNDMANN-KOLLMANN, 1997).

Ciclopirox olamina não apresentou efeitos dismorfogênicos, mutagênicos ou carcinogênicos após a aplicação tópica, oral ou subcutânea em várias espécies de animais testados (KORTING, GRUNDMANN-KOLLMANN, 1997).

11.4 Farmacocinética

11.4.1 Penetração na pele e absorção

Como a penetração e a atividade do ciclopirox olamina aplicado topicamente depende do veículo e da formulação empregada, foi realizado um estudo comparativo de ciclopirox olamina em creme a 1% e em loção a 1% quanto à eficácia no tratamento de *tinea pedis*, *tinea versicolor*, *tinea cruris*, *tinea corporis* e *candidíase* cutânea. Foram obtidos os mesmos resultados com ambas as formas dermatológicas (ALY *et al.*, 1989).

Pelos estudos de penetração cutânea utilizando pele humana, observou-se que as maiores concentrações de ciclopirox olamina estão na camada córnea (KOCH, 1982).

A quantidade absorvida de fármaco pela circulação sistêmica é mínima, sendo apenas de 1,3 a 1,5% da dose após aplicação de uma formulação tópica a 1% (JUE, DAWSON, BROGDEN, 1985). Além disso, ciclopirox olamina liga-se altamente com proteínas plasmáticas. Como seu tempo de meia-vida é de apenas 1,7 horas, não há acúmulo sistêmico (GOODMAN, BARRY, 1989).

Aplicando-se um creme contendo 1% de ciclopirox olamina em pele de cadáver humano, foi demonstrado que cerca de 70 a 600 mg/mL pode ser quantificado em camadas superiores da epiderme, no período de 1 a 2 horas e mantido após a aplicação. Além disso, 20 a 30 mg/mL foi quantificado na derme. Após aplicação tópica de ciclopirox olamina marcada com isótopos radioativos em pele humana, a maior radioatividade foi encontrada na superfície da pele e nos folículos pilosos. Os autores demonstraram também que a concentração de ciclopirox olamina diminui à medida que se examinam camadas mais profundas da pele, mas, ainda na epiderme, foi possível detectar concentrações de 20 a 30 mg/mL, uma concentração acima do valor de CIM para microrganismos sensíveis (JUE, DAWSON, BROGDEN, 1985).

11.4.2 Distribuição

Após a administração oral em ratos, ciclopirox olamina é rapidamente distribuído a todos os tecidos, sendo que as maiores concentrações foram encontradas no fígado, nos rins e no músculo liso do estômago. A transferência através da placenta é aparentemente menor e não se mantém por um longo período de tempo (JUE, DAWSON, BROGDEN, 1985).

11.4.3 Metabolismo e excreção

No homem, ciclopirox olamina é excretado primariamente na urina com aproximadamente 80% da dose oral na forma de glucoronida. O restante é excretado na urina na forma de outros metabólitos. Aparentemente, a excreção biliar é pouca ou quase inexistente (JUE, DAWSON, BROGDEN, 1985).

11.5 Efeitos adversos

Como outros agentes antifúngicos, ciclopirox olamina é bem tolerado durante a aplicação tópica ou vaginal quando ocorrem efeitos colaterais (cerca de 1 a 4% dos pacientes estudados), estes estão limitados a reações locais caracterizadas por irritação, vermelhidão ou prurido (JUE, DAWSON, BROGDEN, 1985).

11.6 Ação antiinflamatória

Infecções de pele causadas por fungos podem ser complicadas com a presença de inflamação (ABRAMS, HANEL, HOEHLER, 1991).

A atividade antiinflamatória de ciclopirox olamina e de outros agentes antifúngicos foi estudada em uma série de modelos. A inibição da síntese de prostaglandinas e leucotrienos pela molécula de ciclopirox olamina em células humanas polimorfonucleares foi descrita pela primeira vez em 1983 (GUPTA, 2001).

Em recente estudo, vários agentes antifúngicos, incluindo os derivados da piridona, como ciclopirox olamina e rilopirox, os azóis, como o cetoconazol, flunazol e miconazol e as alilaminas, como naftifina foram avaliados quanto à ação antiinflamatória através da inibição da liberação do ácido araquidônico. Ciclopirox olamina e rilopirox apresentaram maior inibição de liberação de ácido araquidônico e, conseqüentemente, de prostaglandinas e leucotrienos, mediadores do processo inflamatório. A atividade antiinflamatória de ciclopirox olamina foi semelhante àquela apresentada por agentes antiinflamatórios de referência como a indometacina e a desoximetasona (GUPTA, 2001).

Outro estudo, a modulação da liberação de Prostaglandina E₂ (PGE₂), um metabólito da ciclooxigenase, também apresenta evidências de que ciclopirox olamina possui propriedade antiinflamatória. Nesse estudo, ciclopirox

olamina causou redução de 25% na liberação de Prostaglandina E₂ se comparada com a redução mínima causada pela naftifina e fluconazol (GUPTA, 2001).

GUPTA, 2001, sugere que ciclopirox olamina pode apresentar atividade antifúngica de amplo espectro de ação assim como atividade antiinflamatória similar à de corticosteróides de potência moderada, sem apresentar os efeitos colaterais dos mesmos.

11.7 Dosagem e administração

Em infecções dermatológicas, ciclopirox olamina é aplicado topicamente nas áreas afetadas em formulações a 1%, 2 vezes ao dia. A melhoria no quadro clínico é geralmente observada dentro da primeira semana de tratamento, porém, se não ocorrer melhoria após 4 semanas de tratamento, o diagnóstico deve ser revisto (JUE, DAWSON, BROGDEN, 1985).

11.8 Principais propriedades físico-químicas

As principais propriedades físico-químicas de ciclopirox olamina estão resumidamente descritas no Quadro 1.

Quadro 1: Principais propriedades físico-químicas de ciclopirox olamina (UNITED STATES, 2003).

Origem	Sintética
Grupo químico	Hidroxipiridona
Fórmula química	$C_{14}H_{24}N_2O_3$
Fórmula estrutural
Estrutura molecular em 3D
Massa molecular	268,4g
Descrição	Pó cristalino branco ou amarelo pálido
Solubilidade	Levemente solúvel em água, muito solúvel em cloreto de metileno, pouco solúvel em acetato de etila e praticamente insolúvel em hexano.

Em estudo de solubilização de agentes antifúngicos, verificou-se também que ciclopirox olamina é levemente solúvel em palmitato de isopropila e muito pouco solúvel em miristato de isopropila (CELMA-GARCÍA *et al.*, 1994).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1 MATERIAL

1.1 Fármaco

O fármaco ciclopirox olamina, de grau farmacêutico de pureza, lote 040928, potência 100%, foi gentilmente cedido pela empresa Laboratórios Stiefel Ltda.

Como substância química de referência, nas determinações quantitativas, foi utilizado ciclopirox olamina, potência 100% (contra padrão de referência USP), lote 014559, fornecido gentilmente pela empresa Laboratórios Stiefel Ltda.

1.2 Solventes, Reagentes e Matérias-primas

- Água ultra-pura Milli Q 18 M Ω
- Metanol, grau HPLC, Merck
- Acetonitrila, grau HPLC, Merck
- Cloreto de sódio p.a., Nuclear
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado p.a., Synth
- Fosfato de sódio dibásico anidro p.a., Synth
- Metilparabeno, grau farmacêutico, Chemax Indústria Química
- Propilparabeno, grau farmacêutico, Chemax Indústria Química
- Álcool etílico anidro p.a. Merck
- Ácido láctico 90%, grau farmacêutico, Purac
- Goma xantana, grau farmacêutico, Merck
- Pemulen TR-1[®] NF (Crosopolímero alquil-acrilatos, grau farmacêutico), Goldrich, obtido da Dinaco Importações
- Propilenoglicol, grau farmacêutico, Coremal Co.
- Octildodecanol, grau farmacêutico, Cognis

- Álcool benzílico, grau farmacêutico, CAQ Casa da Química Ind. Com. Ltda.
- EDTA dissódico p.a., Synth
- Hidróxido de sódio p.a., Synth
- Etoxidiglicol, grau farmacêutico, Brasquim
- Ácido oléico, grau farmacêutico, Cognis

1.3 Equipamentos Acessórios e Vidraria

- Sistema com 12 células de difusão vertical MICROETTE[®], modelo 57-100-828, acoplada ao coletor automático SIP Control – HANSON RESEARCH CO. As dimensões das células de difusão são: 15 mm de diâmetro de orifício, 6,0-cm de altura e capacidade de 7,0-mL
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca AGILENT, modelo HP 1100
- Coluna cromatográfica de fase reversa Purosphere[®] STAR RP-18 end capped - 55 mm x 4,0 mm x 3 µm
- Software Chemystation, versão Ver. A 08.04 [1008]
- Dermatômetro elétrico, modelo 1990 acoplado a torquímetro, ROBBINS INSTRUMENT
- Sistema de água purificada Milli Q Academic A 10, MILLIPORE
- Sistema de água purificada RiOs 16, MILLIPORE
- Homogeneizador de tecidos ULTRA TURRAX IKA, modelo T25 B
- Agitador mecânico IKA, modelo RW 20 DZM
- Balança semi-analítica METTLER TOLEDO, modelo PG 5002-S, capacidade máxima de 5.100 g
- Balança analítica METTLER TOLEDO , modelo AG 204, capacidade máxima de 210 g
- Medidor de pH METTLER TOLEDO, modelo MP 220
- Banho de ultra-som BRANSON, modelo 5210
- Refrigerador vertical REVCO, modelo ULT 1386-5-D34

- Microscópio Olympus, modelo BX 40F4
- Câmaras estabilizadas São Rafael
- Vidraria âmbar (balões volumétricos, béqueres)
- Tubos de plástico em “V” de 30-mL, para centrifuga
- Seringas de plástico de 10-mL
- Membranas filtrantes de celulose regenerada, MILLIPORE, 0,45 μm de porosidade
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 1,0 a 100,0- μL , 100 a 1000- μL e 1,0 a 10-mL – (FINNPIPETTE)
- Fita adesiva transparente Durex[®] da 3M
- Pipetas de vidro graduada de 1-mL
- Espátulas
- Equipamentos de Proteção Individual
- Pinça, tesoura e bisturi para dissecação

1.4 Membranas

- Membranas sintéticas HA de éster de celulose Millipore[®], com 47 mm de diâmetro, poro de 0,45 μm , branca e lisa (modelo HAWP 04700).
- Fragmentos de pele da região externa das orelhas de porco, obtidos logo após o abate dos animais, dermatomizados com espessura de aproximadamente 500 μm .

2 MÉTODOS

2.1 Preparo das Formulações

2.1.1 Fórmula da loção base

Componentes	%p/p
Álcool etílico anidro	7,0
Ciclopirox olamina	0,5
Pemulen TR-1	0,5
Goma xantana	0,2
Octildodecanol	12,0
Álcool benzílico	1,5
Metilparabeno	0,15
Propilparabeno	0,05
Ácido láctico 90%	qs pH 5,50
Promotor de penetração	qs
Água ultra-pura Milli Q 18 MΩ	qsp 100

- Técnica de preparação

Em um béquer de capacidade adequada, contendo suficiente de água ultra-pura Milli Q 18 MΩ, foram adicionados o Pemulen TR-1 e a goma xantana, sob agitação mecânica. Agitou-se durante 15 minutos ou até que fosse observada total dispersão dos grumos.

Separadamente, ciclopirox olamina foi dissolvido na mistura constituída de 6% (p/p) de álcool etílico anidro, octildodecanol e álcool benzílico e adicionado à preparação, sob agitação mecânica constante.

Metilparabeno e Propilparabeno foram dissolvidos em 1% (p/v) de álcool etílico anidro e adicionados, sob agitação constante.

O valor de pH da formulação foi corrigido para pH 5,5, adicionando-se solução de ácido láctico 90%.

A partir da fórmula de loção base, foram incorporados os promotores de penetração cutânea.

Na fórmula A, o propilenoglicol a 15% (p/p) foi adicionado na mistura de solventes para solubilização de ciclopirox olamina, durante a manipulação da fórmula de loção base.

Na fórmula B, o etoxidiglicol a 15% (p/p) foi adicionado seguindo a mesma técnica da fórmula A.

Na fórmula C, o ácido oléico a 5% (p/p) foi adicionado ao gel de Pemulen TR-1 e goma xantana, após dispersão dos grumos, durante a manipulação da fórmula de loção base.

2.2 Estudo de estabilidade física das formulações testadas

2.2.1 Condições de estocagem e frequência de amostragem

Efetuuou-se o estudo de estabilidade física das formulações com e sem promotor de penetração. As formulações foram mantidas em câmaras de estabilidade, nas seguintes condições de temperatura e umidade: 25°C/60% UR (estudo em longo prazo), 30°C/60% UR (estudo intermediário) e 40°C/75% UR (estudo de estabilidade acelerado) (UNITED STATES, 1998).

A frequência de amostragem para a análise das características físicas das fórmulas foi análise inicial, após 30 dias, 60 dias e 90 dias.

2.2.2 Testes preliminares de estabilidade

2.2.2.1 Ensaaios organolépticos

O aspecto físico das formulações foi avaliado espalhando uma quantidade adequada do produto em um vidro de relógio. O produto foi avaliado quanto à homogeneidade, alteração de cor e odor e presença de cristais ou aglomerados.

2.2.2.2 Determinação do valor de pH

O valor de pH das formulações foi determinado em medidor de pH digital, com eletrodo com LiCl como eletrólito referência (específico para amostras semi-aquosas ou não-aquosas), utilizando o produto sem qualquer tratamento, à temperatura ambiente (25°C).

2.3 Determinação quantitativa de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência

A quantificação de ciclopirox olamina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna de fase reversa Purosphere® STAR RP-18, na temperatura de 30°C. A fase móvel isocrática, constituída de 55% (v/v) de solução de EDTA, 40% (v/v) de acetonitrila e 5% (v/v) de metanol, foi mantida em fluxo de 0,5 mL/min. O volume de injeção da amostra foi de 5,0 µL e o tempo de retenção do fármaco foi de aproximadamente 4,90 minutos, detectada no UV/visível a 300 nm.

2.4 Adequação do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência para os estudos de liberação, permeação e retenção cutâneas

2.4.1 Pesquisa de interferentes da solução receptora

A solução receptora, constituída de tampão fosfato pH 7.4 10 mM e 0,9% de cloreto de sódio foi preparada conforme descrito no item 2.6.1 e injetada em cromatógrafo nas mesmas condições descritas para a determinação de ciclopirox olamina (item 2.3).

2.4.2 Pesquisa de interferentes do estrato córneo (*tape stripping*)

Retirou-se o estrato córneo da pele de orelha de porco dermatomizada, pelo procedimento de *tape stripping*, que consiste em colocação de fita adesiva na superfície da pele e sua retirada. O procedimento foi repetido utilizando 15 fitas adesivas (BRONAUGH, COLLIER, 1993).

As fitas foram transferidas para tubos de ensaio âmbar contendo 5 μ L de metanol e agitadas em agitador tipo vórtex por um minuto, após o qual foram colocadas em banho de ultra-som por 15 minutos. A solução foi filtrada em membrana de 0,45 μ m e injetada no cromatógrafo nas mesmas condições utilizadas descritas no item 2.3. Este teste foi realizado em triplicata.

2.4.3 Pesquisa de interferentes da epiderme e derme

Após a retirada do estrato córneo, as peles foram recortadas e picotadas com auxílio de uma tesoura. Os fragmentos de pele foram transferidos para tubo de plástico para centrifuga, adicionados de 10 mL de metanol e triturados em homogeneizador tipo Turrax por 1 minuto. Em seguida, o homogenato foi colocado em banho de ultra-som por 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e, em seguida, em membrana de 0,45 μ m. A solução foi injetada em cromatógrafo nas mesmas condições descritas no item 2.3. Este estudo de interferentes foi realizado em triplicata.

2.5 Validação do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência

2.5.1 Especificidade

Amostras da loção base contendo 0,5% de ciclopirox olamina e placebo foram submetidas a condições de *stress* para verificar a especificidade do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência.

As condições de *stress* foram:

- CALOR Aproximadamente 1600 mg de cada amostra foram dispersas em balão volumétrico de 50-mL com 5 mL de solução solvente e mantidas a 80°C por 7 horas e estocadas a 25°C em sala escura por 7 dias.

- LUZ Aproximadamente 1600 mg de cada amostra foram dispersas em balão volumétrico de 50-mL com 5 mL de solução solvente e mantidas sob luz artificial por 7 dias.

- ÁCIDO Aproximadamente 1600 mg de cada amostra foram dispersas em balão volumétrico de 50-mL com 5 mL de solução solvente e 5 mL de ácido clorídrico 0,5M e estocadas a 25°C em sala escura por 7 dias.

- BASE Aproximadamente 1600 mg de cada amostra foram dispersas em balão volumétrico de 50-mL com 5 mL de solução solvente e 5 mL de hidróxido de sódio 0,5M e estocadas a 25°C em sala escura por 7 dias.

- OXIDAÇÃO Aproximadamente 1600 mg de cada amostra foram dispersas em balão volumétrico de 50-mL com 5 mL de solução solvente e 5,0 mL de peróxido de hidrogênio 3% e estocadas a 25°C em sala escura por 7 dias.

As amostras controles e os placebos foram dispersos em solução solvente e estocadas a 4°C por 7 dias em balão volumétrico de 50-mL. Cada amostra foi preparada em triplicata e, após 7 dias, as amostras foram analisadas de acordo com o método descrito no item 2.3.

2.5.2 Determinação da linearidade do método

Para este teste foram utilizadas soluções de ciclopirox olamina em metanol, com 5 concentrações diferentes: 5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL e 100 µg/mL, preparadas a partir de uma solução de 100 µg/mL, preparada com a dissolução de 0,01 g em 100 mL de metanol e realizadas as diluições apropriadas para obter as diferentes concentrações.

Essas soluções foram analisadas cromatograficamente, conforme descrito em 2.3.

2.5.3 Exatidão

A exatidão do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência foi determinada pela realização de uma série de experimentos de recuperação. Concentrações conhecidas de padrão de ciclopirox olamina foram adicionadas ao lote placebo. As amostras foram analisadas e a porcentagem de recuperação de 6 determinações a 50%, 100% e 150% da concentração nominal foram calculadas utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\% \text{ encontrada do analito}}{\% \text{ do analito adicionada}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

2.5.4 Precisão

A precisão do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência foi determinada pela análise da loção base contendo 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% de ciclopirox olamina.

2.5.5 Robustez

A robustez do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência foi determinada de acordo com variações típicas dos parâmetros experimentais. Incluem-se fase móvel, comprimento de onda, temperatura da coluna, volume de injeção e taxa de fluxo. As mesmas amostras de soluções foram analisadas e os efeitos das mudanças desses parâmetros foram obtidos após 3 determinações.

Tabela 3 – Parâmetros do método e valores avaliados.

Parâmetros	Método	Variação	Limite superior	Limite inferior
%(v/v) acetonitrila	40	5	45	35
%(v/v) solução de EDTA	55	5	60	50
%(v/v) Metanol	5	5	10	0
Temperatura da coluna (°C)	30	5	35	25
Fluxo (mL/min)	0.5	0.1	0.6	0.4
Volume de Injeção (µl)	5	1	6	4
Comprimento de onda (nm)	300	5	305	295

Tabela 4 – Condições experimentais para o teste de robustez do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência.

Experimento	% H ₃ CCN	% Solução de EDTA	% H ₃ COH	Temperatura (°C)	Fluxo (mL/min)	λ (nm)	Volume de Injeção (μl)
Método	40	55	5	30	0,5	300	5
A	45	55	0	30	0,5	300	5
B	35	55	10	30	0,5	300	5
C	40	60	0	30	0,5	300	5
D	40	50	10	30	0,5	300	5
E	40	55	5	35	0,5	300	5
F	40	55	5	25	0,5	300	5
G	40	55	5	30	0,5	300	5
H	40	55	5	30	0,5	300	5
I	40	55	5	30	0,5	305	5
J	40	55	5	30	0,5	295	5
K	40	55	5	30	0,5	300	6
L	40	55	5	30	0,5	300	4

2.5.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

2.5.6.1 Limite de Detecção

À uma amostra de loção base placebo de ciclopirox olamina foram adicionadas várias concentrações conhecidas de ciclopirox olamina para determinação do limite de detecção do método.

2.5.6.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi calculado como 3,3 x o limite de detecção.

2.6 Testes de solubilidade para determinação da solução receptora

2.6.1 Preparo da solução receptora tampão fosfato pH 7.4 – 10 mM isotônica

A solução tampão fosfato pH 7,4 10mM foi preparada com fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico, considerando a seguinte equação:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]} \quad (\text{Equação 3})$$

onde:

[A] é a concentração do ácido e [B] a concentração da base.

Os sais foram solubilizados em água purificada Milli Q e o pH foi ajustado para 7,4 com solução de hidróxido de sódio 1N. A solução foi filtrada em membrana de celulose regenerada de 0,45 μm e adicionada de 0,9% de cloreto de sódio com agitação manual até completa dissolução.

2.6.2 Determinação da solubilidade de ciclopirox olamina na solução receptora

Em um frasco âmbar com batoque e tampa rosca, adicionou-se excesso de fármaco, sendo aproximadamente 100 mg, e 10 mL de solução receptora. A mistura foi agitada em placa de agitação magnética a 300 rpm, durante 24 horas a temperatura ambiente. Após este tempo, a mistura foi filtrada em membrana 0,45 μm e o fármaco contido no filtrado foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições descritas no item 2.3. Foram realizadas 5 réplicas (SANTOYO *et al.*, 1996).

2.7 Estudo de liberação *in vitro* em células de difusão utilizando membrana sintética de éster de celulose

Foram realizados experimentos de difusão com membrana sintética em células de difusão. A formulação base foi testada com 12 réplicas e foi monitorada por 12 horas. A solução receptora foi coleta nos intervalos de tempo de 30 minutos, 1, 2, 4 e 8 horas.

Após a montagem do equipamento Microette[®], as membranas foram deixadas em contato com a solução receptora sob as células de difusão, por 30 minutos antes do início do teste, para que entrassem em equilíbrio com a solução receptora.

2.8 Estudo de permeação cutânea *in vitro* em células de difusão utilizando pele de porco dermatomizada

Foram realizados experimentos com a mesma formulação base, com e sem promotor de penetração, para efeito de comparação. O teste foi realizado com 6 réplicas para cada fórmula.

2.8.1 Obtenção das membranas naturais

As orelhas de porco foram obtidas logo após abate do animal.

Após lavagem, foram fixadas em um suporte de isopor, utilizando agulhas, conforme Figura 16 e, em seguida, submetidas a dissecação da região externa das mesmas, utilizando pinça e bisturi.

Figura 16. Orelha de porco obtida após abate do animal

A pele dissecada foi lavada em água potável e afixada, bem esticada, em um suporte de isopor por meio de agulhas, conforme a Figura 17.

Figura 17. Pele de porco dissecada e fixada em suporte de isopor

Com auxílio do dermatômetro e de uma pinça, a região da pele foi dermatomizada (Figura 18), cortada e acondicionada em folhas de PVC e embrulhadas em papel alumínio, identificadas e mantidas em freezer a -4°C até o momento do uso. A estocagem da pele congelada foi inferior a 30 dias.

Figura 18. Dermatomização de pele de porco

2.8.2 Preparo do equipamento (Hanson - Microette®)

As células de difusão utilizadas foram as de fluxo estático, acopladas a um controlador automático de amostragem.

As células de difusão são constituídas, basicamente, de um compartimento doador, onde a formulação é adicionada e um compartimento receptor, onde a solução receptora é coletada e analisada.

A solução receptora foi mantida a 37°C por um banho termostaticado de água circulante.

Os fragmentos de pele de porco dermatomizados com aproximadamente $500\text{ }\mu\text{m}$ de espessura foram colocados sobre as células de difusão, com a derme em contato com a solução receptora. A área de exposição das peles foi de aproximadamente $1,77\text{ cm}^2$. Aproximadamente 100 mg do produto foram aplicados sobre a membrana animal afixada ao

suporte. A solução receptora (cerca de 7,0 mL) foi constantemente mantida sob agitação a 300 rpm e amostras de 0,5 mL foram coletadas em intervalos de tempo 0, 4 e 8 horas. O equipamento manteve constante o volume da solução receptora automaticamente, sendo assim, a cada coleta, foi repostado 0,5 mL de nova solução receptora.

Os experimentos foram realizados com 6 réplicas.

Ciclopirox olamina foi quantificado nas alíquotas retiradas por cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições descritas no item 2.3.

2.9 Estudo *in vitro* de retenção cutânea

Após 8 horas de experimento nas células de difusão, as peles foram retiradas e o excesso de produto foi removido, lavando os fragmentos em água destilada corrente.

Após este tratamento, as peles foram submetidas aos procedimentos de *tape stripping* e determinação da retenção na epiderme e derme.

2.9.1 *Tape Stripping*

Os fragmentos foram afixados em um suporte de isopor e a área de exposição foi submetida à extração do estrato córneo, utilizando-se 16 fitas adesivas (Figura 19), sendo que a primeira fita foi desprezada. As fitas foram transferidas para tubos de ensaio âmbar contendo 5 mL de metanol e agitadas, em mixer, por 1 minuto para extração do fármaco. As fitas foram colocadas em banho de ultra-som por 15 minutos. A solução foi filtrada em membrana 0,45 µm e o fármaco retido no estrato córneo foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições descritas no item 2.3.

Figura 19. *Tape stripping* do estrato córneo

2.9.2 Retenção na epiderme e derme

Após a retirada do estrato córneo, como descrito anteriormente, a área de pele restante foi recortada e picada com auxílio de uma tesoura. Os fragmentos foram transferidos para um tubo de plástico para centrifuga, adicionados de 10 mL de metanol e triturados em homogeneizador tipo Turrax por 1 minuto. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo e, em seguida, em membrana de 0,45 μm , sendo transferido para tubo de ensaio âmbar. O fármaco retido na epiderme e na derme foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições descritas no item 2.3.

2.10 Análise dos resultados

2.10.1 Cálculos da quantidade real do fármaco no ensaio de permeação

A partir das concentrações do fármaco ($\mu\text{g/mL}$), determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, foram efetuados os cálculos de correção dos valores para a obtenção das quantidades reais permeadas nos diferentes tempos, pois após cada coleta, houve reposição da solução receptora. Para isto, foi utilizada a seguinte equação:

$$Q_{real,t} = C_{medida,t} \cdot V_r + V_a \sum^{n-1} C_a \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

Q_{real} = o valor real (sem diluições) no tempo t

$C_{medida,t}$ = concentração determinada no tempo t

V_r = volume da célula de difusão

V_a = volume de amostra removido

C_a = concentração da amostra removida

Após a correção, a quantidade de fármaco permeado foi dividida pela área de pele exposta à difusão (1,77 cm²) e esses valores foram plotados em função do tempo (μg/cm² x tempo) para visualização do perfil de permeação do fármaco.

2.10.2 Expressão dos resultados e análise estatística

Os perfis de permeação foram obtidos por meio do gráfico da quantidade acumulada de ciclopírox olamina transportada através da pele (μg/cm²) versus o tempo (h). Os valores foram expressos como média ± Erro Padrão. Somente a porção linear do gráfico com o coeficiente de correlação maior que 0,90 na fase linear foi considerado indicativo de estado de equilíbrio da permeação e utilizado para determinação de *lag time* e fluxo. Os valores de *lag time* foram estimados com a extrapolação da porção linear no eixo x. O fluxo do fármaco através da membrana (J) foi calculado a partir da inclinação da reta da regressão linear e expresso como μg/cm²·h.

Os fluxos das formulações, bem como as quantidades retidas na pele e estrato córneo foram comparadas por análise estatística não paramétrica. Realizou-se teste de Kruskal-Wallis entre as amostras usando índice de

significância de 95% ($P < 0.05$). As análises foram realizadas utilizando o programa Graph Pad Prism (san Diego, CA).

2.11 Qualificação do equipamento empregado nos ensaios de liberação e penetração cutânea

O sistema de amostragem automática Microette® (Figura 20) apresenta 12 células de difusão acopladas e posicionadas em uma placa de agitação magnética controlada por um agitador Variomag®. É composto por dois lados idênticos constituídos de banho-maria circulante, sistemas de células de difusão e béquer de reposição. Por meio de uma bomba de vácuo, a amostragem é realizada conforme protocolo inserido pelo controlador do equipamento.

A qualificação do sistema foi efetuada de acordo com os testes descritos a seguir.

Figura 20. Sistema de amostragem automática Microette®.

2.11.1 Controle da regulação térmica do sistema

O teste foi realizado monitorando-se a distribuição de temperatura durante 24 horas a 37°C nos dois lados do sistema.

Para avaliar a distribuição da temperatura, foram distribuídos 9 termopares em cada sistema, sendo 1 termopar junto ao sensor de controle de temperatura do banho-maria, 1 no ponto oposto ao sensor de controle de temperatura, 1 no béquer de reposição e 1 em cada célula de difusão.

As extremidades dos termopares foram elevadas para assegurar que as mesmas não entrassem em contato com nenhuma superfície.

As temperaturas dos termopares foram registradas através de um validador Kaye 2000, em intervalos de tempo de 1 minuto, desde o início ao final do ciclo de monitoração.

A contagem do tempo do monitoramento foi iniciada quando o sensor de controle do banho-maria se estabilizou na temperatura especificada.

O critério de aceitação estabelecido foi de 37°C $\pm$ 1°C durante todo o período de monitoração e a diferença de leitura entre o termopar conectado ao validador e o sensor de controle do banho-maria não deveria exceder 2°C.

2.11.2 Qualificação de operação do equipamento

Para conclusão da qualificação de operação do sistema Microette®, os seguintes testes foram conduzidos: teste de programação do controlador SIP, verificação da velocidade de rotação das células de difusão, verificação do volume de amostragem e verificação do relógio interno.

2.11.2.1 Teste de programação do controlador SIP

O sistema de amostragem automática Microette® apresenta um painel frontal chamado de controlador SIP, que permite a interação entre o sistema e o operador. Neste painel de controle, há o botão LIGA/DESLIGA do equipamento, o teclado alfa-numérico e o *display* do mesmo (Figura 21).

Figura 21. Controlador SIP do sistema de amostragem automática Microette®.

O amostrador automático do sistema Microette® comporta o número máximo de 10 protocolos, que são um conjunto de parâmetros necessários para a execução de um estudo. O teste de programação do controlador SIP foi aplicado a todos os parâmetros utilizados nos estudos de liberação/permeação cutânea, com o objetivo de avaliar a execução do protocolo.

Inicialmente, foi selecionado um determinado protocolo pelo seu número (1 a 10) e foi verificado se o protocolo exibido para execução correspondia ao selecionado.

Foram selecionadas as três opções de amostragem (lado A, lado B e lados A e B), uma de cada vez, e foi verificado se as amostragens foram realizadas nos lados selecionados através do controlador SIP.

Foi selecionado um intervalo de tempo entre o início do teste no lado A e o início do teste no lado B. Este tempo deveria ser maior que o tempo total de coleta do lado A.

Foi selecionado um número de amostragens a serem realizadas e observou-se se as coletas estavam de acordo com a quantidade selecionada.

No último teste, foi selecionado um intervalo de tempo para as amostragens e foi executado de acordo com os valores selecionados. O formato usado para selecionar o intervalo deveria ser hh:mm.

Para realizar este teste, foi utilizado um cronômetro calibrado para comparação.

2.11.2.2 Velocidade de rotação das células de difusão

Para verificar a velocidade de rotação no interior das células de difusão, foram selecionadas 3 velocidades diferentes visando qualificar toda a faixa de trabalho entre 300 e 900 rpm.

Em cada célula, foi afixado um pedaço de papel laminado na mola acoplada à barra magnética. A velocidade de agitação no interior da célula de difusão foi acertada para 300 rpm, através do controlador Variomag® do equipamento de absorção cutânea Microette®. Com auxílio de um tacômetro devidamente calibrado, verificou-se se a velocidade de agitação estava de acordo com a velocidade indicada no mostrador do equipamento. O mesmo procedimento foi realizado, acertando-se a velocidade no Variomag® para 600 e, posteriormente, para 900 rpm.

As medições foram realizadas em duplicata para cada célula, em cada velocidade acima determinada.

2.11.2.3 Volume de amostragem

Para verificar a homogeneidade dos valores de volume de amostragem, todos os recipientes e compartimentos do equipamento Microette® foram preenchidos com solução receptora 30% etanol : 70% água purificada. Foi verificado se cada célula de difusão continha o menisco negativo. A membrana Parafilm® foi posicionada sobre a célula de difusão, de modo que não fossem observadas bolhas na superfície após vedação da célula. As células de difusão foram fechadas com a tampa de acrílico e fixadas com o grampo.

Este teste foi efetuado 3 vezes com diferentes volumes, utilizando respectivamente os dois sistemas de amostragem (lados A e B do equipamento), visando qualificar toda a faixa de trabalho e os dois sistemas de amostragem (sistema de coleta A e B).

Pelo método de gravimetria, o teste foi realizado visando qualificar toda a faixa de trabalho de volume e os dois sistemas de amostragem.

Para cada teste, 72 vials de amostragem foram tarados, utilizando uma balança analítica.

O teste foi realizado utilizando os seguintes volumes: 0,5 mL, 1,0 mL e 1,5 mL.

Antes de iniciar o teste e, ao final do mesmo, a densidade da solução receptora foi verificada.

Ao final do teste de volume de amostragem, cada vial foi pesado em balança analítica e, por diferença de peso com o auxílio da densidade medida, o volume amostrado foi obtido pela seguinte fórmula:

$$d = \frac{m}{v} \quad (\text{Equação 5})$$

onde:

d= densidade, m = massa e v = volume

O critério de aceitação adotado para este teste foi uma variação de $\pm 0,05$ mL.

2.11.2.4 Verificação do relógio interno do equipamento (*Timer*) de amostragem automática

Com o controlador do equipamento de absorção cutânea Microette[®], foi simulado o início de um experimento, com duração de 1 hora, utilizando os dois lados do mesmo. No momento em que o controlador foi acionado, iniciou-se a contagem de tempo simultaneamente com um cronômetro devidamente calibrado. O tempo decorrido do sistema foi confrontado com o tempo decorrido do cronômetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICA DAS FORMULAÇÕES TESTADAS

1.1 Descrição dos componentes da formulação

Em ensaios preliminares avaliando diferentes sistemas solventes para ciclopirox olamina, foram empregados álcool etílico anidro e água ultra pura e as fórmulas resultantes foram observadas em microscópio uma semana após o preparo para verificar a presença ou não de cristais. A partir dessas observações, foram selecionados como solventes o álcool etílico anidro, o octildodecanol e o álcool benzílico, cujas formulações não apresentaram cristais do fármaco.

A goma xantana e o Pemulen TR-1 foram os agentes espessantes da fórmula, sendo que este último também apresenta função de emulsificante.

Metilparabeno e Propilparabeno foram os conservantes utilizados na fórmula.

O ácido láctico 90% foi o agente utilizado para acerto de valor de pH.

1.2 Ensaios organolépticos

Após estudo de estabilidade da fórmula de loção base de ciclopirox olamina, os resultados de aspecto foram obtidos, conforme descrito na Tabela 5.

De acordo com esses resultados, a fórmula de loção base de ciclopirox olamina foi considerada estável nas condições de 25°C 60%UR, 30°C 60%UR e 40°C 75%UR, após conclusão do estudo de estabilidade física do produto. Não foram observadas alterações significativas no aspecto, tais como separação de fases ou alterações no odor ou coloração. Além disso, não foi observada a presença de aglomerados ou cristais.

Portanto, o sistema solvente empregado demonstrou ser adequado, evitando a formação de cristais de ciclopirox olamina, nas condições avaliadas.

Tabela 5 – Aspecto físico da fórmula de loção base de ciclopirox olamina, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60 e 75%.

Tempo	25°C 60%UR	30°C 60%UR	40°C 75%UR
Inicial	C	NT	NT
30 dias	C	C	C
60 dias	C	C	C
90 dias	C	C	C

C: produto conforme

NT: não testado

As fórmulas A, B e C, contendo os promotores de penetração cutânea, também foram consideradas estáveis fisicamente após o estudo. Não foram observadas alterações significativas no aspecto, tais como separação de fases ou alterações no odor ou coloração. Os resultados encontram-se descritos nas Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 – Aspecto físico da fórmula A, 15% de propilenoglicol, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60 e 75%.

Tempo	25°C 60%UR	30°C 60%UR	40°C 75%UR
Inicial	C	NT	NT
30 dias	C	C	C
60 dias	C	C	C
90 dias	C	C	C

C: produto conforme

NT: não testado

Tabela 7 – Aspecto físico da fórmula B, 15% de etoxidiglicol, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60 e 75%.

Tempo	25°C 60%UR	30°C 60%UR	40°C 75%UR
Inicial	C	NT	NT
30 dias	C	C	C
60 dias	C	C	C
90 dias	C	C	C

C: produto conforme

NT: não testado

Tabela 8 – Aspecto físico da fórmula C, 5% de ácido oléico, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60 e 75%.

Tempo	25°C 60%UR	30°C 60%UR	40°C 75%UR
Inicial	C	NT	NT
30 dias	C	C	C
60 dias	C	C	C
90 dias	C	C	C

C: produto conforme

NT: não testado

1.3 Determinação do valor de pH

De acordo com a técnica de preparação da fórmula de loção base, o valor de pH inicial foi ajustado para 5,50, pois, de acordo com KORTING, GRUNDMANN-KOLLMANN, 1997, o pH ótimo para atividade farmacológica de ciclopirox olamina encontra-se para valores abaixo de 6,50. Após o estudo de estabilidade física, foram obtidos os valores de pH descritos nas Tabelas 9, 10, 11 e 12. Durante o estudo, os valores de pH das formulações encontraram-se dentro da faixa de aceitação, não havendo variações.

Tabela 9 – Valores de pH da fórmula de loção base, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60 e 75%.

Tempo	25°C 60%UR	30°C 60%UR	40°C 75%UR
Inicial	5,51	NT	NT
30 dias	5,52	5,55	5,56
60 dias	5,51	5,57	5,55
90 dias	5,50	5,55	5,59

NT: não testado

Tabela 10 – Valores de pH da fórmula A, 15% de propilenoglicol, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60 e 75%.

Tempo	25°C 60%UR	30°C 60%UR	40°C 75%UR
Inicial	5,50	NT	NT
30 dias	5,50	5,55	5,54
60 dias	5,53	5,56	5,55
90 dias	5,55	5,55	5,59

NT: não testado

Tabela 11 – Valores de pH da fórmula B, 15% de etoxidiglicol, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60 e 75%.

Tempo	25°C 60%UR	30°C 60%UR	40°C 75%UR
Inicial	5,50	NT	NT
30 dias	5,52	5,50	5,52
60 dias	5,53	5,51	5,53
90 dias	5,55	5,50	5,55

NT: não testado

Tabela 12 – Valores de pH da fórmula C, 5% de ácido oléico, no estudo de estabilidade em 30, 60 e 90 dias, umidades relativas (UR) de 60 e 75%.

Tempo	25°C 60%UR	30°C 60%UR	40°C 75%UR
Inicial	5,50	NT	NT
30 dias	5,51	5,52	5,55
60 dias	5,50	5,50	5,52
90 dias	5,51	5,54	5,53

NT: não testado

2 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CICLOPIROX OLAMINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Após injeção da solução do padrão de ciclopirox olamina em metanol, foi obtido o cromatograma descrito na Figura 22.

Figura 22. Cromatograma do padrão de ciclopirox olamina em metanol.

De acordo com o cromatograma do padrão de ciclopirox olamina em metanol, o tempo de retenção foi de aproximadamente 5 minutos.

3 ADEQUAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE CICLOPIROX OLAMINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA OS ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEAS

3.1 Pesquisa de interferentes da solução receptora

Após injeção da solução receptora tampão fosfato pH 7,4, sem a presença do fármaco, foi obtido o cromatograma apresentado na Figura 23.

O cromatograma da solução receptora, tampão fosfato pH 7,4, 10 mM, sem a presença do fármaco, mostrou que não houve interferência dos

componentes dessa solução na quantificação de ciclopirox olamina nos estudos de liberação, permeação e retenção cutâneas.

Figura 23. Cromatograma da solução receptora, tampão fosfato pH 7,4, 10mM, sem a presença do fármaco.

3.2 Pesquisa de interferentes do estrato córneo (*tape stripping*)

Após injeção da solução obtida pela técnica do *tape stripping*, obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 24.

Figura 24. Cromatograma da solução de estrato córneo (EC) em metanol do teste de *tape stripping*.

Como não foram observados picos interferentes no tempo de 5,0 minutos, não houve interferentes do estrato córneo na quantificação de ciclopirox olamina.

3.3 Pesquisa de interferentes da epiderme e derme

Após injeção da solução da epiderme e derme em metanol, obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 25.

Figura 25. Cromatograma da solução da epiderme e derme em metanol.

Como não foram observados picos interferentes no tempo de 5,0 minutos, não houve interferentes de componentes da epiderme e derme na quantificação de ciclopirox olamina.

4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE CICLOPIROX OLAMINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

4.1 Especificidade

Ao submeter as amostras de loção base de ciclopirox olamina à luz artificial, observou-se considerável degradação correspondente ao pico da piridona.

Ao submeter as amostras de loção base de ciclopirox olamina à presença de ácido clorídrico 0,5 M e após estocagem à 80°C, notou-se degradação de ciclopirox olamina, porém, não foram observados picos interferentes no tempo de retenção do fármaco.

Não houve picos interferentes ou produtos de degradação quando amostras da loção base de ciclopirox olamina foram submetidas ao tratamento com hidróxido de sódio 0,5 M ou com peróxido de hidrogênio 3%.

Os resultados encontram-se nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13 – Resultados dos experimentos de especificidade do método de quantificação de ciclopirox olamina (%p/p) por cromatografia líquida de alta eficiência.

Agente	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	RSD%
Controle	0.517	0.514	0.516	0.52	0.31
Luz	0.468	0.468	0.467	0.47	0.17
Calor	0.474	0.456	0.477	0.47	2.37
Ácido	0.488	0.490	0.493	0.49	0.57
Base	0.512	0.513	0.515	0.51	0.29
Oxidação	0.510	0.513	0.515	0.51	0.42

Tabela 14 – Resultados dos experimentos de especificidade do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência. % (p/p) de piridona.

Agente	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	RSD%
Luz	0.0143	0.0141	0.0158	0.015	7.87

O pico de piridona foi detectado somente quando o produto foi exposto à luz. Não foi detectado em outras condições de *stress*.

Figura 26. Cromatograma da solução de amostra controle de ciclopirox olamina. Tempo de retenção, 5 minutos.

Figura 27. Cromatograma da solução de placebo de ciclopirox olamina.

Figura 28. Cromatograma da solução da amostra de ciclopirox olamina exposta à luz.

Figura 29. Cromatograma da solução do placebo de ciclopirox olamina exposta à luz.

Figura 30. Cromatograma da solução da amostra de ciclopirox olamina com exposição ao calor.

Figura 31. Cromatograma da solução do placebo de ciclopirox olamina com exposição ao calor.

Figura 32. Cromatograma da solução da amostra de ciclopirox olamina após oxidação.

Figura 33. Cromatograma da solução do placebo de ciclopirox olamina após oxidação.

Figura 34. Cromatograma da solução da amostra de ciclopirox olamina após tratamento ácido.

Figura 35. Cromatograma da solução do placebo de ciclopirox olamina após tratamento ácido.

Figura 36. Cromatograma da solução da amostra de ciclopirox olamina após tratamento básico.

Figura 37. Cromatograma da solução do placebo de ciclopirox olamina após tratamento básico.

Uma vez que não se evidenciaram picos correspondentes aos produtos de decomposição no tempo de retenção de cerca de 5 minutos, no qual se apresenta a detecção de ciclopirox olamina, o método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência foi considerado seletivo.

4.2 Determinação da linearidade do método

Após injeção das soluções padrão, foi obtida a reta de calibração de equação $y = 8,95703 - 6,1433 \times 10^{-3}x$, cujo gráfico apresenta-se na Figura 38. O coeficiente de correlação linear foi de 0,99997, indicando boa linearidade do método.

Figura 38. Reta de calibração de soluções do padrão de ciclopirox olamina, nas concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$, em metanol, a 300 nm.

4.3 Exatidão

As porcentagens de ciclopirox olamina recuperadas na aplicação do método cromatográfico em estudo estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Exatidão do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência, a 50%, 100% e 150% da concentração nominal.

Amostra	% de Recuperação de ciclopirox olamina		
	50%	100%	150%
1	95	99	100
2	95	99	101
3	95	99	100
4	96	98	100
5	95	99	101
6	96	98	100
Média	95	99	100
RSD%	0,47	0,32	0,33

Os desvios padrões relativos indicam excelentes recuperações nos três níveis de porcentagens de padrão adicionados à formulação base. Assim, o método apresentou boa exatidão ($RDS < 0,47$).

4.4 Precisão

Os resultados do ensaio de precisão do método são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados do ensaio de precisão do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	% (p/p) de ciclopirox olamina			
	Lote 0.5%	Lote 1.0%	Lote 1.5%	Lote 2.0%
1	0,523	1,017	1,539	2,035
2	0,526	1,018	1,528	2,031
3	0,524	1,031	1,515	2,056
4	0,523	1,001	1,541	2,059
5	0,526	1,016	1,542	2,074
6	0,526	1,028	1,542	2,052
Média	0,524	1,019	1,534	2,051
RSD%	0,34	1,01	0,73	0,78

Os desvios padrões obtidos variaram de 0,34% (para lote com concentração de 0,5% de ciclopirox olamina) a 1,01% (para lote com 1,0% de ciclopirox olamina), indicando boa precisão do método cromatográfico.

4.5 Robustez

Os resultados do ensaio de robustez do método cromatográfico podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados do ensaio de robustez do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência.

	T.R	Área	Altura	Resolução	Seletividade	Amostra	RSD	Recup.
	min	mAU*s	mAU	-	-	% p/p	%	%
Método	5,036	2598,85	171,67	12,72	3,13	0,521	0,11	-
A	3,994	2576,33	209,28	11,06	2,67	0,531	0	102
B	5,983	2606,31	149,54	14,17	3,51	0,524	0	101
C	5,562	2588,57	154,29	13,05	3,22	0,522	0,29	100
D	4,185	2589,27	207,52	12,06	2,85	0,522	0,54	100
E	4,939	2589,07	173,98	12,84	3,19	0,522	0,11	100
F	5,115	2591,31	167,73	12,50	3,09	0,522	0,19	100
G	4,224	2165,02	170,86	12,82	3,14	0,522	0,11	100
H	6,335	3227,01	168,82	12,71	3,14	0,521	0	100
I	5,054	2531,03	168,81	12,83	3,11	0,519	0,29	100
J	5,015	2382,13	159,04	12,83	3,11	0,519	0,29	100
K	5,096	3130,73	205,61	12,84	3,14	0,521	0,11	100
L	5,113	2066,96	135,35	12,95	3,16	0,518	0,11	99

Foi observado que mudanças no fluxo da fase móvel e no volume de injeção causaram mudanças significativas na área, altura e no tempo de retenção, porém, não houve mudanças na concentração e recuperação de ciclopirox olamina nos experimentos, comparando-se com o método original.

4.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

4.6.1 Limite de Detecção

Verificou-se que a concentração de 0,046 µg/mL de ciclopirox olamina equivale a um sinal de ruído de 3:1.

Tabela 18 – Sinais encontrados e utilizados para cálculo de limite de detecção do método de quantificação de ciclopirox olamina por cromatografia líquida de alta eficiência.

Concentração	Número de Injeções	Altura do ruído (mAU*s)	Altura do Sinal (mAU*s)
0,046 µg/mL	1	0,015	0,045
	2	0,015	0,045
	3	0,010	0,050
	4	0,010	0,045
	5	0,012	0,042
	6	0,015	0,049
	Média	0,013	0,046
	RSD%	19,35	7,45 6,45

O limite de detecção foi calculado com base na proporção de 3:1.

$$\text{L.O.D} = (0.046 \div 3.54) \times 3 = 0.039 \text{ µg/mL}$$

Como a amostra foi preparada através da solubilização de aproximadamente 1600 mg de produto, para 50 mL, a solução contém 32 mg/mL = $3,2 \times 10^4$ µg/mL.

Portanto, % p/p Limite de detecção = $[0.039 \div (3.2 \times 10^4)] \times 100\% = 0.000122\% \text{p/p}$.

4.6.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é calculado como $3,3 \times \text{L.O.D}$.

Portanto, o limite de quantificação para ciclopirox olamina é $3,3 \times 0,039 \mu\text{g/mL} = 0.129 \mu\text{g/mL}$.

$$\% \text{ p/p L.O.Q} = [0.129 \div (3.2 \times 10^4)] \times 100\% = 0.000403\% \text{ p/p.}$$

Dessa forma, fica demonstrado que os limites de detecção e de quantificação são adequados aos ensaios de liberação e permeação *in vitro* de ciclopirox olamina, quanto às concentrações esperadas do fármaco na solução receptora.

5 TESTES DE SOLUBILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DA SOLUÇÃO RECEPTORA

Após quantificação de ciclopirox olamina na solução receptora, tampão fosfato pH 7,4, verificou-se a sua solubilidade como sendo 5,097 mg/mL. Os resultados encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19 – Solubilidade de ciclopirox olamina em solução tampão fosfato pH 7,4, 10 mM.

Amostra	Resultado (mg/mL)
1	5,033
2	5,187
3	5,149
4	5,076
5	5,041
Média (mg/mL)	5,097
RSD %	1,33

ROLLAND *et al.*, 1992, verificou que a composição da solução receptora pode influenciar na liberação *in vitro* de substâncias a partir de formulações de uso tópico. Os resultados do teste de liberação *in vitro* de hidrocortisona foram diferentes quando se utilizou água ou propilenoglicol como solução receptora, devido à diferentes coeficientes de solubilidade do fármaco.

Segundo ZATZ, 1998, nos ensaios de liberação, a solubilidade do fármaco deve ser, no mínimo, dez vezes a alta mais concentração esperada na solução receptora ().

A solubilidade de ciclopírox olamina na solução receptora de tampão fosfato pH 7,4, 10 mM não foi fator limitante para o processo de difusão, pois, de acordo com os resultados, verificou-se que a mesma apresentou adequada propriedade solvente para fármaco.

6 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* EM CÉLULAS DE DIFUSÃO UTILIZANDO MEMBRANA SINTÉTICA DE ÉSTER DE CELULOSE

Após as coletas da solução receptora e posterior quantificação de ciclopírox olamina em cada amostra, foram obtidos os resultados, em $\mu\text{g/mL}$, mostrados na Tabela 20.

Tabela 20 – Concentração de ciclopírox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de solução receptora do teste de liberação *in vitro* da formulação base, utilizando células de difusão e membranas sintéticas de éster de celulose.

Célula de difusão	Resultados ($\mu\text{g/mL}$)				
	0,5h	1h	2h	4h	8h
1	248,594	326,753	328,210	315,208	265,221
2	238,034	294,188	322,181	304,956	255,450
3	242,749	284,373	309,676	298,755	248,510
4	231,553	294,816	323,278	298,755	267,565
5	241,459	302,579	337,660	328,091	284,991
6	239,658	315,298	312,684	330,188	269,845
7	237,549	299,874	330,288	299,489	260,725
8	244,021	308,225	301,587	308,285	250,054
9	239,946	325,514	329,584	300,480	279,852
10	246,652	310,148	325,854	298,458	249,504
11	240,516	304,658	321,379	301,338	280,284
12	238,932	298,697	304,672	306,279	254,287
Média	240,805	305,427	320,588	307,523	263,857

Aplicando-se a equação $Q_{real,t} = C_{medurada,t} \cdot V_r + V_a \sum^{n-1} C_a$, onde Q_{real} é o valor real (sem diluições) no tempo t , $C_{medurada,t}$ é a concentração determinada no tempo t , V_r é volume da célula de difusão, V_a é o volume de amostra removido, C_a é a concentração da amostra removida, os resultados foram obtidos em $\mu\text{g/cm}^2$ (Tabela 21), sendo que o volume da célula de difusão foi de 7 mL e a área de exposição de $1,77 \text{ cm}^2$. Com isso, foi obtido o gráfico de liberação, mostrado na Figura 39.

Tabela 21 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas amostras de solução receptora do teste de liberação *in vitro* da formulação base, utilizando células de difusão e membranas sintéticas.

Resultados (Média x 7 / 1,77) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)				
0,5h	1h	2h	4h	8h
952,336	1207,903	1267,862	1216,192	1043,502

Figura 39. Perfil de liberação de ciclopirox olamina da formulação base, com membrana de éster de celulose.

O estudo de liberação de ciclopirox olamina teve como objetivo verificar como o mesmo é liberado do veículo. Nesse estudo, determinou-se a cinética de liberação do fármaco da forma farmacêutica.

Com os resultados obtidos, verificou-se que ciclopirox olamina foi liberado rapidamente do veículo em estudo, pois logo na primeira coleta, já foi possível quantificá-lo na solução receptora e, a partir deste tempo, a quantidade detectada foi crescente até a estabilização (aproximadamente

em 4 horas). Deste modo, a liberação não é etapa determinante da eficiência do produto, já que a formulação base libera o fármaco rapidamente de seu veículo, tornando-o biodisponível para que o mesmo penetre na pele e atinja a camada de pele alvo (OSTRENGA *et al.*, 1971).

7 ESTUDO *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

7.1 Fórmula de loção base e fórmulas A, B e C

Não foi possível quantificar ciclopirox olamina nas amostras coletadas de solução receptora dos testes de permeação cutânea *in vitro* da fórmula de loção base e das fórmulas A, B e C, conforme cromatogramas mostrados nas Figuras 40, 41, 42 e 43.

Figura 40. Cromatograma da amostra de solução receptora coletada do teste de permeação cutânea *in vitro* da fórmula de loção base de ciclopirox olamina.

Figura 41. Cromatograma da amostra de solução receptora coletada do teste de permeação cutânea *in vitro* da fórmula A, 15% de propilenoglicol.

Figura 42. Cromatograma da amostra de solução receptora coletada do teste de permeação cutânea *in vitro* da fórmula B, 15% etoxidiglicol.

Figura 43. Cromatograma da amostra de solução receptora coletada do teste de permeação cutânea *in vitro* da fórmula C, 5% ácido oléico.

A concentração de fármaco nas soluções receptoras foi menor de 0,039 µg/mL (Limite de detecção do método), o que permite considerar que ciclopirox olamina, provavelmente, não atinge a circulação sistêmica após aplicação tópica da fórmula de loção base e das fórmulas A, B e C, pois não foram encontradas quantidades significativas do fármaco nas amostras de solução receptora coletadas no tempo dos experimentos. Isso se explica, pois ciclopirox olamina liga-se altamente às proteínas plasmáticas e, além disso, seu tempo de meia-vida é curto, não havendo acúmulo sistêmico, mesmo com a adição dos promotores de penetração testados (GOODMAN *et al.*, 1989).

Estes resultados estão de acordo com os experimentos de JUE, DAWSON, BROGDEN, 1985, onde verificaram que a quantidade de ciclopirox olamina absorvida pela circulação sistêmica é mínima.

Em formulações de uso tópico para tratamento de micoses superficiais, é desejável que o fármaco atinja somente as camadas de pele onde a infecção se instala, sem atingir a via sistêmica (HÄNEL, RAETHER, DITTMAR, 1988).

8 ESTUDO *IN VITRO* DE RETENÇÃO CUTÂNEA

8.1 *Tape stripping*

Loção base

Após extração de ciclopirox olamina com metanol e posterior quantificação do fármaco contido nas fitas adesivas, foram obtidas as concentrações descritas na Tabela 22.

Tabela 22 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de *tape stripping* da formulação de loção base.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	4,992
2	3,648
3	4,215
4	3,018
5	3,669
6	3,115
Média	3,7761

Fórmula A, 15% propilenoglicol

Após extração de ciclopirox olamina com metanol e posterior quantificação do fármaco contido nas fitas adesivas, foram obtidas as concentrações descritas na Tabela 23.

Tabela 23 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de *tape stripping* da fórmula A.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	2,121
2	3,524
3	2,073
4	3,887
5	2,987
6	4,015
Média	3,1012

Fórmula B, 15% etoxidiglicol

Após extração de ciclopirox olamina com metanol e posterior quantificação do fármaco contido nas fitas adesivas, foram obtidas as concentrações descritas na Tabela 24.

Tabela 24 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de *tape stripping* da fórmula B.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	3,154
2	2,055
3	3,651
4	4,652
5	3,685
6	2,497
Média	3,2823

Fórmula C, 5% ácido oléico

Após extração de ciclopirox olamina com metanol e posterior quantificação do fármaco contido nas fitas adesivas, foram obtidas as concentrações descritas na Tabela 25.

Tabela 25 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de *tape stripping* da fórmula C.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	3,623
2	4,654
3	3,601
4	2,648
5	3,058
6	2,937
Média	3,4201

A fórmula base, sem substância promotora de penetração, originou maiores concentrações de ciclopirox olamina no estrato córneo, ao contrário das fórmulas A e B. Isto indica que a partir das formulações contendo propilenoglicol e etoxidiglicol, o fármaco ultrapassou mais facilmente esta barreira, atingindo camadas mais profundas da pele.

8.2 Retenção na epiderme e derme

Obteve-se o homogenato de pele e, após extração de ciclopirox olamina com metanol e quantificação do fármaco retido na epiderme e derme, foram obtidas as concentrações descritas nas Tabelas 26, 27, 28 e 29, com as respectivas fórmulas.

Tabela 26 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de retenção na epiderme e derme da formulação de loção base.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,952
2	0,990
3	0,894
4	0,937
5	0,794
6	0,982
Média	0,925

Tabela 27 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de retenção na epiderme e derme da fórmula A, 15% de propilenoglicol.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	1,980
2	1,935
3	1,986
4	1,999
5	1,908
6	1,988
Média	1,966

Tabela 28 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de retenção na epiderme e derme da fórmula B, 15% de etoxidiglicol.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	1,792
2	1,788
3	1,982
4	1,866
5	1,834
6	1,879
Média	1,857

Tabela 29 – Concentração de ciclopirox olamina ($\mu\text{g/mL}$) nas amostras de retenção na epiderme e derme da fórmula C, 5% de ácido oléico.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	1,694
2	1,726
3	1,638
4	1,722
5	1,701
6	1,800
Média	1,713

Comparando-se os resultados obtidos nos estudos de *tape stripping* e retenção cutânea na epiderme e derme, verificou-se que ciclopirox olamina fica muito retido na camada córnea, visto que maiores concentrações do fármaco foram obtidas no teste de *tape stripping*. Estes resultados são comparáveis ao estudo *in vitro* de JUE, DAWSON, BROGDEN, 1985, no qual foram encontradas maiores concentrações de ciclopirox olamina na

camada córnea, porém, com concentrações adequadas do fármaco nas camadas mais profundas da pele, acima da concentração mínima inibitória para microrganismos sensíveis.

ALY *et al.*, 1989, também encontraram maiores concentrações de ciclopirox olamina no estrato córneo, após teste *in vitro*, utilizando peles de porco e sistema de difusão.

Os estudos *in vitro* são correspondentes aos resultados *in vivo*, encontrados por GUPTA, 2001. Em estudo com voluntários sadios, verificou-se que após o teste de *tape stripping*, ciclopirox olamina foi capaz de atingir concentrações acima da concentração mínima inibitória nas camadas mais superficiais do estrato córneo e baixas concentrações nas camadas mais profundas, após 2 horas da aplicação de uma formulação de uso tópico.

No estudo de retenção na epiderme e derme, verificou-se que ciclopirox olamina atingiu maiores concentrações quando veiculado na fórmula A, contendo 15% de propilenoglicol. Isto pode ser explicado pelo fato de o mesmo atuar como solvente, aumentando a solubilidade do fármaco na pele, e, portanto, aumentando a partilha de ciclopirox olamina no estrato córneo. Conseqüentemente, a difusão foi aumentada, fazendo com que o fármaco atingisse camadas mais profundas da pele (MOSER *et al.*, 2001b).

De acordo com BENDAS, NEUBERT, WOHLRAB, 1995, o propilenoglicol é um promotor de penetração tanto para substâncias lipofílicas quanto para as substâncias polares. A penetração do propilenoglicol no estrato córneo favorece a partição de moléculas do fármaco, devido à mudanças de atividades de gradiente.

Além disso, verificou-se também que a quantidade de propilenoglicol na fórmula A está adequada, pois a liberação de ciclopirox olamina não foi prejudicada pela afinidade do fármaco pelo veículo. Com a concentração de 15% de propilenoglicol na fórmula de loção, foi possível obter a termodinâmica necessária para que o sistema liberasse o fármaco adequadamente.

Igualmente, o mesmo efeito é proposto pela ação do etoxidiglicol, porém, menos pronunciado que o propilenoglicol.

O ácido oléico apresentou efeito promotor de penetração na fórmula testada, porém, mostrou-se inferior ao propilenoglicol e ao etoxidiglicol, visto que este atua desorganizando a barreira lipofílica do estrato córneo, aumentando a passagem de substâncias mais lipofílicas (GWAK, CHUN, 2002).

Embora inferior aos resultados do propilenoglicol, o efeito promotor de penetração do ácido oléico pode ser considerado significativo e a combinação do mesmo com propilenoglicol poderia resultar em efeito mais pronunciado de penetração na pele (WILLIAMS, 2004; BENDAS *et al.*, 1995).

9 QUALIFICAÇÃO DO EQUIPAMENTO EMPREGADO NOS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO CUTÂNEA

Os estudos de liberação e penetração cutânea são, geralmente, estudos que demandam enorme tempo para execução, especialmente, nas amostragens da solução receptora. Ao mesmo tempo, são estudos com importância crescente, pois são indispensáveis no período de pré-formulação, além de serem utilizados para comparação de produtos genéricos com o produto referência e para garantia de qualidade lote a lote (CÓRDOBA-DÍAS, 2000).

Considerando essas questões, verifica-se que um sistema de amostragem automática é altamente recomendável. Porém, para que os resultados obtidos sejam confiáveis, o sistema deve ser capaz de manter constantes a temperatura e a velocidade de rotação no compartimento doador, coletar adequadamente os volumes requeridos de solução receptora, nos tempos pré-determinados (CÓRDOBA-DÍAS, 2000).

De acordo com os resultados obtidos, o sistema de amostragem automática Microette® foi considerado qualificado.

9.1 Controle da regulação térmica do sistema

O sistema térmico do equipamento Microette® é composto por dois banhos-maria com circulação de água, com duas velocidades e controle digital de temperatura. A temperatura em que o sistema é mantido durante o experimento deve ser constante, visto que variações de temperatura podem interferir na liberação e permeação cutânea (ZATZ, 1998).

De acordo com os resultados mostrados nas Tabelas 30 e 31, o equipamento foi aprovado no teste de avaliação térmica, pois os valores obtidos encontraram-se dentro do critério de aceitação, exceto durante os tempos de amostragem, onde há alguns valores fora do critério de

aceitação, pois neste tempo, acrescentou-se solução às células, não permanecendo mais que 1 minuto fora do critério de aceitação.

Tabela 30 – Temperaturas dos sensores (S1 a S9) posicionados no lado A do equipamento Microette® durante monitoramento do controle térmico do sistema.

Temperatura (°C)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Máxima	37,2	36,8	36,8	37,2	36,9	36,8	37,1	38,0	38,0
Mínima	36,0	35,5	35,2	36,0	36,1	36,0	36,8	36,9	36,8
Média	36,5	36,2	36,2	36,5	36,3	36,2	36,9	37,1	37,0

* Tempo total do ensaio: 24 horas, 32 minutos e 35 segundos.

** Limite de aceitação: $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Tabela 31 – Temperaturas dos sensores (S1 a S9) posicionados no lado B do equipamento Microette® durante monitoramento da qualificação térmica do sistema.

Temperatura (°C)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Máxima	36,0	36,3	36,3	36,3	36,2	36,0	36,7	37,1	37,0
Mínima	35,4	35,8	35,9	36,0	35,7	35,6	36,6	36,9	36,9
Média	35,8	36,2	36,2	36,2	36,1	35,9	36,7	37,0	37,0

* Tempo total do ensaio: 24 horas, 32 minutos e 35 segundos.

** Limite de aceitação: $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

9.2 Qualificação de operação

9.2.1 Teste de programação do controlador SIP

De acordo com os resultados do teste de programação do controlador SIP, verificou-se que o mesmo opera de maneira consistente, sendo aprovado na qualificação de operação (Tabela 32).

Tabela 32 – Resultados do teste de programação do controlador SIP.

Teste	Parâmetro selecionado no controlador SIP	Parâmetro executado
Seleção de protocolo	10	10
Opção de amostragem	Lado A	Lado A
	Lado B	Lado B
	Lado A e Lado B	Lado A e Lado B
Intervalo de tempo entre a amostragem do lado A e B	4 minutos	4'00"700
	7 minutos	7'00"700
	15 minutos	15'01"200
Número de amostragens	1 coleta	1 coleta
	6 coletas	6 coletas
	24 coletas	24 coletas
Tempo entre cada amostragem	01:00	01:00'02"200
	01:00	01:00'02"000
	02:00	02:00'05"000

9.2.2 Velocidade de rotação das células de difusão

Após estabilização da leitura no tacômetro, anotou-se a velocidade de agitação, comparando-a com o valor de velocidade de agitação selecionada no Variomag[®]. Para as velocidades de 300 e 600 rpm, os valores foram correspondentes, para todas as células de difusão. Porém, no caso da velocidade de 900 rpm, não foi possível executar a leitura, pois o diâmetro do eixo do agitador da célula de difusão é muito pequeno para o foco de luz do tacômetro (Tabela 33).

Tabela 33 – Velocidade de agitação nas células de difusão.

Lado	Velocidade	Cel 1	Cel 2	Cel 3	Cel 4	Cel 5	Cel 6
A	300 rpm	299,9	300,2	299,7	300,4	300,2	300,0
A	300 rpm	300,3	300,0	300,2	300,1	300,1	300,0
B	300 rpm	300,0	300,1	300,1	300,0	299,6	301,2
B	300 rpm	300,0	300,3	299,6	300,1	299,6	301,4
A	600 rpm	600,2	600,4	600,0	600,2	599,9	600,3
A	600 rpm	600,0	599,8	600,4	599,9	600,6	600,4
B	600 rpm	599,9	600,2	600,3	599,9	600,6	600,4
B	600 rpm	600,4	600,0	600,4	600,0	600,6	600,3
A	900 rpm	*	*	*	*	*	*
A	900 rpm	*	*	*	*	*	*
B	900 rpm	*	*	*	*	*	*
B	900 rpm	*	*	*	*	*	*

* Não foi possível realização da leitura no tacômetro.

Limites de aceitação:

- para 300 rpm: de 285 a 315 rpm
- para 600 rpm: de 570 a 630 rpm
- para 900 rpm: de 855 a 945 rpm

A velocidade de rotação das células de difusão é importante, pois garante a homogeneidade da solução receptora no interior do compartimento receptor.

MORELL, CLARAMONTE, VIALARD, 1996, verificaram que a precisão do teste de liberação diminui se não há agitação da solução no interior da célula de difusão. Além disso, também constataram que a velocidade ideal de rotação é entre 400 a 600 rpm, com as quais há garantia da homogeneidade do meio. Acima de 1000 rpm, a precisão do teste diminui novamente, provavelmente devido à turbulência causada no interior da célula.

9.2.3 Volume de amostragem

Para toda a faixa de trabalho, verificou-se que os volumes coletados permaneceram dentro do critério de aceitação de $\pm 0,05$ mL (Tabelas 34, 35 e 36).

Esses resultados são comparáveis aos encontrados por CÓRDOBA-DÍAS, 2000, utilizando células de difusão de fluxo contínuo.

Tabela 34 – Volume de amostragem de 0,5 mL.

Lado A	1°	2°	3°	4°	5°	6°	Média	RSD
Cânula 1	0,4971	0,4923	0,4891	0,4968	0,4972	0,4986	0,4952	0,7424
Cânula 2	0,4959	0,4942	0,4927	0,4940	0,4967	0,4952	0,4948	0,2892
Cânula 3	0,4942	0,4948	0,5006	0,4986	0,4996	0,4996	0,4979	0,5442
Cânula 4	0,4977	0,4763	0,4936	0,4919	0,4935	0,4954	0,4914	1,5512
Cânula 5	0,4957	0,4950	0,4967	0,4966	0,4965	0,4961	0,4961	0,1307
Cânula 6	0,4867	0,4863	0,4827	0,4813	0,4870	0,4906	0,4857	0,6836
Média (mL)	0,4945	0,4898	0,4926	0,4932	0,4951	0,4959		
RSD (%)	0,8150	1,5055	1,2562	1,2781	0,8939	0,6412		
Lado B	1°	2°	3°	4°	5°	6°	Média	RSD
Cânula 1	0,4924	0,4912	0,4918	0,4905	0,4897	0,4951	0,4918	0,3846
Cânula 2	0,4988	0,4941	0,4940	0,4893	0,4938	0,4963	0,4944	0,6372
Cânula 3	0,4894	0,4861	0,4892	0,4851	0,4945	0,4956	0,4900	0,8742
Cânula 4	0,4891	0,4935	0,4910	0,4893	0,4982	0,4971	0,4930	0,7970
Cânula 5	0,4935	0,4860	0,4900	0,4895	0,4920	0,4935	0,4907	0,5871
Cânula 6	0,4715	0,4860	0,5781	0,4748	0,4762	0,4849	0,4786	1,1971
Média (mL)	0,4891	0,4895	0,4890	0,4864	0,4907	0,4938		
RSD (%)	1,9019	0,8004	1,1427	1,2346	1,5564	0,9118		

Tabela 35 – Volume de amostragem de 1,0 mL.

Lado A	1°.	2°.	3°.	4°.	5°.	6°.	Média	RSD
Cânula 1	0,9973	0,9933	0,9910	0,9864	0,9942	0,9948	0,9928	0,3763
Cânula 2	0,9902	0,9935	0,9837	0,9850	0,9931	0,9917	0,9879	0,4336
Cânula 3	0,9904	0,9854	0,9845	0,9915	0,9939	0,9982	0,9907	0,5248
Cânula 4	0,9788	0,9873	0,9833	0,9838	0,9865	0,9872	0,9845	0,3310
Cânula 5	0,9897	0,9905	0,9932	0,9915	0,9920	0,9939	0,9918	0,1621
Cânula 6	0,9850	0,9772	0,9783	0,9899	0,9861	0,9887	0,9842	0,5407
Média (mL)	0,9886	0,9862	0,9857	0,9880	0,9910	0,9924		
RSD (%)	0,6255	0,5739	0,5573	0,3438	0,3714	0,4116		
Lado B	1°.	2°.	3°.	4°.	5°.	6°.	Média	RSD
Cânula 1	0,9850	0,9810	0,9846	0,9802	0,9868	0,9850	0,9838	0,2635
Cânula 2	0,9872	0,9901	0,9842	0,9903	0,9863	0,9876	0,9876	0,2332
Cânula 3	0,9802	0,9861	0,9778	0,9842	0,9904	0,9894	0,9847	0,5076
Cânula 4	0,9865	0,9855	0,9858	0,9888	0,9934	0,9899	0,9883	0,3077
Cânula 5	0,9833	0,9887	0,9820	0,9789	0,9921	0,9885	0,9856	0,5026
Cânula 6	0,9633	0,9623	0,9523	0,9524	0,9777	0,9733	0,9635	1,0847
Média (mL)	0,9809	0,9823	0,9778	0,9791	0,9878	0,9856		
RSD (%)	0,9175	1,0457	1,3092	1,4153	0,5770	0,6368		

Tabela 36– Volume de amostragem de 1,5 mL.

Lado A	1°	2°	3°	4°	5°	6°	Média	RSD
Cânula 1	1,4972	1,4927	1,4935	1,4948	1,5017	1,5024	1,4971	0,2801
Cânula 2	1,4912	1,4943	1,4860	1,4878	1,4903	1,5014	1,4918	0,3692
Cânula 3	1,4912	1,4950	1,4896	1,4948	1,5006	1,5017	1,4955	0,3250
Cânula 4	1,4871	1,4863	1,4833	1,4784	1,4819	1,4831	1,4833	0,2129
Cânula 5	1,4972	1,4972	1,4960	1,4931	1,4978	1,4997	1,4968	0,1480
Cânula 6	1,4805	1,4832	1,4822	1,4815	1,4764	1,4900	1,4823	0,3013
Média (mL)	1,4907	1,4915	1,4884	1,4884	1,4914	1,4964		
RSD (%)	0,4282	0,3689	0,3743	0,4783	0,7018	0,5342		
Lado B	1°	2°	3°	4°	5°	6°	Média	RSD
Cânula 1	1,4805	1,4809	1,4820	1,4822	1,4902	1,4876	1,4839	0,2716
Cânula 2	1,4788	1,4797	1,4800	1,4806	1,4856	1,4856	1,4817	0,2050
Cânula 3	1,4788	1,4796	1,4742	1,4823	1,4881	1,4881	1,4818	0,3704
Cânula 4	1,4817	1,4893	1,4853	1,4829	1,4986	1,4910	1,4881	0,4197
Cânula 5	1,4895	1,4877	1,4864	1,4879	1,4939	1,4974	1,4905	0,2874
Cânula 6	1,4676	1,4633	1,4578	1,4544	1,4863	1,4769	1,4682	0,8512
Média (mL)	1,4795	1,4801	1,4776	1,4784	1,4904	1,4882		
RSD (%)	0,4767	0,6232	0,7201	0,8144	0,3359	0,3969		

9.2.4 Verificação do relógio interno do equipamento (*Timer*) de amostragem automática

Após término do experimento simulado, o valor obtido no cronômetro foi comparado com o relógio interno do equipamento, exibido no display do controlador SIP. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 37, o equipamento foi aprovado neste teste.

Tabela 37 – Comparação entre os tempos totais do cronômetro padrão e do relógio interno do equipamento (*Timer*).

	Cronômetro Padrão	<i>Timer</i> do equipamento	Diferença	Especificação Desvio ≤ 10 seg
Medição 1	1:00'02"600	1:00'00"000	02"600	De acordo
Medição 2	1:00'02"800	1:00'00"000	02"800	De acordo
Medição 3	1:00'03"000	1:00'00"000	03"000	De acordo

Após conclusão dos testes de qualificação do sistema de amostragem automática, verificou-se que o mesmo opera adequadamente.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

De acordo com o estudo de estabilidade física, as fórmulas de loção base de ciclopirox olamina contendo os promotores de penetração cutânea (fórmulas A, B e C), podem ser consideradas estáveis em relação ao aspecto e pH. Não houve formação de cristais de ciclopirox olamina nas formulações, provando a eficiência do sistema solvente utilizado nas formulações.

Foi possível desenvolver e validar o método de quantificação analítica para os estudos de liberação, permeação e retenção cutâneas, empregando as membranas sintéticas e naturais, respectivamente, pois não houve interferência da solução receptora, do estrato córneo ou mesmo da epiderme e derme.

No estudo de liberação *in vitro*, verificou-se que ciclopirox olamina é liberado rapidamente da fórmula testada, não sendo esta etapa determinante da eficiência do produto.

Não há absorção sistêmica de ciclopirox olamina a partir das formulações de uso tópico, de acordo com os estudos de permeação cutânea *in vitro*.

As maiores concentrações de ciclopirox olamina foram encontradas no estrato córneo, para todas as formulações desenvolvidas.

Propilenoglicol foi o promotor de penetração mais eficiente para a formulação de loção base estudada, utilizando o método em questão.

O equipamento de amostragem automática de células de difusão mostrou operar de maneira consistente, de acordo com os resultados da qualificação de operação e performance.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise estatística dos resultados do estudo de *tape stripping*

Comparação fórmula base e fórmula A:

Anova: fator único

RESUMO				
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	6	22,657	3,776166667	0,542138967
Coluna 2	6	18,607	3,101166667	0,732460167

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,366875	1	1,366875	2,144791981	0,173772	4,964591
Dentro dos grupos	6,37299567	10	0,637299567			
Total	7,73987067	11				

Comparação fórmula base e fórmula B:

Anova: fator único

RESUMO				
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	6	22,657	3,776166667	0,542138967
Coluna 2	6	19,694	3,282333333	0,862721467

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,731614083	1	0,731614083	1,041546998	0,331517	4,964591
Dentro dos grupos	7,024302167	10	0,702430217			
Total	7,75591625	11				

Comparação fórmula base e fórmula C:

Anova: fator único

RESUMO				
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	6	22,657	3,776166667	0,542138967
Coluna 2	6	20,521	3,420166667	0,511408567

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,380208	1	0,380208	0,72176715	0,415441	4,964591
Dentro dos grupos	5,267737667	10	0,526773767			
Total	5,647945667	11				

APÊNDICE B – Análise estatística dos resultados do estudo de retenção na epiderme e derme

Comparação fórmula base com fórmula A:

Anova: fator único

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	6	5,549	0,92483333	0,005293767
Coluna 2	6	11,796	1,966	0,0012988

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	3,252084	1	3,25208408	986,591186	2,51385E-11	4,964591
Dentro dos grupos	0,032963	10	0,00329628			
Total	3,285047	11				

Comparação fórmula base com fórmula B:

Anova: fator único

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	6	5,549	0,924833	0,005294
Coluna 2	6	11,141	1,856833	0,005141

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	2,605872	1	2,605872	499,4612	7,22982E-10	4,964591
Dentro dos grupos	0,052174	10	0,005217			
Total	2,658046	11				

Comparação fórmula base com fórmula C:

Anova: fator único

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	6	5,549	0,924833	0,005294
Coluna 2	6	10,281	1,7135	0,00279

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,865985	1	1,865985	461,6909	1,0634E-09	4,964591
Dentro dos grupos	0,040416	10	0,004042			
Total	1,906402	11				

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAMS, B.B.; HANEL, H.; HOEHLER, T. Ciclopirox olamine: a hydroxypyridone antifungal agent. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.9, n.4, p.471-477, 1991.

ADDICKS, W.J.; WEINER, N.D. Drug delivery from topical formulations: theoretical prediction and experimental assessment. In: OSBORNE, D.W.; AMANN, A.H., eds. **Topical drug delivery formulations**. New York: Marcel Dekker, 1990. cap.12, p.221-243. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.42).

ADEMOLA, J. Drug delivery from topical formulations. In TAPASHI, K.; GHOSH, W.R.; PFISTER, W.R.; YUM, S.I., eds. **Transdermal and topical drug delivery systems**. Buffalo Grove: Interpharm Press, 1997. cap. 13, p.511-538.

AKAZAWA, M.; ITOH, T.; MASAKI, K.; NGHIEM, B.T.; TSUZUKI, N.; KONISHI, R.; HIGUCHI, T. An automated method for continuously monitoring diffusion cells in skin penetration studies. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v,50, n.1, p.53-60, 1989.

ALBERY, W.J.; HADGRAFT, J. Percutaneous absorption: *in vivo* experiments. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.31, n.3, p.140-147, 1979.

*De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 2004.

ALY, R.; MAIBACH, H.I.; BAGATELL, F.K.; DITTMAR, W.; HANEL, H.; FALANGA, V.; LEUDEN, J.J.; ROTH, H.L.; STOUGHTON, R.B.; WILLIS, I.; ABRAMS, B.B.; LAKSHMINARAYANAN, M. Ciclopirox olamine lotion 1%: bioequivalence to ciclopirox olamine cream 1% and clinical efficacy in Tinea Pedis. **Clin. Ther.**, Hillsborough, v.11, n.3, p.290-303, 1989.

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, n.1/2, p.17-25, 2001.

ASTLEY, J.P.; LEVINE, M. Effect of Dimethyl sulfoxide on permeability of human skin *in vitro*. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.65, n.2, p.210-215, 1976.

AZULAY, R.D.; AZULAY, D.R. **Dermatologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap.1, p.1-10.

BABU, R.J.; KANIKKANNAN, N.; KIKWAI, L.; ORTEGA, C.; ANDEGA, S.; BALL, K.; YIM, S.; SINGH, M. The influence of various methods of cold storage of skin on the permeation of melatonin and nimesulide. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.86, n.1, p.49-57, 2003.

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

BARRY, B.W. Penetration enhancers. In: SHROOT, B.; SCHAEFER, H., eds. **Skin pharmacokinetics**. Basel: Karger, 1987. p.121-137. (Pharmacology and the skin, v.1) (CIRD Symposium on Advances in Skin Pharmacology, 7, Nice, 1986).

BARRY, B.W. **Dermatological formulations**: percutaneous absorption. New York: Marcel Dekker, 1983. 480p. (Drug and the pharmaceutical sciences, v.18).

- BARTEK, M.J.; LABUDDE, J.A. MAIBACH, H.I. Skin permeability *in vivo*: comparison in rat, rabbit, pig and man. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.58, n.3, p.114-123, 1972.
- BENDAS, B.; NEUBERT, R.; WOHLRAB, W. Propylene glycol. In: SMITH, E.W.; MAIBACH, H.I., eds. **Percutaneous penetration enhancers**. Boca Raton: CRC Press, 1995. cap.3.2, p.61-75.
- BENTLEY, M.V.L.B.; VIANNA, R.F.; WILSON, S.; COLLETT, J.H. Characterization of the influence of some cyclodextrins on the stratum corneum from the hairless mouse. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.49, n.4, p.397-402, 1997.
- BENTLEY, M.V.L.B. **Desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo corticosteróides: avaliação da liberação e penetração transcutânea por metodologia *in vitro***. São Paulo, 1994. 155p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- BENY, M.G. Fisiologia da pele. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.12, p.44-50, 2000.
- BEVACQUA, A.J.; LAHANAS, K.M.; COHEN, I.D.; CIOCA, G. Liquid crystals in multiple emulsions. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.106, p.53-56, 1991.
- BILLICH, A.; ASCHAUER, H.; ASZODI, A.; STUETZ, A. Percutaneous absorption of drugs used in atopic eczema: pimecrolimus permeates less through skin than corticosteroids and tacrolimus. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.269, n.1, p.29-35, 2004.

BOSMAN, I.J.; AVEGAART, S.R.; LAWANT, AL.; ENSING, K.; DE ZEEUW, R.A. Evaluation of a novel diffusion cell for *in vitro* transdermal permeation: effects of injection height, volume and temperature. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.17, n.3, p.493-499, 1998.

BOUWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S.; WHITE, S.H. X-Ray analysis of the stratum corneum and its lipids. In: POTTS, R.O.; GUY, R.H., eds. **Mechanisms of transdermal drug delivery**. New York: Marcel Dekker. 1997. cap.2, p.41-85. (Drugs and Pharmaceutical Sciences, v.83).

BROUNAGH, R.L.; YOURICK, J.J. Role of skin absorption in cosmetic development. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.115, n.3, p.47-52, 2000.

BROUNAGH, R.L.; COLLIER, S.W. *In vitro* methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J.L., ed. **Skin permeation: fundamentals and application**. 3.ed. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993. cap.4, p.93-111.

BRONAUGH, R.L.; STEWART, R.F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies. III. Hydrophobic compounds. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.73, n.9, p.1255-1257, 1984.

BRONAUGH, R.L.; STEWART, R.F.; SIMON, M. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies. VII. Use of excised human skin. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.75, n.11, p.1094-1097, 1986.

BRONAUGH, R.L.; STEWART, R.F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies. VI. Preparation of the barrier layer. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.75, n.5, p.487-491, 1986.

- BRONAUGH, R.L.; STEWART, R.F.; CONGDON, E.R. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies. II. Animal models for human skin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.62, n.3, p.481-488, 1982.
- CAPPEL, M.J.; KREUTER, J. Effect of nonionic surfactants on transdermal drug delivery. I. Polysorbates. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.69, p.143-153, 1991.
- CARR, M.G.; CORISH, J.; CORRIGAN, O.I. Drug delivery from a liquid crystalline base across Visking and human stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.157, n.1, p.35-42, 1997.
- CESCHIN ROQUES, C.G.; HANEL, H.; PRUJA BOUGARET, S.M.; LUC, J.; VANDERMANDER, J.; MICHEL, G. Ciclopirox nail lacquer 8%: *in vivo* penetration into and through nails and *in vitro* effect on pig skin. **Skin Pharmacol.**, Basel, v.4, n.2, p.89-94, 1991.
- CLÉMENT, P.; LAUGEL, C.; MARTY, J.P. *In vitro* release of caffeine from concentrated W/O emulsions: effect of formulation parameters. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.207, p.7-20, 2000.
- CODERCH, L.; OLIVA, M.; PONS, M.; DE LA MAZA, A.; PARRA, J.L. Percutaneous penetration of liposomes using the tape stripping technique. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.139, p.197-203, 1996.
- COOPER, E.R. Increased skin permeability for lipophilic molecules. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.73, n.8, p.1153-1156, 1984.
- COPPI, G.; SILINGARDI, S. HPLC method for pharmacokinetic studies on ciclopirox olamine in rabbits after intravenous and intra vaginal administrations. **Farmaco**, Paris, v.47, suppl.5, p.779-786, 1992.

- CÓRDOBA-DÍAS, M.; NOVA, M.; ELORZA, B.; CÓRDOBA-DÍAS, B.; CHANTRES, J.R.; CORDOBA-BORREGO, M. Validation protocol of an automated in-line-flow-through diffusion equipment for *in vitro* permeation studies. **J. Controlled Release**, Madrid, v.69, p.357-367, 2000.
- CULLEN, S.I.; FROST, P.; JACOBSON, C.; KANOF, N.B.; WILLIS, I. Treatment of Tinea versicolor with a new antifungal agent, ciclopirox olamine cream 1%. **Clin. Ther.**, Hillsborough, v.7, n.5, p.574-583, 1985.
- DAYAN, N. Pathways for skin penetration. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.120, n.6, p.67-76, 2005.
- DEL PALACIO, A.; LÓPEZ-GOMEZ, S.; GONZÁLES-LASTRA, F. Tratamiento corto con ciclopirox olamina 1% (Ciclochem®) en pitiriasis versicolor. **Actas Dermo-Sifiliogr.**, Madrid, v.79, n.4, 365-369, 1988.
- DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochem.**, Amsterdam, v.39, p.1033-1046, 2004.
- DE WEVER, B.; CHARBONNIER, V. Using tissue skin equivalent to evaluate the irritation potential of skin care products. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.117, n.9, p28-36, 2002.
- DI COLO, G.; GIANNESI, C.; NANNIPIERI, E.; SERAFINI, M.F.; VITALE, D. Influence of drug surfactant and skin surfactant interactions on percutaneous absorption of two model compounds from ointment bases *in vitro*. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.50, n.1, p.27-34, 1989.
- DOUCET, O.; GARCIA, N.; ZASTROW, L. Skin culture model: a possible alternative to the use of excised human skin for assessing *in vitro* percutaneous absorption. **Toxicol. In Vitro**, Amsterdam, v.12, n.4, p.423-430, 1998.

DOWNING, D.T. Função dos lipídios na estrutura epidérmica. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.4, p.39-44, 1992.

DUPUIS, D.; ROUGIER, A.; ROGUET, R.; LOTTE, C.; KALOPISSIS, G. *In vivo* relationship between horny layer reservoir effect and percutaneous absorption in human and rat. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.82, n.4, p.353-356, 1984.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2001. suppl., p.627-629.

FANG, J.Y.; HWANG, T.L.; FANG, C.L.; CHIU, H.C. *In vitro* and *in vivo* evaluations of the efficacy and safety of skin permeation enhancers using flurbiprofen as a model drug. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.225, n.1/2, p.153-166, 2003.

FRANZ, T.J. Percutaneous absorption: on the relevance of *in vitro* data. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.64, p.109-195, 1975.

FUHRMAN, L.C.; MICHNIAK, B.B.; BEHL, C.R.; MALICK, A.W. Effect of novel penetration enhancers on the transdermal delivery of hydrocortisone: an *in vitro* species comparison. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.45, n.2, p.199-206, 1997.

GARCÍA-CELMA, M.J.; AZEMAR, N.; PES, M.A.; SOLANS, C. Solubilization of antifungal drugs in water POE(20) sorbitan monooleate oil systems. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.105, n.1, p.77-81, 1994.

GARCIA, N.; DOUCET, O.; BAYER, M.; FOUCHARD, D.; ZASTROW, L.; MARTYY, J.P. Characterization of the barrier function in a reconstituted human epidermis cultivated in chemically defined medium. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.24, n.1, p.25-34, 2002.

GERMANO, C.; SILINGARDI, S. HPLC method for pharmacokinetic studies on ciclopirox olamine in rabbits after intravenous and intravaginal administrations. **Farmaco**, Paris, v.47, suppl., n.5, p.779-786, 1992.

GUIMARÃES, M. **Liberção e permeação em membrana sintética do cetoconazol em cremes O/A**. São Paulo, 2001. 170p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

GILMAN, A.G.; RALL, T.W. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1990. p.1047-1049.

GODWIN, D.A.; MICHNIAK, B.B. Influence of drug lipophilicity on terpenes as transdermal penetration enhancers. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, Philadelphia, v.25, n.8, p.905-915, 1999.

GODWIN, D.A.; MICHNIAK, B.B. CREEK, K.E. Evaluation of transdermal penetration enhancers using a novel skin alternative. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.86, n.9, p.1001-1005, 1997.

GOODMAN, M.; BARRY, B.W. Lipid-protein-partitioning (LPP) theory of skin enhancer activity: finite dose technique. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.57, p.29-40, 1989.

GUPTA, A.K. Ciclopirox: an overview. **Int. J. Dermatol.**, Oxford, v.40, n.5, p.305-310, 2001.

GWAK, H.S.; CHUN, I.K. Effect of vehicles and penetration enhancers on the *in vitro* percutaneous absorption of tenoxicam through hairless mouse skin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.236, p.57-64, 2002.

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

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

HADGRAFT, J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.184, p.1-6, 1999.

HADGRAFT, J.; WALTERS, K.A.; WOTTON, P.K. Facilitated percutaneous absorption: a comparison and evaluation of two *in vitro* models. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.32, n.2/3, p.257-263, 1986.

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

HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. Hydration and topical corticosteroid absorption. In: SMITH, E.W.; MAIBACH, H.I., eds. **Percutaneous penetration enhancers**. Boca Raton: CRC Press, 1995. cap.2.2, p.29-33.

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.

HÄNEL, H.; RAETHER, W.; DITTMAR, W. Evaluation of fungicidal action *in vitro* and in a skin model, considering the influence of penetration kinetics of various standard antimycotics. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.544, p.329-337, 1988.

- HATANAKA, T.; KATAYAMA, M.; KOIZUMI, T.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Time-dependent percutaneous absorption enhancing effect of ethanol. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.33, n.3, p.423-428, 1995.
- HAY, R.J. Tropical fungal infections. **Pharm. Int.**, Amsterdam, v.6, n.4, p.97-101, 1985.
- HORI, M.; SATOH, S.; MAIBACH, H.I. Classification of percutaneous penetration enhancers: a conceptional diagram. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.42, n.1, p.71-72, 1990.
- HOWES, D.; GUY, R.; HADGRAFT, J.; HEYLINGS, J.; HOECK, U.; KEMPER, F.; MAIBACH, H.; MARTY, J.P.; MERK, H.; PARRA, J.; REKKAS, D.; RONDELLI, I.; SCHAEFER, H.; TAUBER, U.; VERBIESE, N. Methods for assessing percutaneous absorption: the report and recommendations of ECVAM Workshop 13. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.24, n.1, p.81-106, 1996. [Editorial Material].
- IKEDA, Y.; HIRAYAMA, F.; ARIMA, H.; UEKAMA, K.; YOSHITAKE, Y.; HARANO, K. NMR spectroscopic characterization of Metoprolol/Cyclodextrin complexes in aqueous solution: cavity size dependency. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.93, n.7, p.1659-1671, 2004.
- ILLEL, B.; SCHAEFER, H.; WEPIERRE, J.; DOUCET, O. Follicles play an important role in percutaneous absorption. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.80, n.5, p.424-427, 1991.
- JALÓN, E.G.; JOSA, M.; CAMPANERO, M.A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Determination by high-performance liquid chromatography of ketoprofen *in vitro* in rat skin permeation samples. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.870, n.1/2, p.143-149, 2000.

JUE, S.G.; DAWSON, G.W. BROGDEN, R.N. Ciclopirox olamine 1% cream: a preliminary review of its antimicrobial activity and therapeutic use. **Drugs**, Auckland, v.29, n.4, p.330-341, 1985. [Review].

KARL-HEINZ, L.; DAMM, P. Quantification of ciclopirox by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.339, p.451-456, 1985.

KENNEDY, A.H.; GOLDEN, G.M.; GAY, C.L.; GUY, R.H.; FRANCOEUR, M.L.; MAK V.H.W. Stratum corneum lipids of human epidermal keratinocyte air-liquid cultures: implications for barrier function. **Pharm. Res.**, Norwell, v.13, n.8, p.1162-1167, 1996.

KIERSTAN, K.T.E.; BEEZER, A.E.; MITCHELL, J.C.; HADGRAFT, J.; RAGHAVAN, S.L.; DAVIS, A.F. UV-spectrophotometry study of membrane transport processes with a novel diffusion cell. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.229, n.1/2, p.87-94, 2001.

KITAGAWA, S.; LI, H.; SATO, S. Skin permeation of parabens in excised guinea pig dorsal skin, its modification by penetration enhancers and their relationship with n-octanol/water partition coefficients. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.45, n.8, p.1354-1357, 1997.

KITAGAWA, S.; YOKOCHI, N.; MUROOKA, N. pH-dependence of phase transition of the lipid bilayer of liposomes of stratum corneum lipids. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.126, n.1/2, p.49-56, 1995.

KOCH, H. Ciclopiroxolamin: antifungal agent. **Pharm. Int.**, Amsterdam, v.3, p.46-47, 1982.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**: 2004-2005. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.19.7.

- KORTING, H.C.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M. The hydroxypyridones: a class of antimycotics of its own. **Mycoses**, Berlin, v.40, n.7/8, p.243-247, 1997.
- KOST, J.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Phonophoresis. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I., eds. **Percutaneous absorption: drugs-cosmetics-mechanisms-methodology**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.31, p.615-631. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 97).
- KOVACS, S.O.; HRUZA, L.L. Superficial fungal infections. **Postgrad. Med.**, New York, v.98, n.6, p.61-75, 1995.
- KRIWET, K.; PARENTEAU, N.L. *In vitro* skin models. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.111, p.93-1000, 1996.
- KRIWET, K.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.125, p.231-242, 1995.
- KURIHARA-BERGSTROM, T.; KNUTSON, K.; DENOBLE, L.J.; GOATES, C.Y. Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol water-systems in human skin. **Pharm. Res.**, Norwell, v.7, n.7, p.762-766, 1990.
- DE LANGE, J.; VANECK, P.; ELLIOTT, G.R.; DEKORT, W.L.A.M.; WOLTHUIS, O.L. The isolated blood-perfused pig ear: an inexpensive and animal-saving model for skin penetration studies. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, Amsterdam, v.27, n.2, p.71-77, 1992.
- LAUER, A.C. Percutaneous drug delivery to the hair follicle. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I., eds. **Percutaneous absorption: drugs-cosmetics-mechanisms-methodology**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.25, p.427-447. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 97).

- LEHR, K.; DAMN, P. Quantification of ciclopirox olamine by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.339, p.451-456, 1985.
- LIN, S.Y.; HOU, S.J.; HSU, T.H.S.; YEH, F.L. Comparisons of different animal skins with human skin in drug percutaneous penetration studies. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, Barcelona, v.14, n.8, p.645-654, 1992.
- LODÉN, M. Skin barrier function: effects of moisturizers. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.116, n.6, p.31-36, 2001.
- LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.225, p.15-30, 2001.
- LOFTSSON, T. Cyclodextrins in skin delivery. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.115, n.10, p.59-66, 2000.
- LOPES, P.S. **Influência da papaína e do óleo de pequi na penetração percutânea do diclofenaco de sódio**. São Paulo, 1999. 143p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- LOPEZ, R.F.V.; COLLETT, J.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Influence of cyclodextrin complexation on the *in vitro* permeation and skin metabolism of dexamethasone. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.200, n.1, p.127-132, 2000.
- LÓPEZ, A.; LLINARES, F.; CORTELL, C.; HERRAEZ, M. Comparative enhancer effect of Span[®] 20 with Tween[®] 20 and Azone[®] on the *in vitro* percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.202, n.1/2, p.133-140, 2000.

MAGDASSI, S. Delivery systems in cosmetics. **Colloids Surf., A**, Amsterdam, v.123, p.671-679, 1997.

MAITANI, Y.; COULEGROS, A.; OBATA, Y.; NAGAI, T. Prediction of skin permeabilities of diclofenac and propranolol from theoretical partition coefficients determined from cohesion parameters. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.82, n.4, p.416-420, 1993.

MÁSSON, M.; LOFTSSON, T.; MASSON, G.; STEFANSSON, E. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and *in vitro* testing. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.59, n.1, p.107-118, 1999.

MICHAELS, A.S.; CHANDRASEKARAN, S.K. SHAW, J.E. Drug permeation through human skin: theory and *in vitro* experimental measurement. **AIChE J.**, Hoboken, v.21, n.5, p.985-996, 1975.

MORELL, J.L.P.; CLARAMONTE, M.D.C.; VIALARD, A.P. Validation of a release diffusion cell for topical dosage forms. **Int. J. Pharm.**, Granada, v.137, p.49-55, 1996.

MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.19, n.4, p.489-501, 2001. [Review].

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v.52, n.2, p.103-112, 2001a. [Review].

MOSER, K.; KRIWET, K.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Enhanced skin permeation of a lipophilic drug using supersaturated formulations. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.73, n.2/3, p.245-253, 2001b.

- MOSER, K.; KRIWET, K.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Stabilization of supersaturated solutions of a lipophilic drug for dermal delivery. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.224, n.1/2, p.169-176, 2001c.
- MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v.58, n.2, p.343-356, 2004. [Review].
- NAIK, A.; PECHTOLD, L.A.R.M.; POTTS, R.O.; GUY, R.H. Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement *in vivo* in humans. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.37, n.3, p.299-306, 1995.
- NANGIA, A.; PATIL, S.; BERNER, B.; BOMAN, A.; MAIBACH, H. *In vitro* measurement of transepidermal water loss: a rapid alternative to tritiated water permeation for assessing skin barrier function. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.170, n.1, p.33-40, 1998.
- NARISHETTY, S.T.K.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.95, p.367-379, 2004.
- NESSEEM, D.I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.26, p.387-399, 2001.
- NEUBERT, R.H.H.; SCHMALFUß, U. Microemulsions. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I., eds. **Percutaneous absorption: drugs-cosmetics-mechanisms-methodology**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.51, p.879-886. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 97).

- OH, H.J.; OH, Y.K.; KIM, C.K. Effects of vehicles and enhancers on transdermal delivery of melatonin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.212, n.1, p.63-71, 2001.
- OHARA, N.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Influence of temperature on the percutaneous absorption for lipophilic and hydrophilic drugs across the rat skin pretreated with oleic acid. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.123, n.2, p.281-284, 1995.
- OSTRENGA, J.; STEINMET, C.; POULSEN, B. Significance of vehicle composition. I. Relationship between topical vehicle composition, skin penetrability, and clinical efficacy. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.60, n.8, p.1175-1179, 1971.
- OSTRENGA, J.; STEINMET, C.; POULSEN, B.; YETT, S. Significance of vehicle composition. II. Prediction of optimal vehicle composition. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.60, n.8, p.1180-1183, 1971.
- PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N.S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.201, p.131-150, 2000.
- PELLETT, M.A.; ROBERTS, M.S.; HADGRAFT, J. Supersaturated solutions evaluated with an *in vitro* stratum corneum tape stripping technique. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.151, n.1, p.91-98, 1997.
- PELLETT, M.A.; CASTELLANO, S.; HADGRAFT, J.; DAVIS, A.F. The penetration of supersaturated solutions of piroxicam across silicone membranes and human skin *in vitro*. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.46, n.3, p.205-214, 1997.

- PENDLINGTON, R.U.; WHITTLE, E.; ROBINSON, J.A.; HOWES, R.D. Fate of ethanol topically applied to skin. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.39, n.2, p.169-174, 2001.
- 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, 2000.
- PFISTER, W.R. Transdermal and dermal therapeutic systems: current status. In: TAPASHI, K.; GHOSH, W.R.; PFISTER, W.R.; YUM, S.I., eds. **Transdermal and topical drug delivery systems**. Buffalo Grove: Interpharm Press, 1997. cap.2, p.49-50.
- PIROT, F.; KALIA, Y.N.; STINCHCOMB, A.L.; KEATING, G.; BUNGE, A.; GUY, R.H. Characterization of the permeability barrier of human skin *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.94, n.4, p.1562-1567, 1997.
- PRAUSNITZ, M.R. The effects of electric current applied to skin: a review for transdermal drug delivery. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v.18, p.395-425, 1996.
- PRÍBORSKÝ, J.; MÜHLBACHOVÁ, E. Evaluation of *in vitro* percutaneous absorption across human skin and in animal models. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.42, n.7, p.468-472, 1990.
- PONEC, M.; BOELSMA, E.; WEERHEIM, A.; MULDER, A.; BOUWSTRA, J.; MOMMAAS, M. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.203, n.1/2, p.211-225, 2000.

- POTARD, G.; LAUGEL, C.; BAILLET, A.; SCHAEFER, H.; MARTY, J.P. Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during *in vitro* percutaneous penetration studies. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.189, n.2, p.249-260, 1999.
- POTTS, R.O.; GUY, R.H. Predicting skin permeability. **Pharm. Res.**, Norwell, v.9, n.5, p.663-669, 1992.
- RASTOGI, S.K.; SINGH, J. Lipid extraction and transport of hydrophilic solutes through porcine epidermis. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.225, p.75-82, 2001.
- REGNIER, M.; CARON, D.; REICHERT, U.; SCHAEFER, H. Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.82, n.4, p.404-407, 1993.
- REGNIER, M.; CARON, D.; REICHERT, U.; SCHAEFER, H. Reconstructed human epidermis: a model to study *in vitro* the barrier function of the skin. **Skin Pharmacol.**, Basel, v.5, n.1, p.49-56, 1992.
- REIFENRATH, W.G.; HAWKINS, G.S.; KURTZ, M.S. Percutaneous penetration and skin retention of topically applied compounds: an *in vitro* – *in vivo* study. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.80, n.6, p.526-532, 1991.
- ROLLAND, A.; DEMICHELIS, G.; JAMOULLE, J.C.; SHROOT, B. Influence of formulation, receptor fluid, and occlusion on *in vitro* drug release for topical dosage forms, using an automated flow- through diffusion cell. **Pharm. Res.**, Norwell, v.9, n.1, p.82-86, 1992.
- ROSEN, T.; SCHELL, B.J.; ORENGO, I. Anti-inflammatory activity of antifungal preparations. **Int. J. Dermatol.**, Oxford, v.36, n.10, p.788-792, 1997.

ROUGIER, A.; DUPUIS, D.; LOTTE, C.; ROGUET, R.; SCHAEFER, H. *In vivo* correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.81, n.3, p.275-278, 1983.

ROUGIER, A.; DUPUIS, D.; LOTTE, C.; ROGUET, R. The measurement of the stratum corneum reservoir: a predictive method for *in vivo* percutaneous absorption studies: influence of application time. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.84, n.1, p.66-68, 1985.

SAH, A.; MUKHERJEE, S.; WICKETT, R.R. An *in vitro* study of the effects of formulation variables and product structure on percutaneous absorption of lactic acid. **J. Cosmet. Sci.**, New York, v.49, n.4, p.257-273, 1998.

SAMPAIO, S.A.P.; CASTRO, R.M.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia básica**. 3.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1983. cap.1, p.1-14.

SANTOS, D.; BAHIA, M.F.G. Promotores de absorção e penetração. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.7, n.5, p.42-51, 1995.

SANTOYO, S.; ARELLANO, A.; YGARTUA, P.; MARTIN, C. *In vitro* percutaneous absorption of piroxicam through synthetic membranes and abdominal rat skin. **Pharm. Acta Helv.**, Zürich, v.71, n.2, p.141-146, 1996.

SASAKI, H.; KOJIMA, M.; MORI, Y.; NAKAMURA, J.; SHIBASAKI, J. Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal drug delivery. 1. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.44, n.1/3, p.15-24, 1988.

SASAKI, H.; KOJIMA, M.; MORI, Y.; NAKAMURA, J.; SHIBASAKI, J. Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal drug delivery. II. Effect of application concentration and pre-treatment of enhancer. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.60, n.3, p.177-183, 1990.

- SCALIA, S.; VILLANI, S.; SCATTURIN, A.; VANDELLI, M.A.; FORNI, F.
Complexation of the sunscreen agent, butyl-methoxydibenzoylmethane, with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.175, n.2, p.205-213, 1998.
- SCHEUPLEIN, R.J. Mechanism of percutaneous absorption. 1. Routes of penetration and the influence of solubility. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.45, n.5, p.334-346, 1965.
- SCHEUPLEIN, R.J.; BLANK, I.H. Permeability of the skin. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v.51, n.4, p.702-747, 1971.
- SCHNEIDER, I.M.; DOBNER, B.; NEUBERT, R.; WOHLRAB, W. Evaluation of drug penetration into human skin *ex vivo* using branched fatty acids and propylene glycol. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.145, n.1/2, p.187-196, 1996.
- 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, n.1/2, p.51-56, 2001.
- SCOTT, R.C.; CLOWES, H.M. *In vitro* percutaneous absorption experiments: a guide to the technique for use in toxicology assessments. **Toxicol. Methods**, New York, v.2, n.2, p.113-123, 1992.
- SCOTT, R.C.; BATTEN, P.L.; CLOWES, H.M.; JONES, B.K.; RAMSEY, J.D. Further validation of an *in vitro* method to reduce the need for *in vivo* studies for measuring the absorption of chemicals through rat skin. **Fundam. Appl. Toxicol.**, Akron, v.19, n.4, p.484-492, 1992.

SCOTT, R.C.; WALKER, M.; DUGARD, P.H. A comparison of the *in vitro* permeability properties of human and some laboratory animal skins. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.8, n.4, p.189-194, 1986.

SEGERS, J.D.; ZATZ, J.L. Techniques for measuring *in vitro* release from semisolids. **Dissolution Technol.**, Hockessin, v.5, n.1, p.3-13, 1998.

SEHGAL, V.N. Ciclopirox: a new topical pyrodonium antimycotic agent. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.95, n.83, p.83-88, 1976.

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.

SHAH, J.C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v.47, n.2/3, p.229-250, 2001. [Review].

SHAH, J.C. Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.90, n.2, p.161-169, 1993.

SHAH, J.C.; KAKA, I.; TENJARLA, S.; LAU, S.W.J.; CHOW, D. Analysis of percutaneous permeation data. II. Evaluation of the lag time method. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.109, n.3, p.283-290, 1994.

SHAH, V.P. *In vivo* percutaneous penetration/absorption, Washington, D.C. May 1989. **Pharm. Res.**, Norwell, v.8, p.1071-1075, 1991.

SILVA, G.M.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Influence of a formulation's pH on cutaneous absorption of ascorbic acid. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.116, n.1, p.73-75, 2001.

- SKELLY, J.P. FDA and AAPS report of the workshop on principles and practices of in vitro percutaneous penetration studies: relevance to bioavailability and bioequivalence. **Pharm. Res.**, Norwell, v.4, n.3, p.265-267, 1987.
- SOLICH, P.; OGROCKA, E. SCHAEFER, U. Application of automated flow injection analysis to drug liberations studies with the Franz diffusion cell. **Pharmazie**, Eschborn, v.56, n.10, p.787-789, 2001.
- SPENCE, A.P. **Anatomia humana básica**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1991. cap.4, p77-89.
- SUHONEN, T.M.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.59, n.2, p.149-161, 1999. [Review].
- TANOJO, H.; BOSVANGHEEST, A.; BOUWSTRA, J.A.; JUNGINGER, H.E.; BODDE, H.E. *In vitro* human skin barrier perturbation by oleic acid: termal analysis and freeze fracture electron microscopy studies. **Thermochim. Acta**, Amsterdam, v.293, n.1/2, p.77-85, 1997.
- TAO, L. Skin delivery from lipid vesicles. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.115, n.4, p.43-50, 2000.
- TOUITOU, E.; GODIN, B.; KARL, Y.; BUJANOVER, S.; BECKER, Y. Oleic acid, a skin penetration enhancer, affects Langerhans cells and corneocytes. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.80, n.1/3, p.1-7, 2002.

- TOUITOU, E.; MEIDAN, V.M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v.56, n.1/3, p.7-21, 1998.
- TURNER, N.G.; NONATO, L.B. Visualization of stratum corneum and transdermal permeation pathways. In: POTTS, R.O.; GUY, R.H., eds. **Mechanisms of transdermal drug delivery**. New York: Marcel Dekker. 1997. cap.1, p.1-40. (Drugs and Pharmaceutical Sciences, v.83).
- TWIST, J.N.; ZATZ, J.L. Membrane-solvent-solute interaction in a model permeation system. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.77, n.6, p.536-540, 1988.
- UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry 'nonsterile semisolid dosage forms: scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls'. Rockville: Food and Drug Administration, 1998. (SUPAC-SS, CMS, 7). Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/1447fnl.pdf>. Acesso em: 22/07/03.
- UNITED States Pharmacopeia: USP 27; The National Formulary: NF 22. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p.1398.
- 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.
- VÁVROVÁ, K.; HRABALEK, A.; DOLEZAL, P.; SAMALOVA, L.; PALAT, K.; ZBYTOVSKA, J.; HOLAS, T.; KLIMENTOVA, J. Synthetic ceramide analogues as skin permeation enhancers: structure-activity relationships. **Bioorg. Med. Chem.**, Amsterdam, v.11, n.24, p.5381-5390, 2003a.

- VÁVROVÁ, K.; HRABALEK, A.; DOLEZAL, P.; HOLA, T.; ZBYOVSKA, J. L-serine and glycine based ceramide analogues as transdermal permeation enhancers: polar head size and hydrogen bonding. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Amsterdam, v.13, n.14, p.2351-2353, 2003b.
- VICKERS, C.F.H. Existence of reservoir in the stratum corneum. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.88, p.20-23, 1963.
- VOLLMER, U.; MULLER, B.W.; PEETERS, J.; MESENS, J.; WILFFERT, B.; PETERS, T. A study of the percutaneous absorption-enhancing effects of cyclodextrin derivatives in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.46, n.1, p.19-22, 1994.
- WALKER, M.; HULME, T.A.; RIPPON, M.G.; WALMSLEY, R.S.; GUNNIGLE, S.; LEWIN, M.; WINSEY, S. *In vitro* model (s) for the percutaneous delivery of active tissue repair agents. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.86, n.12, p.1379-1384, 1997.
- WEIGMANN, H.J. 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, 1999.
- WESTER, R.C.; MELENDRES, J.L.; SEDIK, L.; MAIBACH, H. Percutaneous absorption of salicylic acid, theophylline, 2,4-dimethylamine, diethyl hexyl phthalic acid, and p-aminobenzoic acid in the isolated perfused porcine skin flap compared to humans *in vivo*. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I., eds. **Percutaneous absorption: drugs-cosmetics-mechanisms-methodology**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.33, p.571-585. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 97).

- WESTER, R.C.; CHRISTOFFEL, J.; HARTWAY, T.; POBLETE, N.; MAIBACH, H.I.; FORSELL, J. Human cadaver skin viability for *in vitro* percutaneous absorption: storage and detrimental effects of heat-separation and freezing. **Pharm. Res.**, Norwell, v.15, n.1, p.82-84, 1998.
- WESTER, R.C.; MELENDRES, J.; SEDIK, L.; MAIBACH, H.; RIVIERE, J.E. Percutaneous absorption of salicylic acid, theophylline, 2,4-dimethylamine, diethyl hexyl phthalic acid, and p-aminobenzoic acid in the isolated perfused porcine skin flap compared to man *in vivo*. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.151, n.1, p.159-165, 1998.
- WIECHERS, J.W. Avoiding transdermal cosmetic delivery. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.115, n.2, p.38-40, 2000.
- WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v.56, p.603-618, 2004.
- WILLIAMS, A.C. Urea and its derivatives as penetration enhancers. In: SMITH, E.W.; MAIBACH, H.I., eds. **Percutaneous penetration enhancers**. Boca Raton: CRC Press, 1995. cap.10.1, p.289-296.
- WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Urea analogues in propylene glycol as penetration enhancers in human skin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.36, p.43-50, 1989.
- WINKLER, A.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Comparative permeation studies for δ -aminolevulinic acid and its n-butyl ester through stratum corneum and artificial skin constructs. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v.53, p.281-287, 2002.

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.

WURSTER, D.E.; KRAMER, S.F. Investigation of some factors influencing percutaneous absorption. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.50, n.4, p.288-293, 1961.

YAMAGUCHI, Y.; USAMI, T.; NATSUME, H.; AOYAGI, T.; NAGASE, Y.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Evaluation of skin permeability of drugs by newly prepared polymer membranes. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.45, n.3, p.537-541, 1997.

YAMASHITA, F.; BANDO, H.; KOYAMA, Y.; KITAGAWA, S.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. *In vivo* and *in vitro* analysis of skin penetration enhancement based on a two – layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. **Pharm. Res.**, Norwell, v.11, n.2, p.185-191, 1994.

YOSIPOVITCH, G.; THENG, C.T.S. Asian skin: its architecture, function and differences from caucasian skin. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, n.117, n.9, p.57-61, 2002.

ZATZ, J.L. Optimizing skin delivery. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.115, n.1, p.31-35, 2000.

ZATZ, J.L. Aumento da penetração cutânea. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.7, n.5, p.52-58, 1995.

ZATZ, J.L. Assessment of vehicle factors influencing percutaneous absorption. In: BRONAUGH, R.L.; MAIBACH, H.I., eds. ***In vitro percutaneous absorption***: principles, fundamentals and applications. Boca Raton: CRC Press, 1991. cap.6, p.51-66.