

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Avaliação da liberação e permeação em membrana
sintética do cetoconazol em cremes O/A**

Marcelo Guimarães

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Dr^a Vladi Olga Consiglieri

São Paulo
2001

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

Guimarães, Marcelo

G963a Avaliação da liberação e permeação em membrana
sintética do cetoconazol em cremes O/A / Marcelo
Guimarães. -- São Paulo, 2001.
170p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento
de Farmácia.

Orientador: Consiglieri, Vladi Olga

1. Medicação transdérmica : Terapêutica 2. Cetoconazol:
Farmacodinâmica 3. Formulações farmacêuticas I. T. II.
Consiglieri, Vladi Olga, orientador.

615.67 CDD

Marcelo Guimarães

**Avaliação da liberação e permeação em membrana
sintética do cetoconazol em cremes O/A**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Prof^ª Dr^ª Vladi Olga Consiglieri
Orientadora/Presidente

Prof^ª Dr^ª Maria Elena Santos Taqueda
1^º Examinador

Prof^º Dr. Humberto Gomes Ferraz
2^º Examinador

São Paulo, 26 de julho de 2001.

A Deus

“Obrigado Senhor, pelo dom precioso da vida.

Esta vida que generosamente me deste e pela qual me sinto responsável.

Obrigado por meus pais, amigos, colegas, por todos quanto fizeram parte da minha história e me ajudaram a crescer.

Agradeço por esta etapa vencida, por meu passado e por meu futuro.

Receba, Senhor, minha alegria e minha eterna gratidão.

Que tua constante presença ilumine sempre meu futuro...”

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Anisia, por todo apoio e amor.

Ao meu pai Geraldo (*In memoriam*) pelo incentivo e respeito.

Aos meus irmãos Vera, Geraldo e Denise, aos meus sobrinhos Renata e Nuno, meu primo Paulo, minha cunhada Luciana e toda a minha família, pela paciência, incentivo e colaboração.

À Joana, pelo incentivo e pela compreensão por meus períodos de ausência.

À Prof^ª Dr^ª Vladi Olga Consiglieri, pela amizade, orientação, confiança, incentivo e toda a sua dedicação para o sucesso deste trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Telma Mary Kaneko pela inestimável contribuição e amizade.

Aos professores Maria Valéria R. V. de Paola, Mitsuko Taba Ohara, Terezinha de Jesus A. Pinto, Humberto G. Ferraz, Cristina H. S. Serra, Silvia Storpirtis, Valentina Porta e José de Jesus R. G. de Pinho, pela amizade e por sempre estarem dispostos a esclarecer minhas dúvidas.

À professora Maria Elena Santos Taqueda pela amizade e realização do planejamento estatístico.

Aos amigos Janaína, Evelyn, Adriana, Nilson, Daniel, Clarice, Kyung, Eunice, Letícia e Nelson, pela convivência no laboratório e amizade.

Aos amigos Claudinéia, Carla, Dona Regina e José, por toda ajuda e amizade.

Às estagiárias Cláudia e Fabíola, pela grande contribuição, ótimo desempenho e amizade.

Às amigas Patrícia, Elissa, Flávia, Cristina, Márcia e Mônica, pela amizade e incentivo.

Aos colegas e professores do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico, Química Farmacêutica e Farmacognosia.

À Adriana de Almeida Barreiros, pela revisão das referências bibliográficas.

Aos meus amigos Ana Cláudia, Fernanda, Marcelo, Nilzete, Nilva, Renata, Juliana, José Luiz, Sandra, Ana Laura e Cláudia, pela paciência, amizade, apoio e compreensão.

Aos secretários Bete, Benê, Elaine e Jorge, pela atenção e dedicação.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Administração de medicamentos através da pele.....	04
2.1.1. Físio-anatomia da pele.....	06
2.1.1.1. Epiderme.....	07
2.1.1.2. Derme.....	11
2.1.1.3. Hipoderme (tecido subcutâneo).....	12
2.1.1.4. Anexos da pele.....	12
2.1.1.5. Vascularização e inervação da pele.....	14
2.1.2. Transporte através da pele.....	15
2.1.2.1. Princípios básicos da difusão.....	21
2.1.2.2. Fatores que influenciam no transporte através da pele.....	26
2.1.2.2.1. Fatores biológicos.....	27
2.1.2.2.2. Fatores físico-químicos.....	30
2.1.2.2.3. Promotores de absorção (<i>enhancers</i>).....	30
2.2. Metodologias <i>in vitro</i> para avaliação da liberação e permeação cutânea.....	38
2.2.1. Aparelhos utilizados nos testes <i>in vitro</i>	39
2.2.2. Fluidos receptores utilizados nos testes <i>in vitro</i>	44
2.2.3. Agitação do fluido receptor.....	46
2.2.4. Manutenção da temperatura fisiológica.....	46
2.2.5. Principais membranas utilizadas nos testes <i>in vitro</i>	47

2.3. Infecções fúngicas.....	58
2.4. Cetoconazol.....	60
2.4.1. Propriedades físico-químicas.....	60
2.4.2. Farmacologia.....	62
2.4.3. Toxicologia.....	63
2.4.4. Farmacologia Clínica.....	64
2.4.5. Farmacocinética.....	65
2.4.6. Metabolismo.....	66
2.4.7. Uso terapêutico.....	66
2.4.8. Reações adversas.....	69
2.4.9. Grupos de alto risco.....	71
2.4.10. Interações do fármaco.....	72
2.4.11. Principais métodos analíticos usados na quantificação do cetoconazol.....	73
2.4.11.1. Métodos Microbiológicos.....	73
2.4.11.2. Métodos Físico-químicos.....	74
2.4.11.3. Princípios básicos da Fluorimetria.....	78
2.4.11.3.1. Instrumentos utilizados para medir a fluorescência.....	79
3. OBJETIVOS	80
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	81
4.1. Material.....	81
4.1.1. Matérias-primas, solventes e reagentes.....	81
4.1.2. Equipamentos e acessórios	82

4.2. Métodos.....	83
4.2.1. Preparação das formulações estudadas.....	83
4.2.1.1. Creme base.....	84
4.2.1.2. Técnica de preparação.....	84
4.2.1.3. Descrição geral do preparo das formulações de A a J.....	85
4.2.2. Validação da metodologia analítica.....	86
4.2.2.1. Preparação das soluções.....	86
4.2.2.2. Construção da reta de calibração.....	90
4.2.2.2.1. Condições da análise espectrofluorimétrica.....	90
4.2.2.3. Pesquisa de Interferentes (especificidade/seletividade).....	91
4.2.2.3.1. Cálculos das concentrações de cetoconazol nas amostras analisadas.....	91
4.2.2.4. Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	92
4.2.2.5. Determinação da Precisão e Exatidão.....	93
4.2.3. Testes de liberação.....	94
4.2.3.1. Planejamento estatístico.....	94
4.2.3.2. Preparo da membrana de celulose.....	95
4.2.3.3. Ensaio.....	95
4.2.3.4. Quantificação do cetoconazol nos testes de liberação.....	96
4.2.3.5. Cálculos dos parâmetros de difusão.....	97
4.2.4. Determinações físico-químicas das formulações estudadas.....	98
4.2.4.1. Amostras.....	98
4.2.4.2. Determinação do pH.....	98

4.2.4.3. Determinação da viscosidade (η).....	98
4.2.4.4. Determinação do teor.....	99
5. RESULTADOS.....	100
5.1 Validação da metodologia analítica.....	100
5.1.1. Construção da reta de calibração.....	100
5.1.2. Pesquisa de interferentes (especificidade/seletividade).....	101
5.1.3. Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	102
5.1.4. Determinação da precisão e exatidão.....	103
5.2 Testes de liberação.....	105
5.2.1. Quantificação do cetoconazol nos testes de liberação.....	105
5.2.2. Cálculo dos parâmetros de difusão.....	120
5.2.3. Análise Estatística.....	135
5.3 Determinações físico-químicas das formulações estudadas.....	140
5.3.1. Determinação do pH.....	140
5.3.2. Determinação da viscosidade.....	141
5.3.3. Determinação do teor.....	143
6. DISCUSSÃO.....	144
7. CONCLUSÕES.....	153
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
9. RESUMO	169
10. ABSTRACT	170

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela.1. Composição das emulsões estudadas.....	85
Tabela.2. Diluições para obtenção das soluções padrões de cetoconazol de concentração entre 0,1 e 20,0 µg/ml, a partir de solução padrão contendo 1,0 mg/ml.....	88
Tabela.3. Diluições para obtenção das soluções placebo.....	89
Tabela.4. Diluições para obtenção das soluções mistura de placebo e cetoconazol de concentração entre 0,1 e 20,0 µg/ml.....	90
Tabela.5. Planejamento estatístico para os testes de liberação do cetoconazol.....	95
Tabela.6. Resultados experimentais utilizados na construção da reta de calibração do cetoconazol para o método espectrofluorimétrico.....	100
Tabela.7. Pesquisa de interferentes do método espectrofluorimétrico.....	102
Tabela.8. Concentrações de cetoconazol calculados a partir das soluções PlacP1 a PlacP9, empregando método espectrofluorimétrico.....	103
Tabela.9. Precisão intra-dia do método espectrofluorimétrico.....	104
Tabela.10. Precisão inter-dias do método espectrofluorimétrico.....	104
Tabela.11. Exatidão do método analítico para quantificação do cetoconazol.....	105
Tabela.12. Quantidades de cetoconazol liberadas (µg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 1, empregando a formulação J.....	106
Tabela.13. Quantidades de cetoconazol liberadas (µg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 2, empregando a formulação B.....	107

Tabela.14. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberaç3o 3, empregando a formulaç3o B.....	108
Tabela.15. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberaç3o 4, empregando a formulaç3o H.....	109
Tabela.16. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberaç3o 5, empregando a formulaç3o D.....	110
Tabela.17. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberaç3o 6, empregando a formulaç3o I.....	111
Tabela.18. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberaç3o 7, empregando a formulaç3o E.....	112
Tabela.19. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberaç3o 8, empregando a formulaç3o F.....	113
Tabela.20. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberaç3o 9, empregando a formulaç3o G.....	114
Tabela.21. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberaç3o 10, empregando a formulaç3o G.....	115
Tabela.22. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberaç3o 11, empregando a formulaç3o A.....	116
Tabela.23. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberaç3o 12, empregando a formulaç3o A.....	117
Tabela.24. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberaç3o 13, empregando a formulaç3o C.....	118

Tabela.25. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 14, empregando a formulação D.....	119
Tabela.26. Valores dos parâmetros de difusão do teste 1, empregando a formulação J.....	121
Tabela.27. Valores dos parâmetros de difusão do teste 2, empregando a formulação B.....	122
Tabela.28. Valores dos parâmetros de difusão do teste 3, empregando a formulação B.....	123
Tabela.29. Valores dos parâmetros de difusão do teste 4, empregando a formulação H.....	124
Tabela.30. Valores dos parâmetros de difusão do teste 5, empregando a formulação D.....	125
Tabela.31. Valores dos parâmetros de difusão do teste 6, empregando a formulação I.....	126
Tabela.32. Valores dos parâmetros de difusão do teste 7, empregando a formulação E.....	127
Tabela.33. Valores dos parâmetros de difusão do teste 8, empregando a formulação F.....	128
Tabela.34. Valores dos parâmetros de difusão do teste 9, empregando a formulação G.....	129
Tabela.35. Valores dos parâmetros de difusão do teste 10, empregando a formulação G.....	130
Tabela.36. Valores dos parâmetros de difusão do teste 11, empregando a formulação A.....	131
Tabela.37. Valores dos parâmetros de difusão do teste 12, empregando a formulação A.....	132
Tabela.38. Valores dos parâmetros de difusão do teste 13, empregando a formulação C.....	133
Tabela.39. Valores dos parâmetros de difusão do teste 14, empregando a formulação D.....	134
Tabela.40. Respostas obtidas para o planejamento estatístico.....	135
Tabela.41. Parâmetros da regressão para o modelo do fluxo (J).....	136
Tabela.42. Análise de variância do modelo cúbico incompleto para o fluxo (J).....	136
Tabela.43. Parâmetros da regressão para o modelo da viscosidade.....	138
Tabela.44. Análise de variância do modelo quadrático para viscosidade.....	138
Tabela.45. Valores de pH das bases das formulações.....	140

Tabela.46. Valores de pH das formulações contendo cetoconazol.....	141
Tabela.47. Valores de viscosidade das bases das formulações.....	142
Tabela.48. Valores de viscosidade das formulações contendo cetoconazol.....	142
Tabela.49. Valores de teor de cetoconazol das formulações estudadas.....	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.1. Estrutura da pele.....	08
Figura.2. Representação da membrana do estrato córneo.....	17
Figura.3. Possíveis vias de penetração de substâncias.....	17
Figura.4. Transporte através do estrato córneo, vias transcelular e intercelular.....	18
Figura.5. Rotas de penetração de substâncias medicamentosas na pele e exemplos de medicamentos apropriados para as patologias das várias camadas cutâneas.....	19
Figura.6. Tipos de transportes através da pele.....	20
Figura.7. Transporte por difusão passiva – Lei de Fick.....	22
Figura.8. Representação gráfica do <i>Lag Time</i>	25
Figura.9. Mecanismo de ação de promotores de absorção na pele.....	34
Figura.10. Proposta do modo de interação de alguns promotores com o estrato córneo.....	35
Figura.11. Sistemas de funcionamento de células de difusão <i>in vitro</i>	41
Figura.12. Modelos de células de difusão para estudos de liberação e/ou permeação de fármacos contidos em produtos dermatológicos.....	42 e 43
Figura.13. Fórmula estrutural do cetoconazol.....	61
Figura.14. Reta de calibração obtida a partir da medida de intensidade de fluorescência de fluorescência de soluções padrão de cetoconazol com concentrações variando de 0,1 a 20,0µg/ml, em solução tampão fosfato pH 7,0, considerando $\lambda_{Ex}=275nm$ e $\lambda_{Ex}=377nm$	101
Figura.15. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu g/cm^2$) por tempo para o teste 1 empregando a formulação J.....	121

Figura.16. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 2 empregando a formulação B.....	122
Figura.17. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 3 empregando a formulação B.....	123
Figura.18. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 4 empregando a formulação H.....	124
Figura.19. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 5 empregando a formulação D.....	125
Figura.20. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 6 empregando a formulação I.....	126
Figura.21. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 7 empregando a formulação E.....	127
Figura.22. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 8 empregando a formulação F.....	128
Figura 23. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 9 empregando a formulação G.....	129
Figura.24. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 10 empregando a formulação G.....	130
Figura.25. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 11 empregando a formulação A.....	131
Figura.26. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 12 empregando a formulação A.....	132

Figura.27. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 13 empregando a formulação C.....	133
Figura.28. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetoconazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o teste 14 empregando a formulação D.....	134
Figura.29. Superfície de resposta para o modelo do fluxo após a primeira hora do experimento.....	137
Figura.30. Linhas de contorno para o modelo do fluxo após a primeira hora de experimento.....	137
Figura.31. Superfície de resposta para o modelo da viscosidade.....	139
Figura.32. Linhas de contorno para o modelo da viscosidade.....	139

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro.1. Resumo das principais funções da pele.....	07
Quadro.2. Coeficientes de permeabilidade da água <i>in vitro</i> para peles de humano e animais.....	51
Quadro.3. Medidas de espessura de pele humana e de alguns animais.....	51
Quadro.4. Terapias antifúngicas recomendadas em função do tipo de micose tópica.....	59
Quadro.5. Indicações para usos oral e tópico do cetoconazol.....	67
Quadro.6. Especialidades farmacêuticas de uso tópico contendo cetoconazol.....	68

1. INTRODUÇÃO

A pele humana exerce diversas funções essenciais, incluindo, proteção, termoregulação, síntese bioquímica, detecção sensorial e comunicação, entre outras. A via tópica é uma forma muito conveniente de tratamento, sendo sua eficácia dependente do adequado entendimento da função barreira exercida pela pele, mais precisamente, pelo estrato córneo (Guzzo et al, 1996). As vantagens decorrentes da administração de medicamentos por essa via, com a finalidade de obtenção de efeito sistêmico, são amplamente apontadas na literatura, entre as quais, impedir a decomposição gástrica ou enzimática do fármaco, permitir a administração de compostos com efeito irritante à mucosa gastrintestinal e minimizar os efeitos colaterais, em decorrência da diminuição da dose administrada de fármaco, uma vez que a eliminação pré-sistêmica pode ser atenuada nos sistemas transdérmicos (Ansel et al., 1995; Wenkers, Lipold, 1999).

Para o tratamento de afecções superficiais da pele, em geral, é necessário que o fármaco atravesse sua superfície e penetre nas camadas abaixo do estrato córneo, exercendo efeito local, não se pretendendo que o mesmo atinja a corrente sanguínea. Entretanto, passada a epiderme, a proximidade entre fármaco e capilares do tecido subcutâneo pode permitir sua absorção e este entrar na circulação geral. Esse efeito pode ser constatado pela presença de fármaco na análise de líquidos biológicos como sangue e urina. Por outro lado, a maioria dos compostos empregados para tratamento local são absorvidos em quantidades insuficientes para gerar efeitos tóxicos detectáveis (Ansel et.al., 1995; Guzzo et.al., 1996).

Os estudos de permeação e/ou liberação subdividem-se em estudos *in-vivo* e *in-vitro*. Ambos utilizam diversas técnicas e podem empregar vários tipos de membrana, naturais (pele humana e peles de diversos animais) ou sintéticas (membranas de celulose, silicone, entre outras) (Barry, 1983; Haig, Smith, 1994; Lopes, Kaneko, 2000; Müller, Kreuter, 1999; Wester, Maibach, 1993; Zatz, 1995).

O planejamento de sistemas de liberação de fármacos por via transdérmica está fundamentado em duas estratégias principais: alterar as propriedades físico-químicas dos fármacos, solubilidade e coeficiente de partição, como nos pró-fármacos ou, então, empregar substâncias promotoras de permeação (*enhancers*) que modificam a difusão dos fármacos através da pele. A maioria das substâncias hidrofílicas, geralmente empregadas na forma de sal, não são permeáveis à pele sem o uso de promotores, pois tem baixo coeficiente de permeabilidade. Propilenoglicol, mentol e etanol, substâncias empregadas neste trabalho, são exemplos de promotores de permeação cutânea (Maitani et.al., 1993).

Inúmeros são os veículos e adjuvantes empregados em dermatologia, porém, a tendência atual é desenvolver bases dermatológicas que funcionem como sistemas adequados de liberação de fármacos, associados a adjuvantes (principalmente alteradores de permeabilidade cutânea) que sejam biocompatíveis com as membranas celulares (Bentley, 1994).

Dentre as afecções tópicas, as infecções fúngicas apresentam particular interesse, uma vez que constituem uma das causas mais comuns de doenças da pele. Embora, na maioria das vezes, não comprometam o estado geral do paciente, as micoses superficiais da pele, pêlos e unhas são, geralmente, crônicas e resistentes ao tratamento. Esse fato se explica, não só em decorrência da própria natureza dessas afecções, mas também à baixa penetração dos fármacos com ação

antimicótica. A alternativa ao uso tópico tem sido a administração de altas doses de fármacos, por via oral e tempo prolongado, o que muitas vezes acarreta em efeitos colaterais sistêmicos indesejados (Jawetz et.al., 1980; Martindale, 1993; Remington's, 1995).

Os antifúngicos representam um grande grupo do conjunto de fármacos destinados ao uso dermatológico. Como um dos principais exemplos, é possível citar o cetoconazol, antimicótico de amplo espectro, comprovadamente eficaz contra diversos fungos e leveduras e muito empregado em dermatologia. Todavia, a literatura carece de estudos relacionados à sua liberação a partir de preparações tópicas e penetração no tecido alvo para combate das micoses superficiais.

Assim, esse trabalho teve como finalidade estudar a liberação do cetoconazol, partindo de formulações semi-sólidas (cremes O/A), em sistema *in vitro* empregando membrana sintética.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Administração de medicamentos através da pele

Há uma grande variedade de formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos que podem ser aplicados sobre a pele. Alguns exemplos são: cremes, loções, unguentos, sistemas transdérmicos, pastas, pós e aerossóis.

As preparações farmacêuticas são aplicadas à pele tanto por suas propriedades (lubrificantes, protetores, emolientes, etc.) quanto pelo efeito específico do(s) fármaco(s) presente(s). No tratamento de doenças da pele, em geral, é desejável que, após a aplicação tópica, o fármaco atravesse o estrato córneo e difunda-se através da pele. No entanto, na maioria dos casos, não se pretende atingir a circulação geral. Normalmente a absorção percutânea de um fármaco presente em uma preparação dermatológica ou em um sistema terapêutico transdérmico não depende apenas das propriedades físico-químicas da substância, mas também de seu “comportamento” quando em um veículo farmacêutico e da condição da pele (Ansel et al., 1995).

Segundo FLYNN (1990), podem-se considerar três situações ou razões para fazer uso da pele como via de administração de medicamentos. A primeira envolve condições em que a função barreira natural foi de alguma forma alterada. É o caso do emprego de antibióticos quando a pele mostra um corte ou uma lesão, ou mesmo quando as condições atmosféricas ou o emprego de detergentes alteram a emulsão epicutânea sobre a superfície da pele com conseqüente secura e aspereza da mesma. Um segundo motivo para a utilização da pele como via de administração de

medicamentos envolve a necessidade de atuação do(s) fármaco(s) na epiderme viável e tecidos dérmicos. Como terceira razão, um fármaco pode ser aplicado sobre a pele com o objetivo de conseguir efeito sistêmico. Isso é possível com fármacos potentes que apresentam características físico-químicas para permear a pele com facilidade. Com esses requisitos, pode ser obtida a liberação transdérmica com adequada ação do fármaco.

As preparações para uso tópico e as preparações transdérmicas estão sendo cada vez mais empregadas para tratamento de diversas patologias. As preparações tópicas são utilizadas há séculos, entretanto, as preparações transdérmicas, onde a pele é utilizada como via alternativa para a terapia sistêmica, são consideradas relativamente novas (Corrêa, 1997; Flynn, 1993).

Segundo PRISTA et.al. (1981), medicamento tópico é aquele que, quando aplicado externamente sobre uma região delimitada do corpo, não proporciona absorção sistêmica dos seus constituintes. Um produto tópico ideal é aquele capaz de liberar o fármaco no local e promover uma concentração terapêutica por um tempo tão longo quanto o necessário para a cura ou melhora dos sintomas da doença. Sendo assim, pode-se afirmar que o sucesso terapêutico está relacionado com a habilidade em obter concentrações terapêuticas de fármaco(s) no tecido local.

Dessa forma, conclui-se que o objetivo da terapia tópica é produzir um adequado nível de fármaco(s) acompanhado por baixas concentrações sanguíneas, evitando, dessa forma, os efeitos farmacológicos e toxicológicos em outras regiões do organismo. Ao aplicar um fármaco topicamente é indesejável atingir a corrente sanguínea, não só porque não se pretende obter o efeito sistêmico, mas também porque uma rápida remoção do fármaco do local de ação pelo sistema sanguíneo pode limitar ou reduzir a concentração necessária ao efeito (Ansel, 1995; Corrêa, 1997; Flynn, 1990; Flynn, 1993; Prista et.al., 1981).

2.1.1. Físio-anatomia da pele

A pele, de origem embriológica mista, é o órgão mais pesado do organismo e combina-se com a mucosa dos tratos respiratório, digestivo e urogenital para formar a cápsula que separa as estruturas internas do ambiente externo. Recobre toda a superfície, atingindo 16% do peso corporal, cerca de 17kg e sua superfície chega a 1,8-2,0m². Protege o organismo contra o atrito e impede a perda d'água por evaporação (dessecação) e de outras substâncias. Sendo assim, também impede que substâncias químicas e microrganismos entrem no organismo. A pele é um órgão que age como uma barreira e, através de suas terminações nervosas, recebe estímulos do ambiente. Adicionalmente, por meio de seus vasos, glândulas e tecido adiposo, colabora na termoregulação do corpo. Suas glândulas sudoríparas participam na excreção de várias substâncias. Um pigmento que é produzido e acumulado na epiderme, a melanina, tem função protetora contra os raios ultravioleta. As funções da pele estão resumidas na **Quadro 1** (Barry, 1983; Beny, 2000; Ham, 1967; Junqueira, Carneiro, 1999, Prista *et.al.*, 1981, Prista *et.al.*, 1992).

Sua estrutura histológica compreende camadas de origem e constituição diferentes: a superior, epitelial, chamada *epiderme*, derivada da ectoderme, e a inferior, conjuntiva, denominada *derme*, originária da mesoderme. Uma terceira camada, mais profunda porém, estreitamente vinculada anatomicamente e funcionalmente às demais é a *hipoderme*. A epiderme separa-se da derme pela lâmina basal dermo-epidérmica que, na realidade é intrinsecamente epidérmica. Numerosos, anexos, como os pêlos, unhas, glândulas, vasos sanguíneos e tecido adiposo, situados profundamente desempenham funções no metabolismo, termoregulação e comunicação (Barry, 1983; Beny, 2000; Ham, 1965; Junqueira, Carneiro, 1999, Prista *et.al.*, 1981, Prista *et.al.*, 1992).

A estrutura da pele pode ser observada na **Figura 1**.

Quadro 1: Resumo das principais funções da pele (Barry, 1983; Ham, 1967; Junqueira, Carneiro, 1999).

FUNÇÃO	DESCRIÇÃO
Mecânica	Delimita o organismo, funcionando como um compartimento para fluídos corporais e tecido.
Protetora ou de barreira	Protege contra estímulos externos potencialmente prejudiciais: microrganismos, agentes químicos, radiação, calor, barreira elétrica e choque mecânico.
Sensitiva e tátil	Recebe estímulo externo para mediar sensações tácteis (pressão), de dor ou de calor.
Metabólica	Sintetiza ou metaboliza componentes; destrói resíduos químicos (secreções glandulares).
Reguladora	Colabora na regulação da pressão sanguínea.

2.1.1.1. Epiderme

A epiderme pode variar em espessura, dependendo do tamanho e do número de camadas de células, que varia de 0,8mm nas palmas das mãos e nas solas dos pés a 0,06mm nas pálpebras (Barry, 1983).

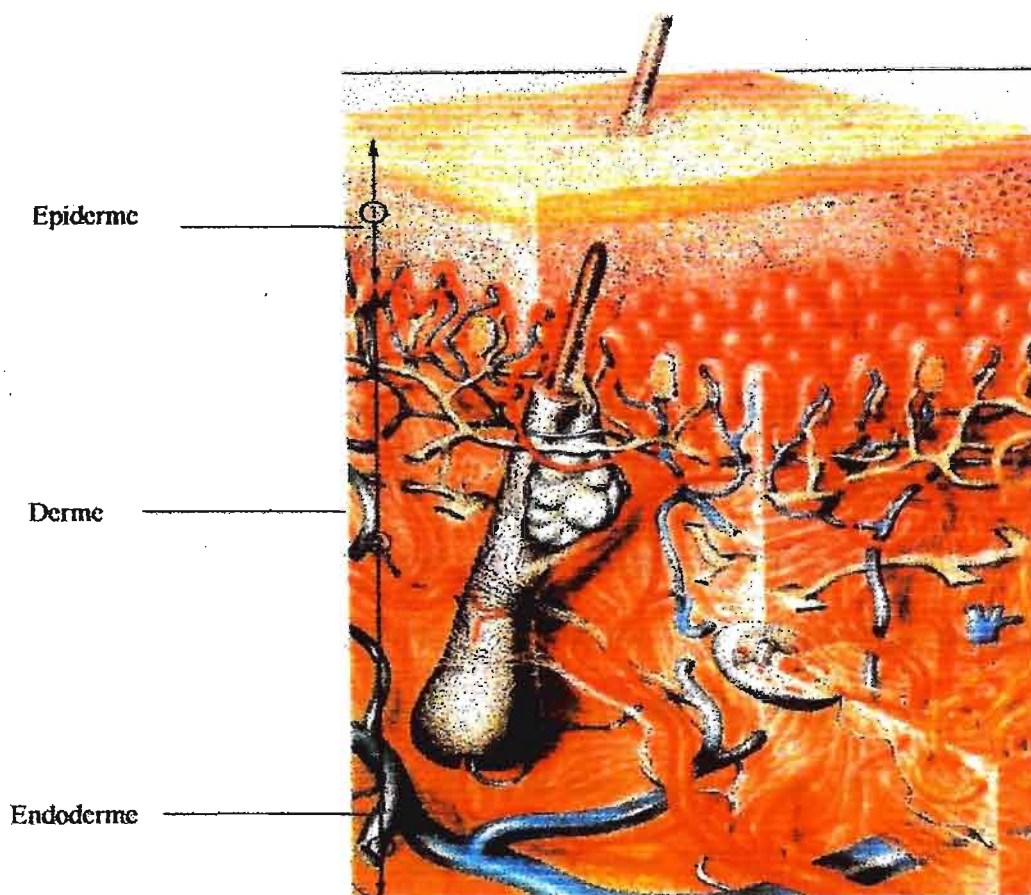


Figura 1. Estrutura da pele (Côrrea, 1997).

Constitui-se de um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, de origem ectodérmica. A partir da derme para a superfície, a epiderme apresenta as seguintes camadas:

a.) Camada basal, constituída por células prismáticas ou cubóides nucleadas repousando sobre nítida lâmina basal que separa a epiderme da derme. É também chamada de camada germinativa e apresenta intensa atividade mitótica, sendo responsável pela constante renovação da epiderme. Dessa maneira, a epiderme mantém-se constante em espessura. Embora seja difícil calcular o número de trocas de células da epiderme (*turnover*), empregando técnicas para marcar

seletivamente o DNA nuclear, estima-se que uma célula vinda da camada basal leva pelo menos 14 dias para chegar ao *stratum corneum*. Numa epiderme que se prolifera rapidamente como na psoríase, o tempo é de apenas dois dias (Barry, 1983; Junqueira, Carneiro, 1999, Prista *et.al.*, 1981, Prista *et.al.*, 1992).

b.) Camada espinhosa, constituída por células poligonais cubóides ou ligeiramente achatadas, de núcleo central com pequenas expansões citoplasmáticas que contêm tonofibrilas (*prickles*) partindo de cada uma das células adjacentes. Essas expansões citoplasmáticas se aproximam e se mantêm unidas através dos desmossomos (ligações intercelulares), o que dá às células um aspecto espinhoso. As tonofibrilas e os desmossomos têm importante função na manutenção da coesão das células da epiderme e, conseqüentemente, na sua resistência ao atrito (Barry, 1983; Ham, 1967; Junqueira, Carneiro, 1999).

c.) Camada granulosa, caracterizada pela presença de células poligonais com núcleo central, nitidamente achatadas, em cujo citoplasma são observados grânulos grosseiros e basófilos. São os grânulos de querato-hialina, que não são envolvidos por membranas e vão contribuir para a constituição do material interfibrilar da camada córnea (Barry, 1983; Beny, 2000; Junqueira, Carneiro, 1999).

d.) Camada lúcida, constituída por uma delgada camada de células achatadas, eosinófilas, hialinas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas foram digeridos por enzimas dos lipossomos e desapareceram. Essa camada pode ser encontrada acima da camada granulosa na epiderme da palma da mão e na sola do pé (Barry, 1983; Junqueira, Carneiro, 1999).

e.) Camada córnea (*stratum corneum*), tem a espessura muito variável e é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo. O citoplasma dessas células apresenta-se cheio de

substância córnea, uma escleroproteína filamentosa chamada queratina. Pode medir apenas 10µm de espessura, quando seca. Além de conter queratina, as células são o último depósito dos produtos finais do metabolismo da epiderme, pois contêm secreções de glândulas sebáceas e sudoríparas. O *stratum corneum* tem papel fundamental no controle da absorção percutânea de fármacos (Barry, 1983; Beny, 2000; Ham, 1967; Junqueira, Carneiro, 1999; Prista *et.al.*, 1981, Prista *et.al.*, 1992).

Outras células da epiderme:

A epiderme também apresenta outros três tipos de células: os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel. Os melanócitos são células especiais que produzem a melanina. Essas células encontram-se geralmente nas camadas basal e espinhosa da epiderme (Barry, 1983; Beny, 2000; Junqueira, Carneiro, 1999; Prista *et.al.*, 1981, Prista *et.al.*, 1992).

As células de Langerhans encontram-se localizadas em toda a epiderme entre as células epiteliais, porém são mais freqüentes na camada espinhosa. Possuem, na sua superfície, antígenos comuns aos monócitos e à maioria dos linfócitos T e B. Como os macrófagos, possuem receptores para o segmento Fc das imunoglobulinas e para o fator C3 do complemento. Estas observações sugerem que as células de Langerhans fazem parte do sistema imunológico, podendo acumular na sua superfície os antígenos cutâneos e, provavelmente, participar da neutralização de seus efeitos prejudiciais (Barry, 1983; Beny, 2000; Junqueira, Carneiro, 1999; Prista *et.al.*, 1981, Prista *et.al.*, 1992).

As células de Merkel podem ser encontradas em maior número na pele espessa da palma das mãos e planta dos pés. É possível observar terminações nervosas na base dessas células. Essas

terminações não têm vesículas sinápticas, o que sugere que sejam de natureza sensorial, recebendo impulsos das células de Merkel, tidas como mecano-receptoras. Alguns pesquisadores não concordam com essa teoria, mas acreditam que essas células secretam hormônios (Junqueira, Carneiro, 1999).

2.1.1.2. Derme

É o tecido conjuntivo sobre o qual se apóia a epiderme, comunicando-a com a hipoderme. Apresenta espessura variável de acordo com a região observada. A superfície externa é extremamente irregular, observando-se saliências que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme. Essas saliências são denominadas papilas dérmicas e são mais frequentes nas zonas sujeitas às pressões ou atritos. Acredita-se que a função das papilas seja aumentar a zona de contato derme-epiderme, trazendo maior resistência à pele.

A derme divide-se em duas camadas de limites pouco distintos que são a papilar, superficial e a reticular, mais interna. Nela encontram-se fibrilas especiais de colágeno, que se inserem na lâmina basal e penetram profundamente na derme, cuja função é fixar a derme à epiderme. A camada reticular é mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso, apresentando menos células e fibras colágenas mais abundantes e espessas do que a camada papilar. As duas camadas são constituídas por muitas fibras elásticas, responsáveis, em parte, pela elasticidade da pele (Barry, 1983; Beny, 2000; Ham, 1967; Junqueira, Carneiro, 1999; Prista *et.al.*, 1981, Prista *et.al.*, 1992).

2.1.1.3. Hipoderme (tecido subcutâneo)

É a camada mais profunda da pele, onde os feixes conjuntivos, entremeados com fibras elásticas, assumem disposições especiais formando alvéolos, que contém adipócitos. Os adipócitos, contém, em seu citoplasma, uma grande quantidade de lipídeos, principalmente triglicérides; contém, também, um pigmento, o lipocrômio, além de colesterol, vitaminas e água. Parte dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas podem localizar-se na hipoderme. Com essa estrutura, o tecido celular subcutâneo protege, contra traumatismos, os vasos e nervos que devem alcançar as partes superiores da pele. Essa camada é um isolante térmico, pois protege o organismo de traumas e calor, além de ser um depósito de calor. Esteticamente, a hipoderme dá turgidez à pele, e na ausência ou deficiência, formam-se rugas e pregas (Barry, 1983; Beny, 2000; Ham, 1967; Junqueira, Carneiro, 1999).

2.1.1.4. Anexos da pele

- Pêlos:

Apresentam-se como delgadas estruturas queratinizadas, que se desenvolvem a partir de uma invaginação da epiderme, denominada folículo piloso. Estão presentes praticamente em toda a superfície do corpo, com exceção de algumas regiões bem delimitadas. Os pêlos são estruturas que crescem descontinuamente, intercalando fases de repouso com fases de crescimento (Barry, 1983; Junqueira, Carneiro, 1999).

- Unhas:

As unhas são lâminas translúcidas compostas de queratina dura que protegem as superfícies superior e terminal de cada um dos dedos das mãos e dos pés (Ham, 1967; Junqueira, Carneiro, 1999).

- Glândulas sebáceas:

As glândulas sebáceas são encontradas em quase todas as regiões do corpo, principalmente testa, rosto, orelha, superfícies anogenitais e costas. Situam-se na derme e os seus ductos geralmente desembocam na porção terminal dos folículos pilosos. A secreção sebácea é uma mistura complexa de lipídeos que contém triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e seus ésteres (Barry, 1983; Ham, 1967; Junqueira, Carneiro, 1999).

- Glândulas sudoríparas:

Essas glândulas são encontradas em toda a pele, com exceção de certas regiões, como a glândula e os lábios. São glândulas tubulosas simples, enoveladas. Apresentam-se envoltas por células alongadas e ramificadas, as células mioepiteliais, cuja função é expulsar o produto de secreção das glândulas (Barry, 1983; Ham, 1967; Junqueira, Carneiro, 1999).

Há dois tipos de glândulas sudoríparas, a saber:

a.) Glândulas écrinas:

Essas glândulas desenvolvem-se por toda a superfície da pele, mas não sobre as mucosas. Cada glândula apresenta-se como um “novelo” secretor na parte mais interna da derme e tecido subcutâneo, dá origem a um ducto que atravessa a derme e toda a epiderme, resultando em um poro invisível ao olho nú, na superfície da pele.

O suor é uma solução hipotônica, contendo 99% ou mais de água, cujos principais componentes são sódio, cloro, potássio, uréia e lactato, com pH de 4,0 a 6,8.

A principal função dessas glândulas encontra-se no controle de temperatura. No entanto, uma vez que essas glândulas são inervadas pelo sistema nervoso autônomo, o *stress* emocional também pode provocar a sudorese (Barry, 1983; Ham, 1967; Junqueira, Carneiro, 1999).

b.) Glândulas apócrinas:

São apêndices epidérmicos que se desenvolvem na pele do embrião como parte do folículo pilosebáceo. A maioria dessas glândulas desaparece, de maneira que são mais encontradas, nos indivíduos adultos, nas axilas, na região perianal e na aréola mamária.

A glândula apócrina secreta uma pequena quantidade de um fluido leitoso ou oleoso, o qual pode ser colorido. Essa secreção contém lipídios, proteínas, lipoproteínas e sacarídeos. As bactérias de superfície metabolizam rapidamente esse líquido inodoro, produzindo o odor característico do corpo. Essas glândulas não fazem parte da termoregulação. (Barry, 1983; Ham, 1967; Junqueira, Carneiro, 1999).

2.1.1.5. Vascularização e inervação da pele

A derme necessita de um suprimento sanguíneo que regule temperatura e pressão e leve nutriente à pele, além de outras atividades. Esse suprimento sanguíneo chega até 0,2mm da superfície da pele, sendo capaz de absorver e diluir sistematicamente a maior parte das substâncias químicas que penetram o *stratum corneum* e a epiderme viável (Barry, 1983; Junqueira, Carneiro, 1999, Prista *et.al.*, 1981, Prista *et.al.*, 1992).

O sistema linfático forma uma rede vascular com a função de remover as proteínas plasmáticas de espaços extravasculares, juntamente com particulados e outras substâncias (Barry, 1983; Junqueira, Carneiro, 1999, Prista *et.al.*, 1981, Prista *et.al.*, 1992).

Há uma grande variação de região para região. A face e as extremidades são ricamente inervadas. Os nervos cutâneos, as terminações nervosas e os capilares modulam as sensações de dor, prurido, tato e temperatura (Barry, 1983; Junqueira, Carneiro, 1999, Prista *et.al.*, 1981, Prista *et.al.*, 1992).

2.1.2. Transporte através da pele

A pele funciona como uma barreira bilateral, evitando tanto a absorção quanto a perda de água e eletrólitos. Essa função é exercida fundamentalmente pela epiderme, mais especificamente pelo estrato córneo, a mais externa das camadas da pele. Os corneócitos, células da camada córnea, são não viáveis, são anucleados e destituídos de organelas. Apresentam-se achatados e seu citoplasma é preenchido por uma escleroproteína filamentosa, chamada de queratina, constituída por cadeias protéicas ricas em ligações dissulfeto. Os corneócitos funcionam como depósito dos produtos finais do metabolismo da epiderme, contendo, também, secreções de glândulas sebáceas e sudoríparas. Cada célula desenvolve um invólucro cornificado, resultante de ligações cruzadas entre involucrina e querato-hialina. Os espaços intercelulares são preenchidos por lipídeos lamelares fortemente hidrofóbicos. Assim, essa combinação de células queratinizadas hidrofílicas em material intercelular hidrofóbico, constitui-se em uma barreira a substâncias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas (Barry, 1983; Guzzo et al., 1996; Orjales, 1998; Rieger, 1993).

No desenvolvimento de produtos dermatológicos, a função da pele que merece maior atenção é a função barreira uma vez que, na maioria das vezes, várias substâncias medicamentosas são veiculadas topicamente. A pele e seus apêndices regulam a entrada de substâncias externas no organismo. Quando uma molécula em contato se move através da pele intacta, primeiramente ocorre o contato com o sebo, restos celulares, bactérias e outros materiais exógenos que cobrem a pele (Barry, 1983; Guzzo et al., 1996; Orjales, 1998; Rieger, 1993).

A penetração de fármacos na pele pode ocorrer por duas vias (Barry, 1983; Guzzo et al., 1996; Orjales, 1998; Rieger, 1993):

- **Via transepidérmica:** representada pela via intra e intercelular;
- **Via apêndice:** representada pela passagem pelo folículo pilossebáceo e poros.

Na via transepidérmica, ou seja, através do estrato córneo propriamente dito, a substância pode penetrar de duas maneiras distintas que podem ser entre as células e através das células, recebendo o nome de penetração intercelular e penetração transcelular, respectivamente (Barry, 1983; Guzzo et al., 1996; Orjales, 1998; Rieger, 1993). Nas **Figuras de 2 a 6** podem ser vistas as vias de penetração e locais de atuação de várias classes de substâncias utilizadas em dermatologia.

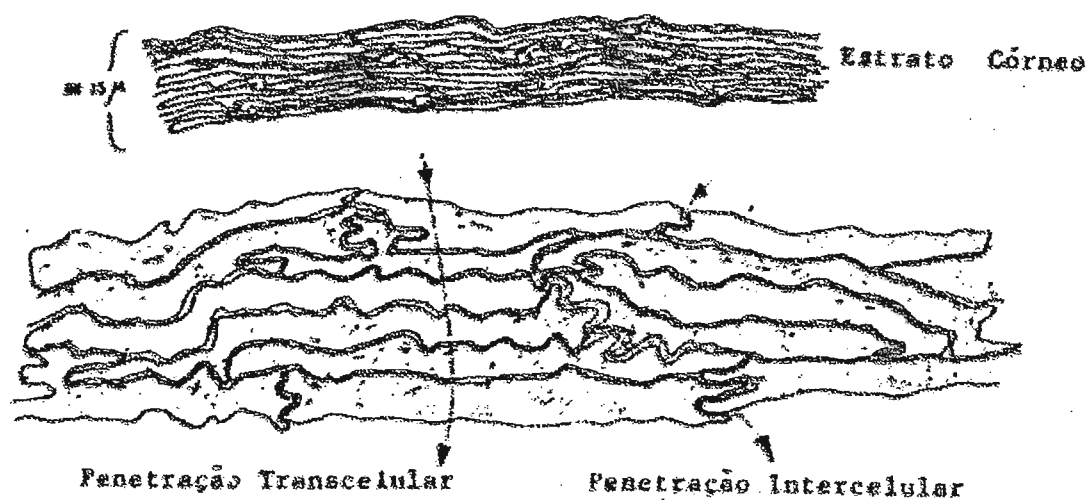


Figura 2. Representação da membrana do estrato córneo (Bentley, 1994).

Espessura do estrato córneo = 15μ .

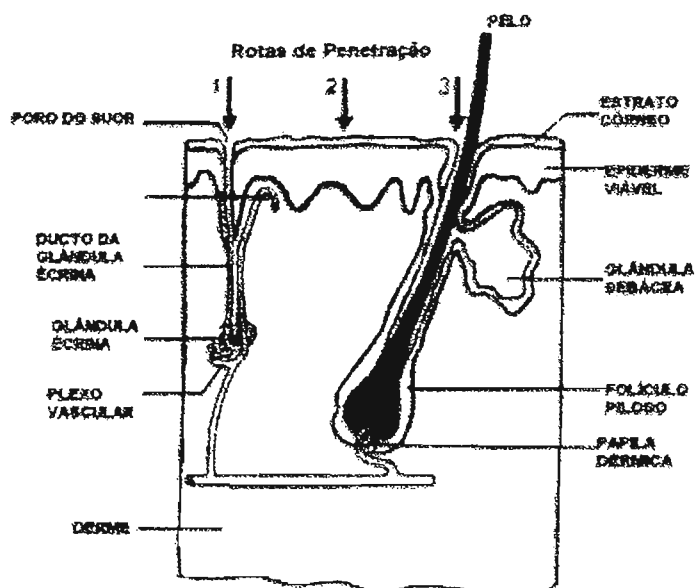


Figura 3. Possíveis vias de penetração de substâncias (Barry, 1983).

1 = ductos sudoríparos, 2 = estrato córneo e 3 = canais pilossebáceos.

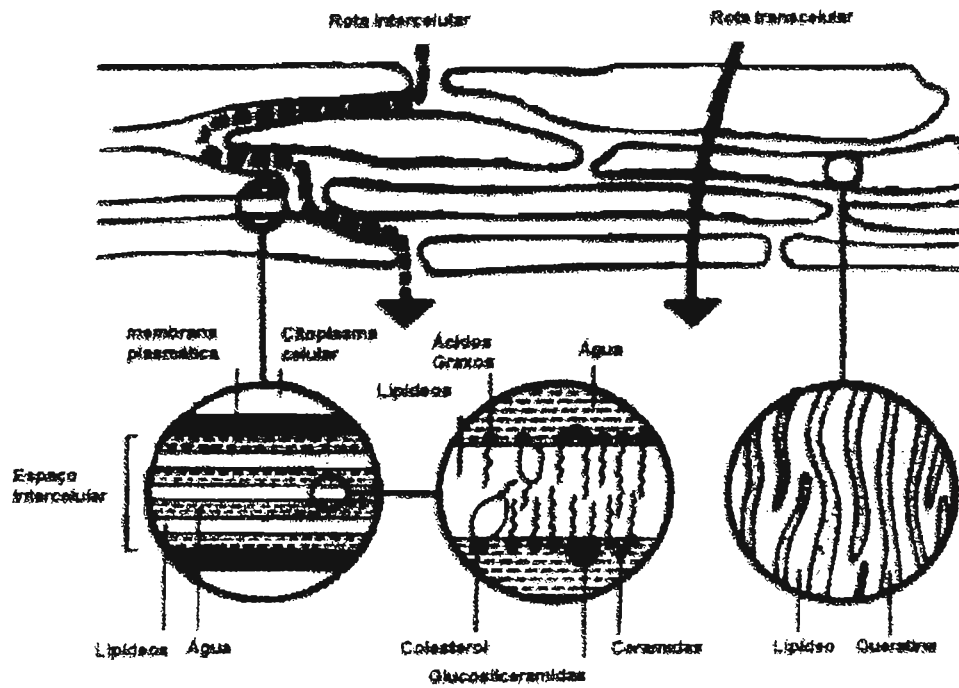


Figura 4. Transporte através do estrato córneo, vias transcelular e intercelular (Barry, 1983).

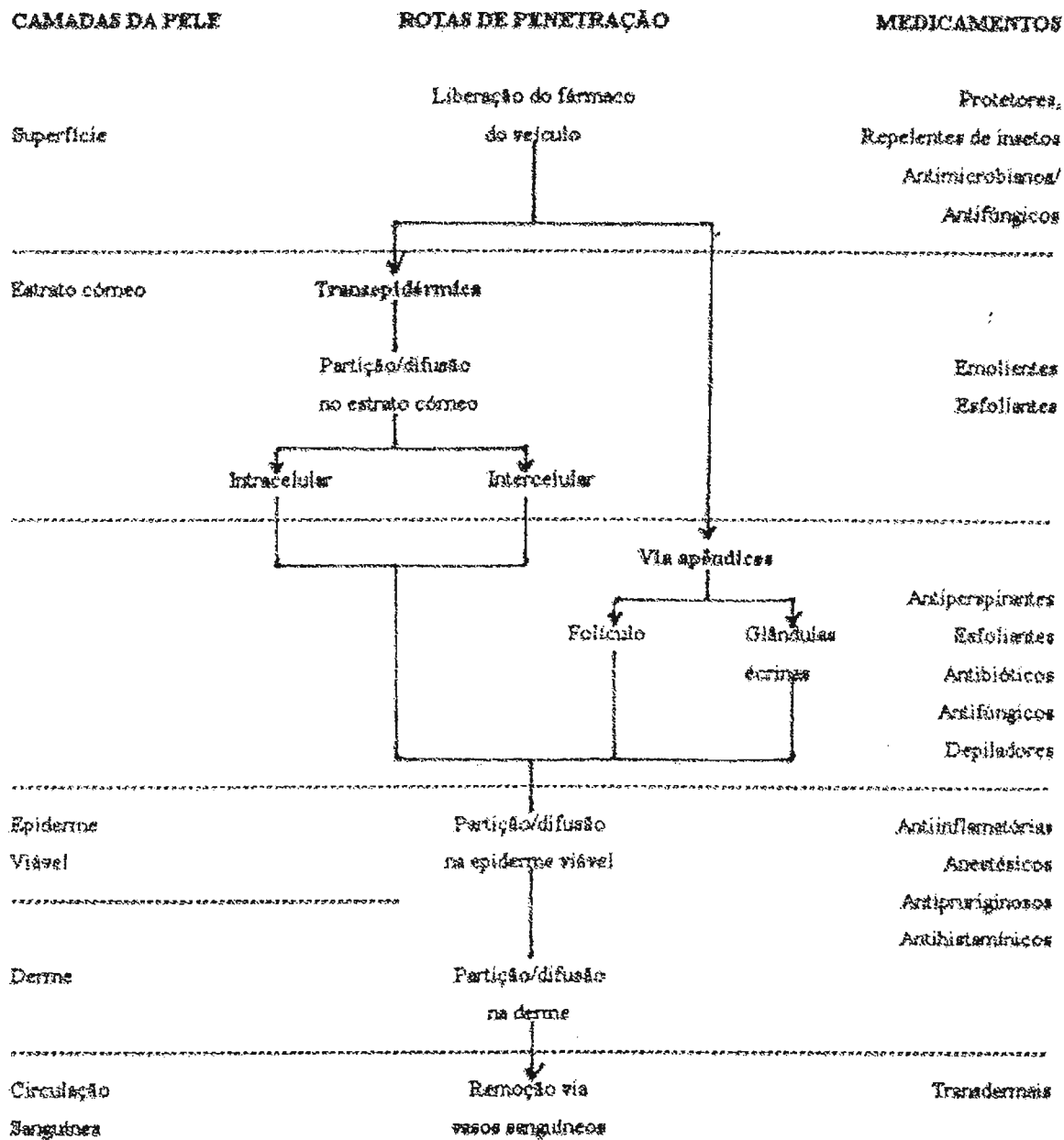


Figura 5. Rotas de penetração de substâncias medicamentosas na pele e exemplos de medicamentos apropriados para as patologias das várias camadas cutâneas (Barry, 1983; Bentley, 1994).

Os termos penetração, permeação e absorção devem ser empregados de maneira distinta, a saber (Rangarajan, Zatz, 1999; Rieger, 1993):

- **Penetração:** passagem da substância e/ou fármaco através do estrato córneo, ou seja, esse termo está relacionado com a entrada da substância e/ou fármaco;
- **Permeação:** passagem da substância e/ou fármaco através da epiderme, podendo atingir a derme, ou seja, é a passagem da substância e/ou fármaco de um compartimento da pele para outro;
- **Absorção:** passagem da substância e/ou fármaco para a corrente sanguínea.

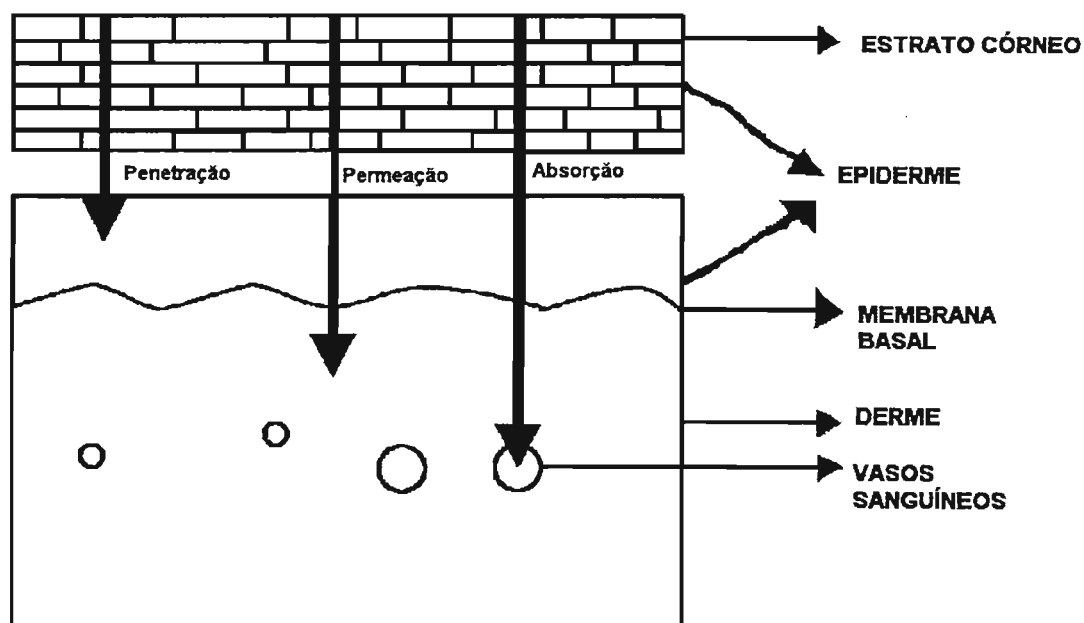


Figura 6. Tipos de transportes através da pele (Rangarajan, Zatz, 1999).

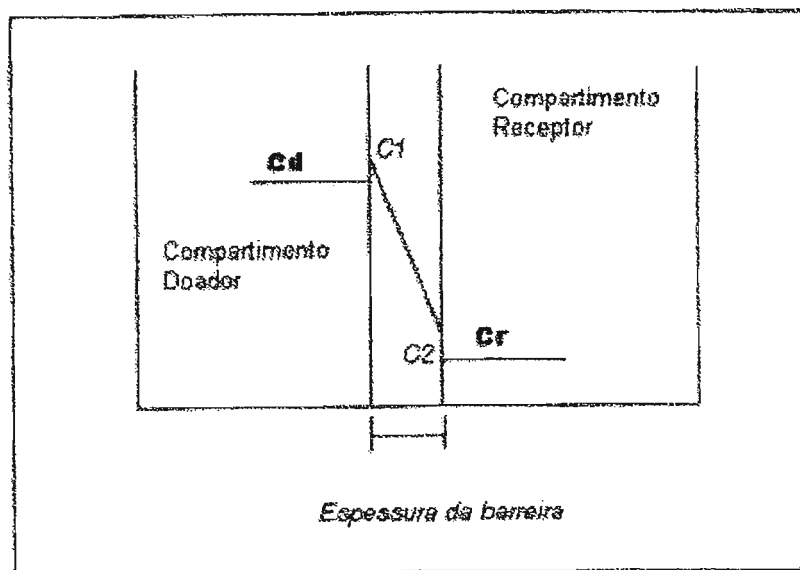
2.1.2.1. Princípios básicos de difusão

A absorção percutânea envolve a transferência do fármaco da superfície da pele para o interior do estrato córneo às custas de um gradiente de concentração e sua subsequente difusão através do estrato córneo, epiderme, derme e microcirculação. A pele comporta-se como uma barreira passiva às moléculas que se difundem. Há evidências de que essa impermeabilidade persiste mesmo após um longo período subsequente à excisão da pele (Block, 1990).

A passagem, de uma ou mais substâncias, conhecida como difusão passiva, representa um tipo de transporte em membranas parcialmente permeáveis e seletivas. A matéria move-se de uma região do sistema onde a concentração é maior para outra, com concentração menor (formando um gradiente de concentração), seguindo um movimento molecular, representado na **Figura 7** (Block, 1990; Lopes, 1999; Martin, Bustamante, 1993).

Segundo RIEGER (1993), a difusão através do estrato córneo pode ser explicada através de três etapas:

- 1.) O permeante (molécula ou íon) passa do veículo (presente no compartimento doador) para a superfície do estrato córneo;
- 2.) Há a passagem do permeante para o interior do estrato córneo, controlada pelo coeficiente de distribuição (K) ou partição;
- 3.) O permeante difunde-se através do estrato córneo. Esta talvez seja a etapa de maior importância nos estudos de permeação cutânea.



C_d = concentração do fármaco no compartimento doador; C_1 = concentração inicial do fármaco na membrana; C_2 = concentração final do fármaco na membrana; C_r = concentração do fármaco no compartimento receptor.

Figura 7. Transporte por difusão passiva – Lei de Fick (Martin, Bustamante, 1993).

Os processos de difusão através de membranas podem ser, geralmente, explicados matematicamente através das leis de Fick, que podem ser aplicadas sempre que a natureza química ou física de uma membrana controlar a taxa de difusão (Block, 1990; Lopes, 1999; Martin, Bustamante, 1993; Rieger, 1993). Para que a molécula difusante (soluto) passe do veículo (solvente) para a pele, é preciso que o soluto tenha certa afinidade pelo estrato córneo. Uma vez no interior da membrana, o difusante difundir-se-á (Block, 1990; Lopes, 1999; Martin, Bustamante, 1993; Rieger, 1993). Sendo assim, baseando-se nos conceitos de fluxo de calor desenvolvidos há 200 anos por Count Bertholett, Fick definiu a difusão como sendo o fluxo (J)

através da membrana (Block, 1990; Lopes, 1999; Martin, Bustamante, 1993; Rieger, 1993). Entende-se por fluxo (**J**), a diferença de concentrações (ΔC) entre os dois lados da membrana, sendo a quantidade de massa (**m**) que atravessa uma área (**S**) na unidade de tempo (**t**).

$$J = \frac{d m}{S dt} \quad (\text{Equação 1})$$

onde: J = fluxo; dm = diferença de massa entre os lados da membrana; S = área e dt = tempo.

A constante de proporcionalidade é definida como o coeficiente de permeabilidade (**P**). Esse coeficiente inclui o coeficiente de difusão diferencial (**D**) e o coeficiente de partição (**K**), sendo **e**, a espessura da membrana.

$$J = P \Delta C = \frac{K D \Delta C}{e} \quad (\text{Equação 2})$$

onde: J = fluxo; P = coeficiente de permeabilidade; K = coeficiente de partição; D = coeficiente de difusão; ΔC = diferença de concentração entre os lados da membrana e e = espessura da membrana.

Por definição, **D** é a facilidade de passagem da substância através das estruturas ou moléculas da membrana e **K**, a relação das solubilidades da substância na membrana e no solvente.

As unidades de fluxo (**J**) são moles/cm² s e µg/cm²h. Portanto, **J** é a quantidade de soluto que passa através de uma unidade de área da membrana em determinada unidade de tempo. Para que qualquer fluxo mensurável ocorra, as moléculas do soluto devem, em primeiro lugar, entrar no estrato córneo, ação essa controlada pelo coeficiente de partição (**K**). Em seguida, o soluto que entra no estrato córneo deve concentrar-se ao longo dessa região e começar o seu processo de difusão tempo-dependente, difusão essa, controlada pelo coeficiente de difusão (**D**). Esse segundo

processo ocorre até que as moléculas do soluto alcancem o limite do estrato córneo e da epiderme viável. Acredita-se que a taxa de difusão de moléculas em direção e através da epiderme viável seja maior do que a taxa de difusão através do estrato córneo (Gupta et.al., 1993; Lopes, 1999; Rieger, 1993; Shah, 1993; Shah, Maibach, 1993).

A primeira lei de Fick é aplicável somente à membranas que são homogêneas de um lado a outro, o que significa dizer que P (ou KD) não varia através da espessura total da membrana (Gupta et.al., 1993; Lopes, 1999; Rieger, 1993; Shah, 1993; Shah, Maibach, 1993).

A permeabilidade do estrato córneo pode ser estudada *in vitro* utilizando uma “célula de difusão”, isto é, uma célula de material inerte dividida em duas partes, denominadas compartimentos doador e receptor, separadas por um diafragma de estrato córneo. Sobre a face externa de estrato córneo (localizada no compartimento doador) coloca-se o produto, o qual se encontra em concentração constante. A face profunda do estrato córneo é banhada por um líquido (fluido receptor) que retira imediatamente o material que atravessou e permite a sua dosagem. Assim, realiza-se um modelo de absorção transcutânea de uma substância estranha ao organismo (Gupta et.al., 1993; Lopes, 1999; Rieger, 1993; Shah, 1993; Shah, Maibach, 1993).

As quantidades de substância colhidas em função do tempo em uma célula deste tipo, mostram um curto período de largada com fluxo variável e, em seguida, um período indefinido de fluxo constante (*steady state*). Ao primeiro intervalo damos o nome de período de latência (*Lag Time*), que pode ser definido como o período requerido para um penetrante estabelecer um gradiente de concentração uniforme com a membrana que separa o compartimento doador e o compartimento receptor (Agache, 1994; Lopes, 1999). Na **Figura 8**, pode-se observar esse processo esquematizado pelo gráfico de quantidade permeada por área versus tempo.

O estado estacionário ou regime permanente (*steady state*) é sempre proporcional à concentração da substância na face externa do estrato córneo. A inclinação da reta caracteriza a permeabilidade de uma determinada substância independente de sua concentração na superfície da pele (Agache, 1994; Shah, 1993; Shah, Maibach, 1993; Shah et.al., 1994).

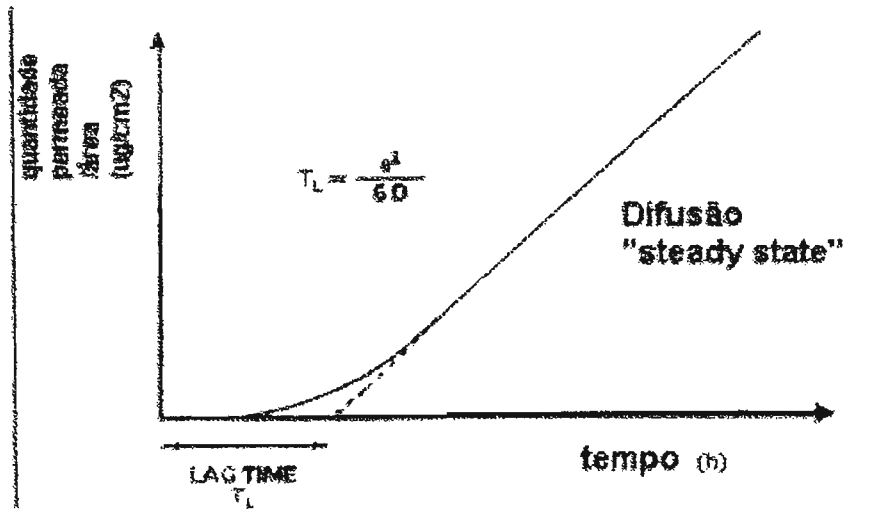


Figura 8. Representação gráfica do *Lag Time* (T_L) (Agache, 1994; Lopes, 1999).

e = espessura da membrana; D = coeficiente de difusão.

BARRY e EL EINI (1976) investigaram a permeação de alguns esteróides através de membrana de acetato de celulose, utilizando o método do *Lag Time* e observaram que esse processo depende, principalmente, do coeficiente de partição membrana/água. Verificou-se que a substância menos polar permeou mais rapidamente.

2.1.2.2. Fatores que influenciam no transporte através da pele

O estrato córneo, sendo um tecido queratinizado, comporta-se como uma membrana artificial, semi-permeável, e as moléculas do fármaco penetram por difusão passiva. Desta forma, a velocidade de fármaco movimentado através desta camada de pele é dependente da concentração de fármaco no veículo, sua solubilidade aquosa e seu coeficiente de partição entre o estrato córneo e o veículo. Substâncias que possuem tanto solubilidade aquosa quanto oleosa são os melhores candidatos à difusão através do estrato córneo e epiderme viável (Ansel et.al., 1995).

Uma preparação para uso tópico é aplicada sobre uma determinada área da pele sob a forma de um filme de 10 a 30 μ m de espessura representados normalmente por 1 a 3 μ L de solução/cm² ou 1 a 3mg de creme ou pomada por cm². Imediatamente após a aplicação, as condições físico-químicas e termodinâmicas que dirigem a liberação mudam radicalmente e a concentração de fármaco raramente permanece constante (Corrêa, 1997).

Geralmente, a absorção percutânea de um fármaco presente em sistema terapêutico tópico ou transdérmico, não depende somente das propriedades físico-químicas do fármaco, mas também das condições da pele e do veículo farmacêutico (Ansel et.al., 1995).

Ao considerarmos as condições da pele, podemos afirmar que vários fatores afetam a permeabilidade do estrato córneo. Dessa maneira, a permeabilidade difere segundo a idade, a região de localização da pele, o estado circulatório local, a temperatura e sua integridade (Rieger, 1993; Riviere, 1993).

Deve-se considerar que algumas substâncias presentes nos veículos podem favorecer a penetração cutânea. Qualquer perturbação na composição lipídica do estrato córneo pode alterar as propriedades físicas das lamelas intercelulares e, dessa forma, modificar a função barreira. Qualquer tensoativo ou outro agente capaz de distribuir-se entre as estruturas lamelares da pele tem o potencial de alterar seu grau de organização e interferir com sua função (Ansel et.al., 1995; Barry, 1983; Bentley, 1994; Corrêa, 1997; Lopes, 1999; Rieger, 1993; Riviere, 1993).

As formulações tópicas, geralmente, contém vários excipientes e estes também partilham na superfície da pele de acordo com suas propriedades físico-químicas. Certos excipientes mudam a integridade do estrato córneo e afetam o processo de difusão do fármaco no tecido (Ansel et.al., 1995; Barry, 1983; Bentley, 1994; Corrêa, 1997; Lopes, 1999; Rieger, 1993; Riviere, 1993).

2.1.2.2.1. Fatores biológicos

Os principais fatores biológicos que influenciam no transporte de substâncias através da pele são: idade, condições da pele, região, metabolismo cutâneo, efeitos circulatórios e diferenças entre espécies, entre outros.

- *Idade:*

Segundo BARRY (1983), devemos considerar a idade do paciente, uma vez que há diferenças significativas na permeabilidade entre pacientes de idades diferentes. Geralmente assume-se que peles de fetos, jovens e idosos são mais permeáveis do que a de adultos.

- Condições da pele:

Sabe-se que a pele funciona como uma grande barreira, mas isso só acontece se a mesma estiver intacta. Substâncias como ácidos e álcalis, entre outras substâncias, danificam as células da barreira e promovem a penetração. Outros fatores como cortes, rachaduras e dermatites também contribuem para a penetração de substâncias através do estrato córneo (Ansel et.al., 1995; Barry, 1983; Bentley, 1994; Corrêa, 1997; Lopes, 1999; Rieger, 1993; Riviere, 1993).

Após dano ou remoção, o estrato córneo leva aproximadamente três dias para que as suas células construam uma barreira temporária que persistirá até que a epiderme se regenere e forme células normais queratinizadas. Mas, sabe-se que a completa regeneração do estrato córneo leva cerca de duas semanas (Barry, 1983).

- Região da pele:

Na realização de experimentos de permeação cutânea deve-se considerar que as variações na permeabilidade cutânea dependem de fatores, como a espessura do estrato córneo, sua natureza e a densidade de seus apêndices cutâneos. De uma maneira geral, podem-se classificar algumas regiões do corpo, em ordem decrescente de difusibilidade para pequenas moléculas: região plantar, região palmar, dorso da mão, região escrotal e pós-auricular, axilas e couro cabeludo, braços, pernas e tronco (Ansel et.al., 1995; Barry, 1983; Bentley, 1994; Corrêa, 1997; Lopes, 1999; Rieger, 1993; Riviere, 1993).

- Metabolismo cutâneo:

Quando uma nova molécula ativa de ação sistêmica é desenvolvida, são realizadas, exaustivamente, investigações biofarmacêuticas, com o objetivo de pesquisar detalhadamente a farmacocinética dessa substância, incluindo sua absorção, distribuição, biotransformação e

excreção. O mesmo deveria ser feito para moléculas de uso tópico, porém, esse aspecto apenas recebeu importância recentemente. A biotransformação de compostos absorvidos pela pele geralmente produz metabólitos inativos, mas, às vezes, pode haver a formação de compostos metabolicamente ativos (Ansel et.al., 1995; Barry, 1983; Bentley, 1994; Corrêa, 1997; Lopes, 1999; Nicolau, Yacobi, 1993; Rieger, 1993; Riviere, 1993).

- Efeitos circulatórios:

Alterações na circulação periférica ou no fluxo sanguíneo através da derme podem afetar a absorção percutânea. Dessa maneira, um aumento no fluxo sanguíneo não apenas pode reduzir o tempo de permanência de um penetrante na derme, mas também pode aumentar o seu gradiente de concentração ao longo da pele (Ansel et.al., 1995; Barry, 1983; Bentley, 1994; Corrêa, 1997; Lopes, 1999; Rieger, 1993; Riviere, 1993).

- Diferença entre espécies:

Há diferenças marcantes entre as várias peles de mamíferos empregadas em estudos de permeação. Como algumas dessas diferenças, podem ser citadas: espessura do estrato córneo, número de glândulas sudoríparas e folículos pilosos por unidade de área, comportamento e distribuição do suprimento sanguíneo das papilas. Esses fatores afetam tanto as rotas de penetração como a resistência à penetração (Ansel et.al., 1995; Barry, 1983; Bentley, 1994; Corrêa, 1997; Lopes, 1999; Rieger, 1993; Riviere, 1993).

2.1.2.2.2. Fatores físico-químicos

Os principais fatores físico-químicos que controlam a difusão passiva de um difusante ou soluto (fármaco) estão relacionados com as propriedades do próprio difusante, do veículo e da pele. As propriedades desses três componentes e como eles se interagem determinam a taxa de penetração de um fármaco na pele. Como principais fatores podemos citar: hidratação da pele, temperatura, composição do veículo, interação fármaco-veículo, interação fármaco-pele, interação veículo-pele, interação fármaco-veículo-pele, entre outros (Barry, 1983).

BARRY e EL EINI (1976) verificaram que a permeação de uma substância aumenta com o aumento da temperatura, ou seja, o processo de permeação de uma substância através de uma membrana é influenciado pela temperatura.

OBATA et.al. (1993 A) concluíram que o pH tem grande influência sobre o fluxo e o coeficiente de permeabilidade das substâncias. Em um de seus estudos, verificaram que o aumento do pH no compartimento doador de células de difusão, aumentou significativamente o fluxo do diclofenaco através de pele de ratos sem pêlos e, ao mesmo tempo, o seu coeficiente de permeabilidade diminuiu.

2.1.2.2.3. Promotores de absorção (enhancers)

Os métodos para promoção do aumento do transporte de fármacos através de barreiras biológicas podem ser divididos em duas categorias principais: meios químicos e meios físicos.

Esses métodos tornam-se necessários pois as características físico-químicas de muitos fármacos podem não permitir que os mesmos permeiem adequadamente através da pele.

Os principais fatores que podem, muitas vezes, dificultar a escolha da terapia tópica são:

- Muitos fármacos permeiam precariamente através do estrato córneo;
- Mesmo se os fármacos permeiam através do estrato córneo, podem ser facilmente retidos na pele;
- Muitos fármacos são extremamente irritantes para serem aplicados topicamente.

No entanto, uma estratégia para desenvolver métodos que promovam aumento da permeação de fármacos no tratamento tópico deve se basear no uso do estrato córneo e/ou epiderme como um reservatório de liberação lenta de fármacos para regiões com determinadas patologias. Sendo assim, esses métodos são usados não só para facilitar a permeação de fármacos através do estrato córneo, mas também aumentar o tempo de retenção de fármacos no estrato córneo e/ou epiderme (Barry, 1983; Hsieh, 1994; Shah, 1994).

Segundo BARRY (1993), substâncias químicas chamadas de promotores de penetração/permeação, também conhecidas como aceleradores ou promotores de absorção, devem apresentar as seguintes propriedades:

- Ser farmacologicamente inertes;
- Ser atóxicos, não irritantes e não alergênicos;
- Apresentar ação rápida, de duração previsível e ser compatíveis com o fármaco empregado;
- Após a sua remoção, o estrato córneo deve voltar imediatamente ao normal, recuperando a sua função barreira;

- Diminuir a função barreira da pele em, somente, uma direção. Substâncias endógenas não devem ser perdidas para o ambiente;
- Devem ser compatíveis química e fisicamente com as substâncias ativas da formulação;
- Ser um solvente adequado às substâncias ativas, se líquidas e presentes em altas frações de volume;
- Espalhar-se bem na pele;
- Ser inodoros, incolores, de aspecto agradável e baixo custo.

Como exemplos de promotores podemos citar: solventes (água, álcoois, dimetilsufóxido, dimetilformamida e dimetilacetamida, pirrolidonas e propilenoglicol), laurocapram (Azone[®]) e seus derivados, tensoativos (aniônicos, catiônicos e não-iônicos), ácidos e álcoois graxos, terpenos (limoneno e mentol) e seus derivados, alquil-sulfóxidos, ésteres de açúcar e outras substâncias, como a uréia e seus análogos de cadeia longa, N,N-dietil-*m*-toluamida, tioglicolato de cálcio e substâncias anticolinérgicas (Ansel et. al., 1995; Barry, 1993).

Observando a literatura, verifica-se que a atual definição de um promotor é a de um composto químico, uma combinação de substâncias ou um efeito físico que tem como finalidade reduzir, reversivelmente, a resistência do estrato córneo de uma maneira ampla e irrestrita, sem danos às células viáveis (Lopes, 1999).

Utilizando Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry*), GOODMAN e BARRY (1989) postularam uma teoria que explica como os promotores de penetração agem, conhecida como Teoria LPP (interação com Lipídeos, alterações das Proteínas e aumento do coeficiente de Partição). Segundo essa teoria, basicamente os promotores interagem, de três maneiras distintas na barreira do estrato córneo, a saber:

- a.) Rompimento da estrutura da bicamada lipídica, havendo um aumento da fluidificação dessa região. Exemplos: laurocapram (Azone[®]), etanol e terpenos (mentol, limoneno, etc.);
- b.) Interação com proteínas intracelulares, ou seja, os promotores podem solvatar as células córneas, quebrar ligações aquosas, expandir as estruturas e competir com os fármacos pelos sítios de ligação com o hidrogênio. Exemplos: propilenoglicol, DMSO e tensoativos;
- c.) Alteração do coeficiente de partição do fármaco, caso haja a entrada no estrato córneo de uma quantidade desta substância para tal. Exemplos: etanol, propilenoglicol, pirrolidona e DMSO (Goodman, Barry, 1989).

As diferenças de hidrofília e lipofília das várias substâncias aceleradoras fazem com que atuem por mecanismos diferentes (Barry, 1993; Orjales, 1998). Observando a **Figura 9** é possível visualizar as vias polar e apolar pelas quais esses adjuvantes podem exercer seus efeitos na pele.

Baseado nos conceitos expostos, o mecanismo de ação dos promotores, segundo à teoria LPP, pode ser resumido da seguinte forma (Barry, 1993):

- a.) A maioria dos promotores diminuem a organização dos lipídeos intercelulares;
- b.) Muitos promotores interagem com as proteínas intracelulares;
- c.) Quando o promotor age segundo ambos os mecanismos anteriores, sua atividade será acentuada;
- d.) Promotores polares de tamanho pequeno, como o dimetil-sulfóxido e seus análogos, pirrolidonas, etanol e propilenoglicol podem acumular-se no estrato córneo e promover a partição do fármaco;

e.) A resistência do estrato córneo à difusão de fármacos diminui com o aumento do conteúdo de água e, conseqüentemente, todo tratamento que aumenta a hidratação, geralmente, promove a penetração, permeação e/ou absorção de fármacos.

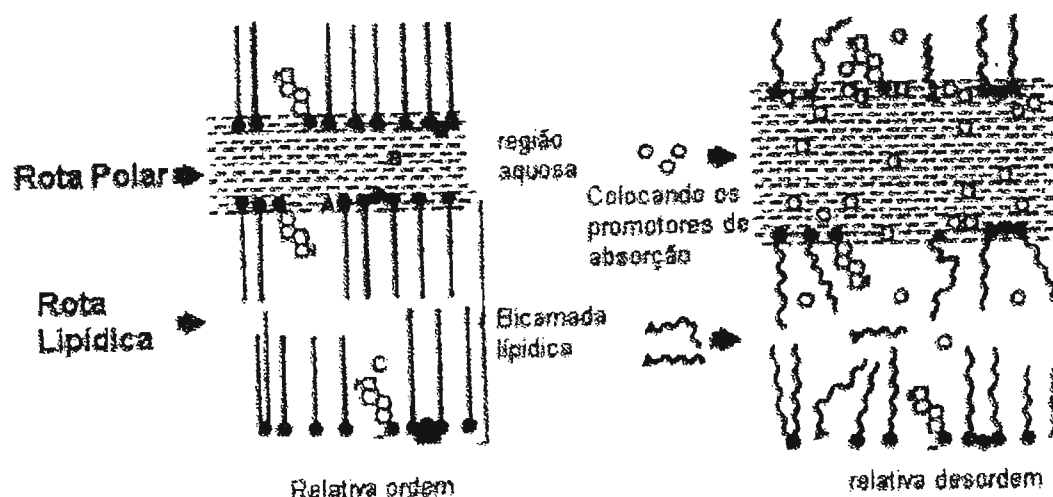


Figura 9. Mecanismo de ação de promotores de absorção na pele (Barry, 1993).

A interação de algumas substâncias promotoras com o estrato córneo pode ser observada na **Figura 10**.

Segundo RIEGER (1993), os promotores de absorção são substâncias capazes de aumentar o fluxo de fármaco através do estrato córneo. O mecanismo de atuação dos promotores ainda não está bem esclarecido, entretanto sabe-se que, provavelmente, não está relacionado à qualquer efeito sobre o veículo mas presume-se que rompam com a estrutura e organização do estrato córneo.

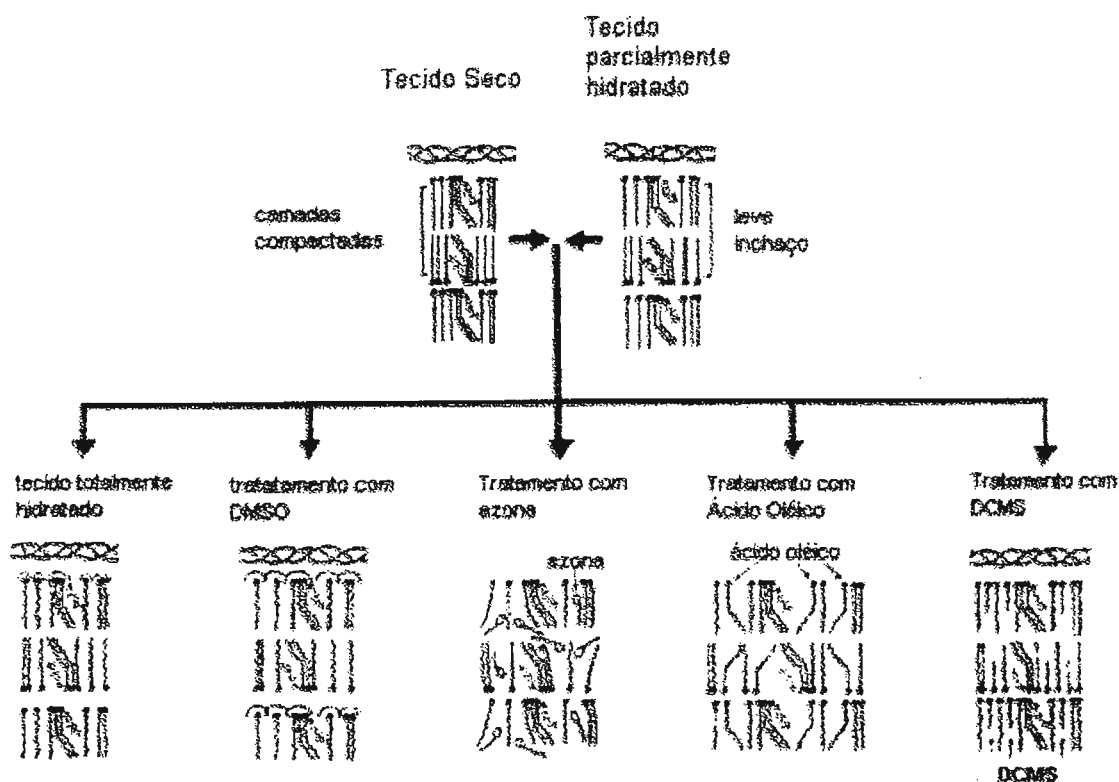


Figura 10. Proposta do modo de interação de alguns promotores com o estrato córneo (Barry, 1993).

O etanol é uma substância muito usada em preparações farmacêuticas em concentrações de até 90%. É basicamente empregado como solvente e/ou veículo, mas também vem sendo empregado com o objetivo de otimizar a absorção de fármacos. Dentre os promotores, é classificado como solvente de lipídeos (Yum et.al., 1994).

OBATA e colaboradores (1993 B) investigaram a influência do etanol na permeação do diclofenaco e observaram que o mesmo altera a densa camada lipídica da pele, aumentando, dessa maneira, a permeação do diclofenaco.

PERSHING et.al. (1990) estudaram a influência do etanol na permeação do 17 β -estradiol através de pele humana viável *in vivo*. Acredita-se que o aumento da penetração do fármaco ocorreu devido à extração dos lipídeos da pele pelo etanol.

O propilenoglicol é considerado um promotor pois interage com as proteínas intracelulares (Goodman, Barry, 1989).

SHETH et.al. (1986) verificaram que houve um aumento da permeação da trifluorotimidina (TFT), um antiviral, em estudos de permeação *in vitro* quando empregaram uma associação de propilenoglicol e laurocapram. Esses pesquisadores admitem que o propilenoglicol exerce um efeito direto no estrato córneo e/ou afeta a permeação do antiviral, pois altera a solubilidade do laurocapram ou da TFT.

WILLIAMS e BARRY (1989) empregaram propilenoglicol, uréia e seus análogos durante estudos de permeação de fármacos. Nesses estudos confirmou-se a existência de um sinergismo quando o propilenoglicol é empregado juntamente com a uréia e seus análogos.

Em 1988, GOODMAN e BARRY estudaram o efeito acelerador da permeação de substâncias como propilenoglicol, laurocapram, ácido oleico e decilmetilsulfóxido (DCMS) empregando como modelos os fármacos 5-fluorouracil e estradiol e relataram sua efetividade em baixas concentrações.

Os terpenos, substâncias derivadas de óleos essenciais de plantas, além de serem considerados bons promotores, têm a vantagem de ter baixo poder alergênico e tóxico (Cornwell et.al., 1996).

Segundo ORJALES (1998), os terpenos aumentam a difusão de substâncias lipofílicas, graças ao desarranjo que eles promovem na estrutura dos lipídeos do estrato córneo. Também foi relatado efeito sinérgico na associação de um terpeno com etanol.

OBATA et.al. (1993 A) estudaram o efeito promotor do *l*-mentol e do *d*-limoneno na absorção percutânea de diclofenaco nas formas ionizada e não-ionizada. Após pré-tratamento da pele de ratos sem pêlos, empregando essas substâncias dissolvidas em mistura de tampão fosfato e etanol, observaram aumento dos valores de coeficiente de permeabilidade mais acentuado quando o *l*-mentol foi empregado.

Em 1998, KITAGAWA et.al. estudaram a permeação de derivados do ácido benzóico utilizando a parte dorsal da pele de cobaias. Após a adição de mentol em etanol, verificaram que houve um aumento no fluxo e coeficiente de permeabilidade dessas substâncias, consideradas relativamente hidrofóbicas. Esses resultados sugerem que houve uma ruptura da rígida estrutura lamelar do estrato córneo causada pela associação do mentol e etanol.

Em 1996, ARELLANO et.al. também verificaram o efeito promotor de alguns terpenos na absorção percutânea do diclofenaco de sódio presentes em géis de carbopol contendo propilenoglicol. Nesse estudo *in vitro* utilizaram pele de rato da região abdominal.

SEKI et.al. (1989) empregaram miristato de isopropila, N-metil-2-pirrolidona e ácido oleico, como promotores para absorção percutânea de azidotimidina (AZT), na forma de solução, em ratos, sendo que apenas os animais submetidos a pré-tratamento, por 24 horas, com ácido oleico, apresentaram o efeito que permitiu detectar altas concentrações do AZT no plasma.

2.2. Metodologias *in vitro* para avaliação da liberação e permeação cutânea

A permeação de fármacos através da pele envolve duas etapas consecutivas: a liberação pelo veículo e sua subsequente transferência para a pele. Os estudos de liberação proporcionam dados muito importantes sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste liberar as substâncias ativas (Ansel, 1995; Barry, 1983; Bentley, 1994).

Embora muitos métodos experimentais e modelos sejam utilizados para estudar a liberação de fármacos e a permeabilidade da pele, todos tendem a ser agrupados em dois grandes grupos: métodos *in vivo* e métodos *in vitro* (Bronaugh, Collier, 1993; Franz et. al., 1993).

Os mais relevantes estudos são realizados em humanos, entretanto, os modelos animais podem ser usados para predizer o efeito em humanos. Os modelos incluem o porco, o macaco Rhesus, ratos, camundongos, entre muitos outros (Ansel, 1995; Barry, 1983; Wester, Maibach, 1993).

Devido à grande dificuldade encontrada durante a realização de ensaios de liberação e permeação *in vivo* e como essa última é considerada um processo de difusão passiva através da pele, os ensaios *in vitro* estão ganhando ampla aceitação como ferramenta para predizer o potencial de absorção dérmica *in vivo*. Para muitas classes de compostos, o uso de métodos *in vitro* pode fornecer valiosas informações com respeito à biodisponibilidade de produtos aplicados à pele (Barry, 1983; Bronaugh, Collier, 1993; Franz et. al. 1993).

Como algumas vantagens na escolha de estudos *in vitro* é possível citar (Barry, 1983; Bronaugh, Collier, 1993):

a.) A coleta de sangue, urina ou fezes torna-se desnecessária;

- b.) Há uma diminuição ou ausência do emprego de animais;
- c.) Possibilidade do emprego de membranas artificiais, substituindo a pele humana ou de um animal;
- d.) Possibilidade do teste de substâncias potencialmente tóxicas que não poderiam ser testadas em metodologia *in vivo*;
- e.) Quando for necessário o sacrifício de um animal a sua pele poderá ser aplicada em muitas células de difusão.

Na realização de um experimento *in vitro*, alguns fatores devem ser considerados, a saber:

- a.) Tipo de célula de liberação ou difusão empregada;
- b.) Preparo da pele ou membrana;
- c.) Escolha do fluido receptor;
- d.) Agitação e mistura adequada do fluido receptor durante o decorrer do experimento;
- e.) Manutenção da temperatura fisiológica.

2.2.1 Aparelhos utilizados nos testes *in vitro*

Os aparelhos usados nos estudos *in vitro* são conhecidos como células de liberação ou difusão. Uma grande variedade pode ser encontrada à disposição comercialmente, portanto, na sua seleção, devem ser avaliados parâmetros como (Barry, 1983; Bronaugh, 1993; Gummer et.al., 1987; Skelly, 1987):

- a.) As células devem ser feitas de materiais inertes e não-reativos (vidro, aço inoxidável ou teflon);

- b.) Deve-se verificar se não há perda do fármaco durante o experimento de liberação e/ou permeação;
- c.) A célula de difusão deve permitir que o fluido receptor seja bem homogeneizado no decorrer do experimento;
- d.) A célula de difusão deve possibilitar a leitura da temperatura do fluido receptor durante todo o experimento.

De uma maneira geral, essas células de liberação ou difusão funcionam por dois sistemas (Bentley, 1994; Bronaugh, 1993; Tojo, 1987):

- a.) Fluxo contínuo, onde a solução receptora é bombeada continuamente;
- b.) Fluxo estático, onde o volume da solução receptora é o mesmo durante todo o experimento.

As **Figuras 11 e 12** apresentam os sistemas de funcionamento e os modelos mais comuns de células de liberação e/ou difusão.

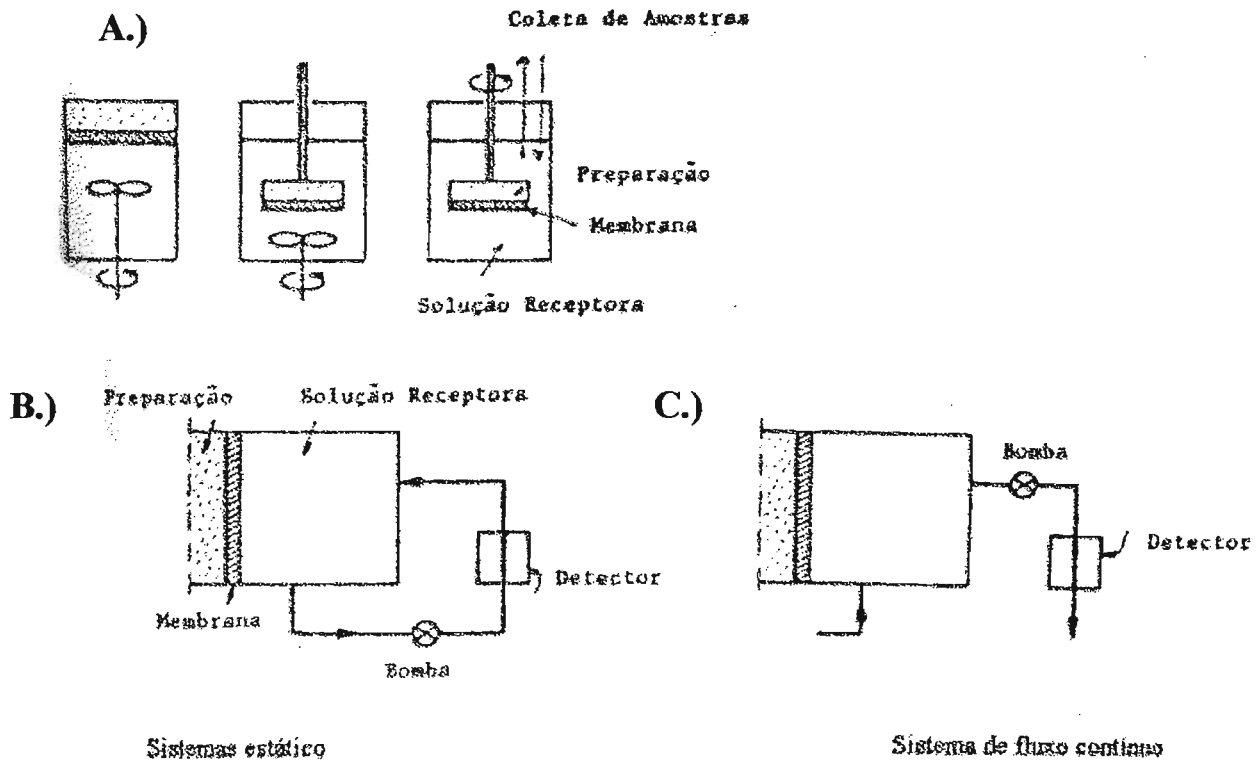


Figura 11. Sistemas de funcionamento de células de difusão *in vitro* (Tojo, 1987).

A = células tipo vertical; B e C = células tipo *flow-through*.

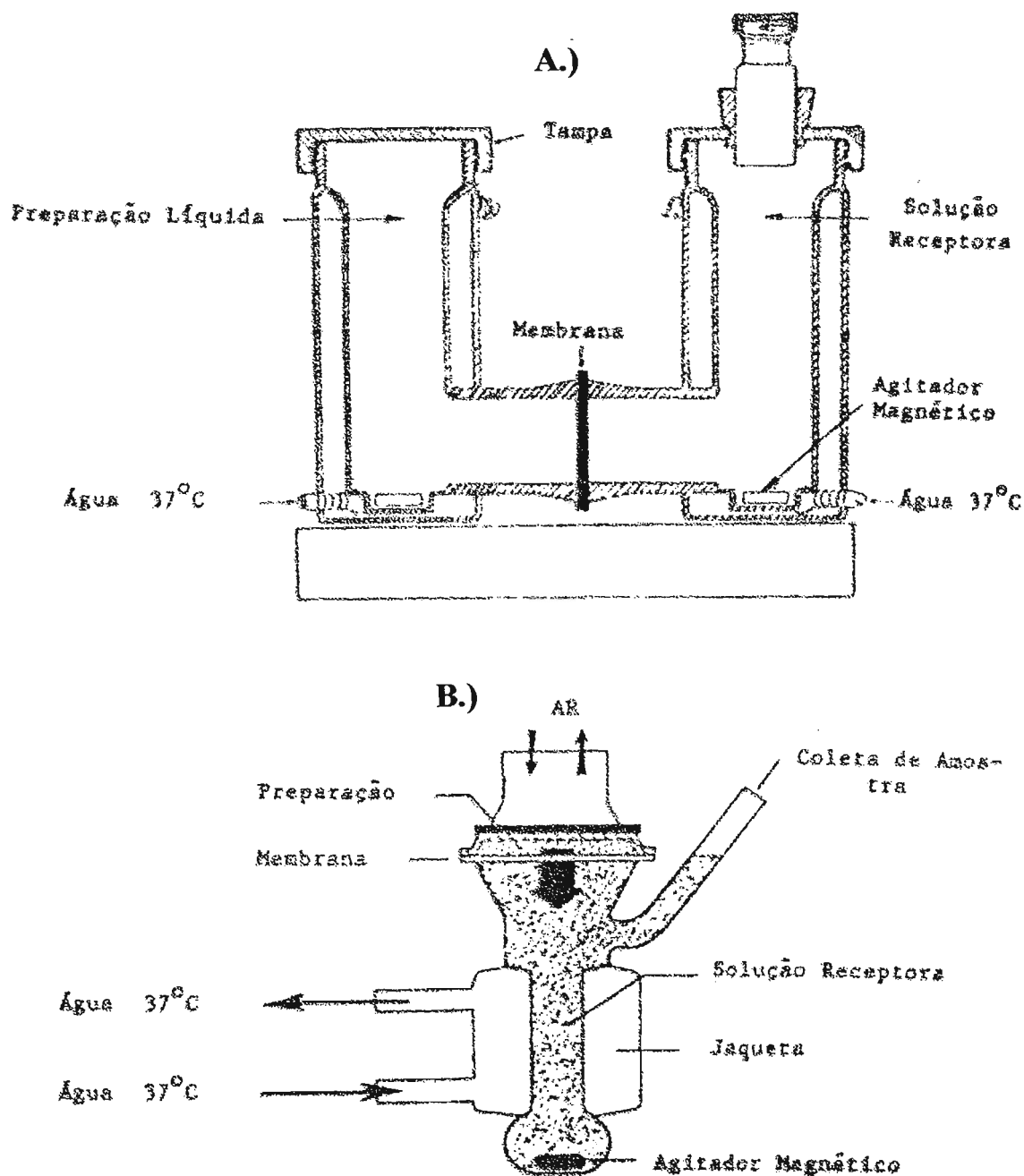


Figura 12. Modelos de células de difusão para estudos de liberação e/ou permeação de fármacos contidos em produtos dermatológicos (Tojo, 1987).

A = modelo Valia-Chien (V-C); B = modelo Ghannam-Chien (G-C).

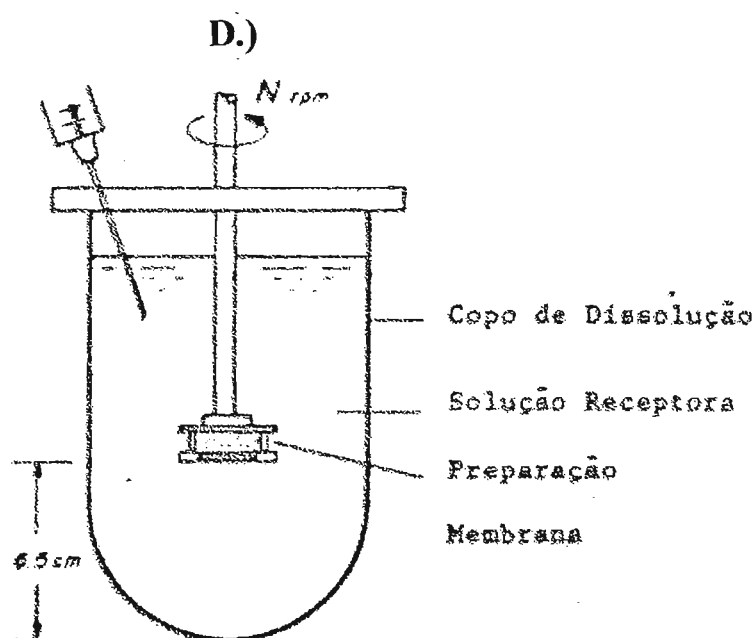
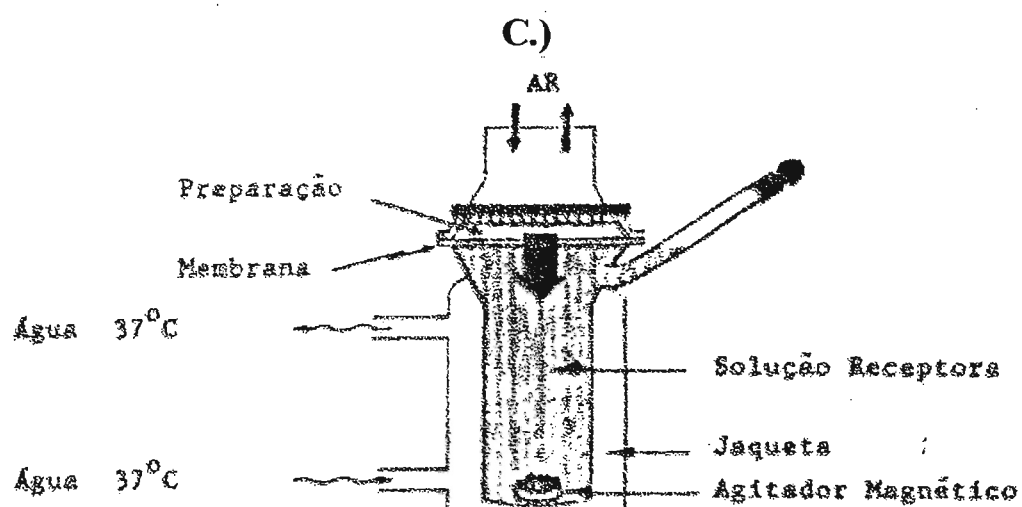


Figura 12 (Continuação). Modelos de células de difusão para estudos de liberação e/ou permeação de fármacos contidos em produtos dermatológicos (Tojo, 1987).

C = modelo Franz; D = modelo Keshany-Chien (K-C).

2.2.2. Fluidos receptores utilizados nos testes *in vitro*

Um aspecto de muita importância é a escolha do fluido receptor. Essa operação deve ser realizada com muito critério, de maneira que possa garantir o sucesso do experimento. Na maioria dos estudos dá-se preferência à solução isotônica tamponada a pH 7,4, como fluido receptor ideal. No entanto, sempre é necessário garantir *sink conditions*, ou seja, a atividade termodinâmica do fármaco no fluido receptor não deve exceder 10% de sua solubilidade de saturação, para assim, ser garantida uma permeação favorável e assegurar uma eficiente coleta do permeante. A viabilidade da pele pode ser mantida por 24 horas em células de difusão contínuas usando-se tampão fisiológico como fluido receptor (Bentley, 1994; Bronaugh, Collier, 1993; Skelly et. al., 1987).

Substâncias lipofílicas, como por exemplo pesticidas, fragrâncias e produtos derivados de petróleo, permeam com facilidade através do estrato córneo, sendo prontamente carregadas pela corrente circulatória quando aplicadas *in vivo*. No entanto, isso não acontecerá quando em um estudo *in vitro*, uma vez que essas substâncias não sofrerão partição do estrato córneo para a solução salina ou para o tampão isotônico, fornecendo uma idéia equivocada de que a substância não penetrou na camada córnea. Uma alternativa é uso de plasma de coelho ou de solução de albumina sérica, como fluido receptor, porém essas são menos efetivas que os tensoativos não-iônicos ou os solventes orgânicos. O fluido receptor mais efetivo, com mínimo risco para a integridade da pele, é uma preparação com um tensoativo não-iônico, o éter polioxietileno (20) oleílico, conhecido comercialmente por Volpo® 20 (Bronaugh, Collier, 1993; Lopes, 1999; Skelly et. al., 1987).

POZZO et.al. (1991) desenvolveram metodologia *in vitro* para estudos de permeação de substâncias altamente lipofílicas. Para isso, eles alteraram a fase receptora com a adição de

albumina sérica bovina. A justificativa para esta modificação é o alto poder de solubilização da albumina que se liga a compostos altamente lipofílicos. Essa ligação é reversível e a proteína pode ser facilmente retirada antes da realização de determinações analíticas.

Em 1988, GOODMAN e BARRY estudaram o efeito acelerador de algumas substâncias na permeação do estradiol. Para isso utilizaram, como meio receptor, uma mistura de álcool e água (1:1).

OBATA et.al. (1993 A) utilizaram tampão fosfato pH 7,2, como fluido receptor, para pesquisar a influência do etanol, como promotor de absorção, na permeação do diclofenaco em estudos *in vitro* de permeação através de pele de ratos sem pêlos.

Em 1999, MÜLLER e KREUTER utilizaram células de difusão de dois compartimentos com membranas artificiais e membranas animais para observar o transporte de substâncias associadas à nanopartículas. O meio receptor utilizado foi tampão fosfato pH 7,4 e o experimento foi realizado a $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

ZATZ (1995) verificou que, para haver melhor liberação de um fármaco do veículo e melhor transporte através dos poros das membranas, deve-se empregar um líquido não-viscoso, como fluido receptor, onde o fármaco pode dissolver-se com facilidade.

O volume do compartimento receptor varia de acordo com o diâmetro de sua abertura para amostra de pele ou membrana. O volume para uma célula de Franz com abertura de 7mm é de 3,8mL e para uma célula de 9mm, é 5,4 mL (Bronaugh, 1993).

2.2.3. Agitação do fluido receptor

Em todos os sistemas de difusão deve-se ter agitação e mistura adequada do fluido receptor. Isso deve ocorrer pois impede que a interface entre o fluido receptor e a membrana ou a pele sature-se, causando redução na quantidade de substância penetrada na pele. Sendo assim, barras magnéticas misturadoras são geralmente utilizadas para que ocorra homogeneização (Bronaugh, 1993; Bronaugh, Collier, 1993; Skelly et. al., 1987).

2.2.4. Manutenção da temperatura fisiológica

Os estudos *in vitro* são, geralmente, conduzidos em uma faixa de temperatura que varia de 22 a 37°C. A difusão das moléculas através da pele é dependente da temperatura. Embora a temperatura média do corpo seja 37°C, sabe-se que na superfície da pele é um pouco menor.

O método de manutenção da temperatura determinará qual faixa de temperatura a água do sistema deverá atingir. Células submersas em banhos d'água devem ser aquecidas exatamente na temperatura requerida. Para células que possuem jaquetas de aquecimento ou que são montadas sobre placas de aquecimento, a água circulante deve permanecer a temperaturas maiores devido à perda de calor durante o processo. A água a 35°C e que circula através de tubulações suspensas, como no caso do sistema *flow-through*, mantém a pele a 32°C (Bronaugh, 1993; Bronaugh, Collier, 1993; Skelly et. al., 1987).

2.2.5. Principais membranas utilizadas nos testes *in vitro*

Embora alguns experimentos de liberação *in vitro* possam ser realizados em ausência de membrana, os estudos de liberação aproximam-se mais das condições *in vivo* quando se utilizam sistemas com membranas. A pele retirada do animal apresenta a limitação de ser variável em qualidade e permeação, além de normalmente ser mais permeável que a pele humana. Os testes *in vitro* que empregam pele humana são, também, limitados devido à dificuldade de ser conseguida, estocada, alto custo e a variabilidade na permeação. (Bentley, 1994; Corrêa, 1997).

Sendo assim, fez-se necessário a investigação da viabilidade de membranas alternativas, que não a pele humana, com o objetivo de reproduzir a função barreira do estrato córneo, classicamente considerado uma barreira total à penetração e, possivelmente, à permeação de fármacos. Para isso, é possível utilizar, em estudos *in vivo*, peles de alguns animais, chamadas membranas naturais, e membranas sintéticas, como de celulose ou silicone, entre outras. Sabe-se que é possível estabelecer uma correlação *in vivo/in vitro*, mas deve-se ressaltar que essa correlação é específica para uma determinada membrana, um determinado fármaco e um determinado sistema de liberação (Barry, 1983; Haigh, Smith, 1994; Lopes, Kaneko, 2000; Wester, Maibach, 1993).

As membranas, sintéticas ou naturais, usadas nos testes de difusão são, em sua maioria, porosas. Os poros das membranas são preenchidos com o fluido receptor, fazendo com que a transferência do fármaco, do veículo para a membrana, realmente envolva a partição do líquido através dos poros. As moléculas do fármaco difundem-se e atingem o fluido receptor. Os principais fatores físicos que influenciam na cinética deste processo são: espessura, porosidade e tortuosidade da membrana, a viscosidade do fluido receptor e o coeficiente de partição fluido

receptor/veículo. Sendo assim, para oferecer baixa resistência, a membrana deve apresentar alta porosidade, espessura mínima e não se ligar ao fármaco (Zatz, 1995).

Em 1999, MÜLLER e KREUER utilizaram membranas artificiais (de acetato de celulose e de silicone) e membranas animais (intestino de porco e pele de camundongo sem pêlos) para observar o transporte de substâncias associadas à nanopartículas. Com esse estudo, observaram diferenças na permeabilidade das membranas. Segundo esses pesquisadores, a permeabilidade de substâncias e/ou fármacos através dessas membranas decresce na seguinte ordem: acetato de celulose, intestino de porco, silicone e pele de camundongo sem pêlos.

→ Membranas naturais:

A retirada da pele do animal e humana não altera significativamente a sua permeabilidade, uma vez que o estrato córneo é mantido intacto (Haigh, Smith, 1994).

- **Pele Humana:**

O uso de pele humana em experimentos tem algumas restrições: sua viabilidade é limitada e a permeabilidade varia consideravelmente entre espécies quando retiradas da mesma ou diferente área anatômica do mesmo doador. Essa variação aumenta quando comparamos os resultados de doadores da mesma raça, porém de idades diferentes (Haigh, Smith, 1994; Wester, Maibach, 1993).

- **Pele total (espessura total):**

Segundo HAIGH e SMITH (1994), a fonte de resultados mais satisfatórios é a pele de cadáveres ou amputações, pois esse tecido pode ser armazenado em congelador por longos períodos sem que ocorra qualquer alteração significativa no seu potencial de barreira. O

processo de obtenção da pele de espessura total (estrato córneo, epiderme e derme) é muito simples, mas é necessário o uso de um dermatômetro. Com o uso desse aparelho, cortam-se tiras de tecido cutâneo na espessura desejada, geralmente cerca de 430 μ m.

Se a pele de espessura total for usada nos experimentos deve-se ter em mente que *in vivo* a molécula difusante não tem que atravessar a camada dérmica; os vasos sanguíneos na junção dermo-epidérmica (uma profundidade de aproximadamente 200 μ m) absorvem rapidamente qualquer traço do difusante que chegue nessa região. Essa é uma resistência adicional colocada pela metodologia *in vitro*, por funcionar como uma barreira artificial à difusão de fármacos (Haigh, Smith, 1994).

- Estrato córneo e restante da epiderme:

O ambiente aquoso e relativamente espesso da derme pode apresentar partição desfavorável para difusantes lipofílicos e, conseqüentemente, experimentos *in vitro* são melhor conduzidos, para certos difusantes, sem a derme. Para isso, corta-se a pele com dermatômetro em tiras de espessuras de 200 μ m, que é a espessura aproximada do estrato córneo e restante da epiderme juntamente (Haigh, Smith, 1994). Há outras maneiras de se obter apenas a epiderme, a saber: imersão da pele em água quente, tratamento com calor seco (superfície quente), uso de enzimas e imersão da pele em água. Contudo, sabe-se que esta prática é considerada apropriada contanto que o método de separação não prejudique o experimento e nem cause danos à epiderme. Acredita-se que esses métodos alteram as propriedades de permeação da pele (Behl et.al., 1993). Como alternativa, BEHL et.al. (1993) sugerem a exposição da pele por alguns segundos no microondas.

- Estrato córneo:

Em muitos casos, somente o estrato córneo é utilizado nos experimentos. Neste caso, enzimas proteolíticas são empregadas para degradar as células viáveis da epiderme, que são, então, facilmente removidas do tecido queratinizado morto. Entre outras maneiras de obter apenas o estrato córneo há a técnica do *stripping* que utiliza fita adesiva (Haigh, Smith, 1994).

- Modelos Animais:

Devido à disponibilidade limitada de tecido cutâneo humano e ao fato de um grande número de investigações percutâneas serem tóxicas para condução em humanos, o número de modelos animais tem aumentado na investigação da cinética de absorção percutânea de fármacos.

A pele de vários animais difere da pele humana, principalmente pela espessura e composição bioquímica do estrato córneo, especialmente na densidade de folículos pilosos e de glândulas (**Quadros 2 e 3**). Além disso, o conteúdo lipídico exerce um papel fundamental na função barreira da pele e as diferenças entre as espécies ou entre os locais ocorrem devido à variação na quantidade de lipídios (Haig, Smith, 1994; Lopes, Kaneko, 2000; Wester, Maibach, 1993).

Segundo BRONAUGH e STEWART (1985), após a remoção da pele, é recomendável verificar a sua integridade. Um método sugerido é a condução do estudo de permeação com uma “molécula padrão de difusão”, por exemplo, a água triciada, comparando os valores obtidos a valores padrões de permeabilidade para membrana em questão.

Quadro 2. Coeficientes de permeabilidade da água *in vitro* para peles de humano e animais (Bronaugh, Stewart, 1985).

Espécies	Coeficiente de permeabilidade da água ($\text{cm h}^{-1} \times 10^5$)
Humano (abdômem)	93 - 250
Humano (couro cabeludo)	950
Humano (derme)	21996
Rato (Wistar)	103
Rato com pêlos	110
Rato sem pêlos (<i>hairless rat</i>)	130
Rato nú (<i>nude rat</i>)	152
Camundongo	144
Porco	180
Coelho	253
Camundongo sem pêlos	351
Porquinho da Índia	442
Mucosa bucal canina	18396

Quadro 3. Medidas de espessura de pele humana e de alguns animais (Bronaugh, Stewart, 1985).

Espécies	Estrato córneo (μm)	Epiderme (μm)	Pele inteira (mm)
Humano	16,8	46,9	2,97
Porco	26,4	65,8	3,43
Rato (fêmea) costas / abdômem	18,4 / 13,7	32,1 / 34,8	2,09 / 0,92
Rato (macho) costas / abdômem	34,7 / 13,8	61,1 / 30,4	2,80 / 1,66
Camundongo sem pêlos	8,9	28,6	0,70
Camundongo	5,8	12,6	0,84

- Camundongo:

Camundongos de laboratório são uma fonte de pele animal conveniente para pesquisa, pois são facilmente tratados e relativamente mais baratos quando comparados a outros animais. Deve-se ressaltar que esse animal possui um estrato córneo mais fino quando comparado com o de outros animais (Haigh, Smith, 1994; Wester, Maibach, 1993).

- Camundongo sem pêlos (*hairless mouse*):

Esse animal tem sido utilizado extensivamente em estudos de permeação cutânea, provavelmente, devido à grande similaridade com a pele de humanos. Apesar de seu número e diâmetro de folículos pilosos ser aquele que mais se aproxima ao da pele humana quando comparado a outros animais de laboratório, o seu estrato córneo tem uma espessura aproximadamente igual à metade da pele humana, implicando numa diminuição da função barreira. A pele desse animal é muito usada em experimentos, pois é pouco aderente às vísceras, quando comparada a outros tipos de pele (Haigh, Smith, 1994; Lopes, Kaneko, 2000; Wester, Maibach, 1993).

- Rato:

A pele do rato é considerada mais permeável que a pele humana e também que a do porco. Embora a pele de espessura completa seja mais freqüentemente empregada, a pele cortada em dermatômetro, com aproximadamente 350 μ m e contendo uma parte da epiderme, também, é muito empregada em experimentos de permeação cutânea *in vitro* por apresentar melhores resultados envolvendo compostos hidrofóbicos (Haigh, Smith, 1994; Wester, Maibach, 1993).

- Cobaio (*Guinea pig*):

A pele desse animal é raramente empregada, apesar de apresentar grande semelhança histológica com a pele humana. Na maioria dos casos, os estudos conduzidos com a pele de cobaio são investigações individuais e sem nenhuma correlação com a pele humana. No entanto, utiliza-se essa pele como ferramenta em estudos preliminares para penetração e permeação de substâncias (Haig, Smith, 1994; Wester, Maibach, 1993).

SHETH et.al. (1986) utilizaram a pele deste animal para avaliar a influência do propilenoglicol e laurocapram na permeação da trifluortimidina em estudos *in vitro*.

- Coelho:

A pele do coelho é considerada a mais permeável dos animais de laboratório. Isso indica que o coelho é um animal que não deve ser escolhido como modelo em estudos de permeação cutânea. No entanto, a pele do coelho é um bom indicador de toxicidade dérmica devido às suas rápidas características absorptivas e é extensivamente usada com essa finalidade (Haigh, Smith, 1994; Wester, Maibach, 1993).

- Macaco:

Apesar de apresentarem muitas similaridades com a pele humana, esses animais não são muito utilizados, por necessitarem de habilidades técnicas no seu manuseio e também, devido ao seu tamanho (precisam de dependências laboratoriais e cuidados especiais). Sendo assim, muitas vezes, torna-se inviável sua utilização (Haigh, Smith, 1994; Wester, Maibach, 1993).

- Porco:

Em muitos estudos *in vitro*, a pele do porco ou do porco miniatura provou ser um bom modelo animal para a pele humana. Embora o estrato córneo da pele do porco apresente quase o dobro da espessura da pele humana, sua pele é muito parecida com a do homem com relação à densidade de folículos pilosos, uma vez que apresenta a menor densidade de folículos pilosos, quando comparada à pele de outros animais de laboratório (Haigh, Smith, 1994; Lopes, Kaneko, 2000; Wester, Maibach, 1993).

- Muda de cobra:

Embora a muda de cobra não seja um tecido de mamífero, muitas substâncias penetram no seu estrato córneo em níveis similares ao da pele humana. Essa pele pode ser obtida sem danos ao animal, uma vez que a cobra troca de pele várias vezes durante a sua vida. Esse tecido não é vivo, pode ser armazenado em temperatura ambiente por longos períodos e é facilmente transportado. A única restrição desse tipo de tecido é a ausência de folículos pilosos, que podem significar uma rota de permeação importante para o homem (Haigh, Smith, 1994; Wester, Maibach, 1993).

- Membrana da casca do ovo:

A membrana da casca do ovo é utilizada por ser constituída basicamente de queratina. Sabe-se que ela é mais permeável que a membrana de celulose. Apesar de apresentar baixa resistividade, deve-se levar em consideração a facilidade na sua obtenção (Haigh, Smith, 1994).

- Estrato córneo obtido a partir de cultura celular:

Acredita-se que, embora seja consideravelmente mais permeável a um grande número de substâncias do que a pele humana, o estrato córneo sintético tenha a mesma capacidade de diferenciar-se. Parece ser possível aumentar a função barreira dessa membrana através da utilização de diferentes condições de cultura. Acredita-se que se uma membrana desse tipo pode ser produzida para mimetizar a pele humana, obviamente tornar-se-á uma das membranas de penetração percutânea mais requisitadas do futuro (Haigh, Smith, 1994).

- Outras membranas animais:

Outras peles de animais que também podem ser utilizadas, porém sem justificativas criteriosas são: sapo, *hamster*, bode, gato, cachorro, cavalo e chimpanzé (Haigh, Smith, 1994; Wester, Maibach, 1993).

→ Membranas Sintéticas:

Teoricamente é possível simular adequadamente a permeação *in vivo* de um fármaco utilizando um sistema de difusão específico e uma membrana sintética. A disponibilidade comercial, a estabilidade, a uniformidade entre lotes e a facilidade no manuseio influenciam na escolha da utilização de membranas sintéticas. O potencial de barreira de membranas porosas é ditado pela probabilidade da molécula difusante entrar e difundir-se através dos poros e os fatores que governam a seletividade à difusão seria o tamanho molecular relativo, estrutura molecular e suas interações eletrostáticas com a membrana. Por outro lado, membranas aporosas parecem oferecer alguma resistência à permeação e devem, no entanto, simular de uma maneira mais aproximada a difusão através de tecidos biológicos. Nesse caso, as propriedades de barreira geralmente estão relacionadas à solubilidade do difusante na matriz

polimérica (coeficiente de partição entre o veículo doador e a membrana) e a facilidade de passagem do difusante através da membrana (Haigh, Smith, 1994).

- Membrana de celulose:

A celulose é uma estrutura relativamente rígida que consiste de anéis de glicopiranosose unidos por ligações do tipo β -1,4. Esta conformação permite apenas dois tipos de movimento nas cadeias: inversão do anel de piranosose ou a rotação ao redor da ligação glicosídica. As membranas comerciais apresentam 8000 a 15000 daltons (membranas para diálise) e contêm algumas substâncias (conservantes, plastificantes, entre outros) que devem ser removidas antes do teste de permeação, pois podem alterar os resultados significativamente. A remoção dessas substâncias é simples e pode ser realizada apenas colocando a membrana em água por um certo período ou fervendo a mesma em água, quando recomendado pelo fabricante. A membrana de acetato de celulose é muito usada em experimentos utilizando células de difusão, ao passo que a membrana de nitrato de celulose é muito usada como modelo para barreira gástrica. Geralmente, as membranas de celulose são mais permeáveis que as membranas biológicas ou as sintéticas aporosas (Haigh, Smith, 1994).

BARRY e EL EINI (1976) investigaram a permeação de esteróides empregando membrana de acetato de celulose e utilizando o método do *Lag Time*.

Em 1977, BARRY e BRACE estudaram a influência da polaridade de estrogênios na permeação. Para isso, utilizaram membrana de acetato de celulose, a qual foi primeiramente lavada com água quente e, em seguida, armazenada em água fria até o momento do uso. Nesse estudo verificaram que uma molécula menos polar permeia mais rapidamente.

- Membranas filtrantes:

Membranas filtrantes porosas são pouco usadas em sistemas de difusão. Um exemplo é a membrana de policarbonato. Em geral, essas membranas devem sofrer um pré-tratamento que resume-se em serem colocadas em um recipiente com água purificada à temperatura e tempo recomendados pelos fabricantes. Essa operação é realizada apenas para manter a uniformidade na preparação da membrana, uma vez que o material do filtro não é higroscópico e tem um baixo potencial de adsorção. O uso de membranas filtrantes não simula a pele e não fornece uma barreira eficiente para a passagem de difusantes (Haigh, Smith, 1994).

- Polímeros sintéticos:

A difusão de uma molécula através de um polímero sintético contínuo é semelhante em diversos aspectos à difusão através de líquidos que não são agitados. A transferência de massa através da matriz é dependente da frequência de formação de *voids* de tamanho suficiente para acomodar o difusante. Os *voids* são formados pelas oscilações das cadeias de polímeros que ocorrem ao acaso e, quanto maior for a espécie difusante, maior será o número de unidades poliméricas vizinhas, que teriam que mover-se de uma maneira específica com o propósito de gerar um *void* de volume suficiente para acomodar o difusante. Outro fator importante é o coeficiente de partição da substância difusante.

Essas membranas podem conter aditivos (20 – 30% de sílica ou grafite), que são colocados para aumentar a força da membrana, e essa presença aumenta o potencial de barreira à permeação (Haigh, Smith, 1994).

2.3. Infecções fúngicas

As infecções fúngicas são uma das causas mais comuns de doenças de pele nos Estados Unidos, sendo as preparações farmacêuticas de ação antimicótica, representantes de um importante ramo das formas de uso tópico. As infecções micóticas superficiais da pele, pêlos e unhas são, geralmente, crônicas e resistentes ao tratamento mas, raramente, comprometem o estado geral do paciente. Isso se explica uma vez que as micoses superficiais são causadas por fungos que infectam somente tecidos queratinizados e não invadem tecidos mais profundos (Jawetz et. al., 1980; Martindale, 1993).

Apenas há pouco tempo foram introduzidas novas classes de compostos com atividade antifúngica mais efetiva e os fármacos atualmente existentes são: griseofulvina, imidazóis (econazol, miconazol e cetoconazol), triazóis (itraconazol e fluconazol) e alquilaminas (naftifina e terbinafina). Itraconazol e terbinafina podem mudar significativamente a terapia por via tópica das doenças fúngicas da pele e unhas, entretanto, não estão ainda aprovadas para tratamento tópico, encontrando-se sob avaliação pelo *FDA (Food and Drug Administration)*. Sabe-se que, após administração oral, alcançam altas concentrações na epiderme e anexos e esses níveis persistem, mesmo após interrupção do tratamento (Guzzo et. al., 1996). No **Quadro 4** é apresentado um resumo dos principais tratamentos propostos para os tipos mais comuns de micose cutânea.

A dificuldade no tratamento das infecções micóticas superficiais da pele pode ser atribuída não só à sua natureza crônica e resistente, mas também à baixa penetração tópica dos fármacos com ação antimicótica. A alternativa ao uso tópico tem sido a administração de altas

doses por via oral por tempo prolongado, o que muitas vezes provoca o aparecimento de efeitos colaterais sistêmicos indesejados (Reminton's, 1995).

Quadro 4. Terapias antifúngicas recomendadas em função do tipo de micose tópica (Guzzo et al., 1996).

Tipo de micose	Tratamento tópico	Tratamento oral
Tinea corporis localizada	Azóis	---
Tinea corporis generalizada	---	Griseofulvina, fluconazol, itraconazol *, terbinafina*
Tinea pedis	Azóis e alquilaminas	Griseofulvina, terbinafina*, itraconazol*, fluconazol
Onicomicoses	---	Griseofulvina, terbinafina*, itraconazol*, fluconazol
Candidíase localizada	Azóis	---
Candidíase generalizada e mucocutânea	---	Cetoconazol, itraconazol*, fluconazol
Tinea versicolor localizada	Azóis e alquilaminas	---
Tinea versicolor generalizada	---	Cetoconazol, itraconazol*, fluconazol

* Fármacos ainda não aprovados pelo *FDA-USA* para essa finalidade.

Na quimioterapia, deve-se considerar sempre a íntima correlação entre três entidades: quimioterápico, parasito e hospedeiro. Cada qual delas atua sobre as duas outras. Assim, o quimioterápico (nesse caso, a substância antifúngica ou antimicótica) age predominantemente sobre o parasito, exercendo efeito ou *stático* ou *cida*, mas também sobre o hospedeiro, embora com menor intensidade, provocando os inevitáveis efeitos adversos, dos quais nenhum fármaco está isento. O parasito pode interferir com o quimioterápico, inativando-o por mecanismos

enzimáticos e com processos metabólicos e fisiológicos normais do hospedeiro, em consequência da infecção ou infestação. De modo análogo, o hospedeiro pode agir sobre ambos: sobre o quimioterápico, ao ativá-lo ou inativá-lo através de mecanismos enzimáticos e, sobre o parasito, quer fagocitando-o, quer neutralizando-o por anticorpos, por exemplo (DEF 98/99, 1998; DEF 99/2000, 2000; Korolkovas, Burckhalter, 1988; Korolkovas, 1999; Richardson, Warnock, 1993).

2.4. Cetoconazol

O cetoconazol é um antimicótico imidazólico de amplo espectro, indicado no tratamento de infecções causadas por uma grande variedade de fungos e leveduras. Age bloqueando a síntese do colesterol fúngico, essencial para a integridade da membrana celular. Seu espectro de ação inclui *Blastomyces dermatitidis*, *Candida ssp*, *Chromomyces*, *Coccidioides immitis*, dermatófitos, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Pseudallescheria boydii*.

2.4.1. Propriedades físico-químicas

(Clarke's, 1986; European Pharmacopoeia supplement 1999, 1998; Machmer, 1985; Remington, 1995; Merck Index, 1996; USP 22. ed., 1989; USP 23. ed.,1994; USP 24. ed.,1999).

- Origem: sintética

- Grupo químico: imidazóis

- Fórmula estrutural:

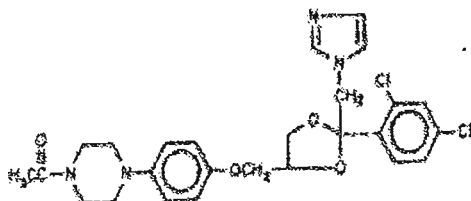


Figura 13. Fórmula estrutural do cetoconazol.

- Fórmula química:

$C_{26} H_{28} Cl_2 N_4 O_4$ (C 58,76%, H 5,31%, Cl 13,34%, N 10,54%, O 12,04%)

- Massa molecular: 531,44g

- Nome químico:

cis-1-Acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]-metoxi]fenil]piperazina.

- Sinônimo: R – 41400

- Descrição:

É um pó branco ou levemente bege, inodoro e quase insípido.

- Solubilidade:

É solúvel em ácido e praticamente insolúvel em água. É solúvel em etanol (1 em 54), em clorofórmio (1 em 2), em metanol (1 em 9) e levemente solúvel em éter.

2.4.2. Farmacologia

O cetoconazol altera a permeabilidade das membranas da célula fúngica e da levedura. A inibição da biossíntese do ergosterol é acompanhada pelo acúmulo de 14α -metilesterol. A concentração de $0,01\mu\text{g. ml}^{-1}$ inibe o crescimento de *C. albicans* após 7 dias de cultura, porém os efeitos tóxicos em fibroblastos humanos (teste *in vitro*) foram observados com concentrações acima de $100\mu\text{g. ml}^{-1}$. O cetoconazol inibe a síntese de testosterona em humanos e em células Leydig isoladas de rato.

Observou-se que as concentrações de testosterona do soro e da saliva abaixaram em 30% dos níveis basais de 4 a 6 horas após a administração oral. Foi observada uma queda nos níveis plasmáticos de testosterona durante o tratamento com cetoconazol. Essa queda é acompanhada por um aumento dos níveis de 17α -hidroxiprogesterona. A eficácia farmacológica pode ser avaliada *in vitro* com a concentração mínima inibitória das espécies fúngicas envolvidas. No entanto, isso dependerá do organismo do indivíduo, do tamanho do inóculo e do meio de cultura (Bennett, 1996; Dollery, 1991; Finch, 1996; Informação de Medicamentos, 1989; Olin, Kastrup, 1996; Remington's, 1995; USP DI, 1997).

2.4.3. Toxicologia

A DL_{50} para o cetoconazol foi determinada 7 dias após uma dose única em animais e os resultados foram os seguintes (todos os valores foram expressos em $mg.kg^{-1}$ para machos e fêmeas, respectivamente) : (a) administração intravenosa: camundongos 47 e 42; ratos 86 e 86; porquinhos da Índia 23 e 33; cães 42 e 56; (b) administração oral: camundongos 786 e 618; ratos 287 e 166; cobaias 178 e 226; cães 937 e 640 (Dollery, 1991).

Verificou-se que tratamentos prolongados (20-52 semanas) em cães da raça *beagle* causaram anorexia reversível e um aumento nos níveis de enzimas hepáticas no soro em dose de 20–40 $mg.kg^{-1}$ (peso corpóreo). Doses mais altas (80 $mg.kg^{-1}$) causaram icterícia e morte em 4 semanas.

Foram observadas alterações histológicas em fígado, rim, adrenais e ovários de ratos tratados com 20–160 $mg.kg^{-1}$. A fertilidade foi reduzida em ratos machos tratados com cerca de 80 $mg.kg^{-1}$ e ratas tratadas com 40 $mg.kg^{-1}$.

Prole de ratas tratadas com aproximadamente 80 $mg.kg^{-1}$ ou mais apresentou teratogenicidade (oligodactilia e sindactilia).

Não foram observados efeitos mutagênicos nem carcinogênicos (Bennett, 1996; Dollery, 1991; Remington's, 1995).

2.4.4. Farmacologia clínica

O cetoconazol é um agente antifúngico de amplo espectro absorvido por via oral. É ativo contra uma grande variedade de fungos e leveduras. Em humanos, reprime os níveis de testosterona e esteróide adrenal.

A dose diária recomendada é de 200mg, na forma de dose única administrada juntamente com a refeição, geralmente durante 14 dias. Em casos de infecções onde a resposta é fraca recomenda-se a administração de 400mg.

O risco de hepatotoxicidade aumenta em tratamentos com duração mais longa, mas é particularmente eminente nos primeiros meses. Para tratamentos de mais de 14 dias devemos sempre considerar a existência de riscos; nesses casos deve sempre haver a monitoração das funções hepáticas.

A incidência de reações hepáticas sintomáticas relatadas é da ordem de 1/10000 a 1/15000 e é geralmente reversível se o tratamento for interrompido.

O cetoconazol também é usado em formulações tópicas sob a forma de cremes para tratamento de infecções superficiais causadas por fungos e leveduras; também é utilizado em xampus para *pitiríase capitis* (Bennett, 1996; Dollery, 1991; Finch, 1996; Información de Medicamentos, 1989; Männistö, 1982; Olin, Kastrup, 1996; Remington's, 1995; USP DI, 1997).

2.4.5. Farmacocinética

O cetoconazol é prontamente absorvido após administração oral, porém a sua absorção é incompleta. Embora seja recomendado que a droga seja administrada durante as refeições, há dúvidas a respeito da presença de alimento na absorção da droga. O cetoconazol é lipofílico, apresentando baixíssima solubilidade em água exceto em pH baixo. Dessa maneira, sua absorção deve ser aumentada na presença de alimento. Embora seja improvável que a administração de cetoconazol juntamente com o alimento possa causar algum problema, recomenda-se que pacientes que façam uso de antiácidos ou antagonistas de H₂ os administrem duas horas após a administração do cetoconazol.

Os picos de concentrações sanguíneas de cetoconazol são obtidos após 3 horas de sua administração e são proporcionais à sua dose. Em animais, o fármaco é rápida e largamente distribuído no organismo e é provável que o mesmo ocorra no homem.

Embora o volume de distribuição seja de apenas 0,36L.kg⁻¹ (assumindo o peso médio de 70Kg para um indivíduo adulto) o cetoconazol apresenta-se extensivamente ligado no sangue humano (99%), sendo que 84% às proteínas e 15% aos eritrócitos. A distribuição não é significativamente alterada pela obesidade.

Embora ocorra pouca passagem através da placenta, o cetoconazol demonstrou ser teratogênico quando administrado a ratos em altas doses. Sendo assim, o seu uso na gravidez é contra-indicado. Em fêmeas de cães, o fármaco foi detectado no leite. Dessa maneira, a sua administração é também contra-indicada em mães no período de amamentação, apesar de não haver nenhum caso relatado para humanos.

O cetoconazol é extensivamente metabolizado no fígado. Acredita-se que a eliminação do cetoconazol seja prejudicada na presença de doenças hepáticas. Em casos de debilitação

renal há pouca alteração na cinética do fármaco (Brass et.al., 1982; Dollery,, 1991; Remington's,1995).

2.4.6. Biotransformação

O cetoconazol passa por uma série de reações do metabolismo hepático, sendo eliminado na forma de metabólitos na sua principal via de eliminação, a bile.

As principais reações de biotransformação que ocorrem no fígado são:

- 1) Oxidação do anel imidazólico seguida de uma degradação do imidazol oxidado;
- 2) Degradação oxidativa do anel de piperazina;
- 3) Hidroxilação aromática.

A precisa identificação dos metabólitos mais importantes ainda não está concluída, mas acredita-se que não sejam farmacologicamente ativos. O cetoconazol inibe o metabolismo de muitas etapas da oxidação dependente do P-450, particularmente a P450 IIIA. Acredita-se que o cetoconazol seja oxidado pela P450 IIIA e indutores dessa isoenzima, como a rifampicina, reduzam os níveis plasmáticos do fármaco (Dollery, 1991; Remington,1995).

2.4.7. Uso terapêutico

- Indicações

No tratamento de infecções por dermatófitos (*ringworm*), candidíase cutânea ou pitíriase versicolor, infecção causada pela levedura *Pityrosporum orbiculare*, o cetoconazol pode ser empregado nas formas tópicas (cremes, loções, entre outras) como única terapia ou em

associação com outro agente sistêmico, nos casos de difícil tratamento. O tempo de administração das formas farmacêuticas tópicas varia entre duas a seis semanas. O cetoconazol é reconhecidamente efetivo no tratamento de dermatite seborréica, porém o creme e o xampu contendo esse fármaco foram aprovados para tratamento da dermatite seborréica e pitíriase capitis (caspa) (Bennett, 1996; Odds, 1980; USP DI, 1997). No **Quadro 5** estão sumarizados os usos do cetoconazol no tratamento de micoses sistêmicas e infestações tópicas.

Quadro 5. Indicações para usos oral e tópico do cetoconazol (USP DI, 1997).

Uso oral	Uso tópico
Micoses sistêmicas	Infecções por dermatófitos (<i>Tinea cruris</i> , <i>T. corporis</i> , / ringworm, <i>T. pedis</i> , <i>T. barbae</i>)
Candidíase mucocutânea crônica severa	Candidíase cutânea (<i>Candida</i> sp.)
Micoses graves do trato gastrointestinal que não tenham respondido bem ou que tenham sido resistentes à outra terapia	Pitíriase versicolor (<i>T. versicolor</i>)
Candidíases vaginais crônicas que não tenham respondido bem à outra terapia	Dermatite seborréica e pitíriase capitis (caspa) causadas por <i>Pityrosporum</i> spp
Profilaxia em pacientes imunodeprimidos	
Infecções por dermatófitos determinadas em cultura (com exceção de unhas e rachaduras dos dedos dos pés) que não tenham obtido resposta à outra terapia	

No **Quadro 6**, estão ilustradas as formas farmacêuticas para uso tópico disponíveis no mercado que contêm cetoconazol.

Quadro 6. Especialidades farmacêuticas de uso tópico contendo cetoconazol. (DEF 98/99, 1998; DEF 99/2000, 2000).

Nome comercial	Forma farmacêutica	Apresentação	Laboratório
Candiderm®	Creme	Bisnaga com 30g	Aché
Cetonax Creme®	Creme	Bisnaga com 30g	Cilag Farm. Ltda.
Cetonil Creme®	Creme	Bisnaga com 20g	Stiefel
Cetozol Creme®	Creme	Bisnaga com 20g	Cazi
Fungoral Creme®	Creme	Bisnaga com 20g	Farmion
Ketonan Creme®	Creme	Bisnaga com 30g	Marjan
Miconan K.B.®	Creme	Bisnaga com 30g	Ativus Farmacêutica
Nizoral Creme®	Creme	Bisnaga com 30g	Janssen Farmacêutica
Noriderm®	Creme	Bisnaga com 20g	EMS
Novacort®	Creme ou Pomada	Bisnaga com 30g	Aché

O tratamento das micoses cutâneas por via tópica é o ideal, uma vez que os efeitos colaterais sistêmicos, associados aos fármacos de ação antimicótica, são muitos e geralmente incluem hepatotoxicidade. Muitas vezes, a terapia é longa e o paciente, com frequência, interrompe o tratamento logo após desaparecimento dos sintomas, colaborando para a reincidência e resistência da doença. Por outro lado, fármacos como o cetoconazol, são pouco permeáveis à pele e, em geral, é necessária a adição de adjuvantes ou o uso de preparações que favoreçam sua passagem até o local infectado.

- Contra-indicações

O uso do cetoconazol está contra-indicado nos casos de doença hepática pré-existente, gravidez, mulheres em período de amamentação (lactantes) e hipersensibilidade a fármacos imidazólicos.

- Posologia

No tratamento de micoses sistêmicas e infecções por dermatófitos administram-se, normalmente, 200mg de cetoconazol diariamente durante 14 dias. O período de administração é prolongado apenas quando sua resposta clínica é muito fraca. Sua dose pode ser aumentada para 400mg diários apenas quando a resposta para 200mg diários também for fraca. No entanto, recomenda-se medir os níveis plasmáticos antes da dose ser aumentada (no máximo $8\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$) (Dollery, 1991; USP DI, 1996).

2.4.8. Reações adversas

- Superdosagem aguda

Não há relatos de casos de superdosagem acidental ou proposital, entretanto, recomenda-se realizar uma lavagem gástrica com bicarbonato de sódio para prevenir absorção do fármaco.

- Efeitos adversos severos ou irreversíveis

O cetoconazol causa rápida depressão dos níveis de testosterona no soro (cerca de 25%) após 4 horas da ingestão. Na maioria dos pacientes, esse efeito não exerce nenhuma influência na libido ou características sexuais secundárias.

Há relatos de ginecomastia em alguns pacientes nos quais foram administradas doses terapêuticas de cetoconazol. Oligospermia e supressão da adrenal podem ocorrer, dependendo da dose.

- Efeitos adversos sintomáticos

Foram relatados casos de náuseas, vômitos, prurido, dor abdominal, diarreia, cefaléia, urticária e tontura, sendo todos considerados incomuns, com exceção de náuseas, com frequência de 3 a 10%.

- Interferência em testes clínico-patológicos

Acredita-se que o cetoconazol possa interferir no doseamento de triglicérides do soro, uma vez que há casos de pacientes com níveis de triglicérides normais que tiveram esses níveis aumentados após a administração de cetoconazol.

- Reações menos comuns

Hepatite

Foi observado aumento assintomático de enzimas hepáticas de 50% acima dos níveis normais em 14% em cerca de 1000 pacientes. Icterícia também foi observada em 1/10000 pacientes e, mais recentemente, 1/15000 pacientes nos E.U.A. Um pequeno número de fatalidades foi relatado, mas a maioria destas ocorreu em pacientes que tiveram a terapia continuada apesar da evidência clínica de danos hepáticos

Em pacientes que apresentam reações hepáticas severas foi observada uma variedade de alterações histológicas.

Anafilaxia

Foram observados casos raros de anafilaxia após a primeira dose (Dollery, 1991; Finch, 1996; Remington's, 1995).

2.4.9. Grupos de alto risco

- Neonatos

Não há informação disponível.

* *Leite materno*: A amamentação é contra-indicada.

- Crianças

A dose deve ser reduzida em crianças para $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (peso corpóreo).

- Mulheres grávidas

O cetoconazol é contra-indicado na gravidez .

- Idosos

Idosos podem receber doses normais. (Dollery, 1991; Remington's, 1995).

2.4.10. Interações do fármaco

- Absorção

A absorção do cetoconazol é reduzida por fármacos que reduzem a acidez gástrica. Tais fármacos devem ser administrados duas horas após a administração do cetoconazol.

- Metabolismo

Todas as drogas imidazólicas opõem-se às enzimas hepáticas microsossomais e algumas interações foram relatadas com as seguintes drogas:

* Álcool:

Observou-se rubor facial agudo e náuseas após ingestão concomitante de álcool e cetoconazol.

* Ciclosporina-A:

A administração simultânea de cetoconazol e ciclosporina-A leva a um aumento dos níveis sanguíneos de ciclosporina-A. Por esse motivo, há risco de nefrotoxicidade, sendo necessária monitoração cuidadosa. Nesse caso, a dose deve ser ajustada. Esse efeito pode ocorrer devido à inibição competitiva pelo citocromo P 450

* Fenitoína:

Foram relatados níveis de cetoconazol baixos e tardios em um paciente em tratamento com fenitoína, embora fosse notório que esse paciente apresentasse baixos níveis de cetoconazol antes da administração de fenitoína.

* Tuberculostáticos:

Tanto a rifampicina quanto a isoniazida causam redução nos níveis de cetoconazol.

* Warfarina:

Embora não tenha sido comprovado, acredita-se que o cetoconazol possa interagir com a warfarina, causando uma redução da atividade anticoagulante (Dollery, 1991).

2.4.11. Principais métodos analíticos usados na quantificação do cetoconazol

Os métodos analíticos disponíveis na literatura para quantificação do cetoconazol incluem técnicas físico-químicas e microbiológicas, sendo consideradas mais sensíveis as físico-químicas. Já os métodos microbiológicos são considerados métodos de segunda escolha, uma vez que são trabalhosos e não são muito específicos (Machmer, 1985).

2.4.11.1. Métodos Microbiológicos

O cetoconazol pode ser dosado através de vários métodos microbiológicos, incluindo técnicas de difusão e turbidimetria. Contudo, estes métodos são trabalhosos e não muito específicos, pois sofrem interferências de metabólitos do cetoconazol e outros compostos (Machmer, 1985).

GREND AHL & SUNG (1978) padronizaram um ensaio simples e confiável para a quantificação do cetoconazol e outros imidazólicos através da difusão em ágar. Esse método mostrou-se sensível a uma quantidade igual ou inferior a 0,2µg do fármaco.

AL-MESHAL (1989) propôs um teste microbiológico para determinar o cetoconazol em plasma e em comprimidos também empregando a técnica de difusão em ágar, utilizando como reagente microbiológico, a *Candida albicans*.

2.4.11.2. Métodos Físico-químicos

Potenciometria:

Segundo às Farmacopéias Americanas 24^a, 23^a e 22^a ed., para o doseamento do cetoconazol, na forma de matéria-prima, está descrita a técnica de titulação em meio não-aquoso, empregando ácido acético glacial como solvente. O titulante é ácido perclórico 0,1N em meio acético e a detecção do ponto final é realizada potenciométricamente com sistemas de eletrodos de calomelano (USP 22^a ed., 1990; USP 23^a ed., 1995; USP 24^a ed., 2000). A mesma técnica é preconizada pela Farmacopéia Britânica (1993), exceto que o cetoconazol é dissolvido em mistura de ácido acético glacial e 2-butanona (British Pharmacopoeia, 1993).

ABOUNASSIF et.al. (1989) desenvolveram um método potenciométrico que pode ser aplicado para o doseamento de cetoconazol puro ou em comprimidos. Nesse método a amostra é dissolvida em uma mistura de ácido acético glacial e anidrido acético e titulada com ácido perclórico 0,1N, sendo que o ponto final é obtido graficamente como um pico bem distinto.

Espectrofotometria:

MACHMER et.al. (1985) descreveram uma técnica para quantificar cetoconazol em comprimidos no qual as absorbâncias das soluções amostra e padrão são determinadas a 222nm, utilizando HCl 0,01N como branco.

EL-SHABOURI et.al. (1998) padronizaram um método espectrofotométrico para doseamento de cetoconazol e outros imidazóis em formas farmacêuticas, baseado na formação de um complexo do fármaco com o iodo, com leituras efetuadas a 290nm.

Em 1998, SADEGHI e SHAMSIPUR desenvolveram método analítico para determinação de pequenas quantidades de cetoconazol baseado na sua extração com solução clorofórmica de pH 2,5 após prévia complexação com ácido pícrico, seguida de determinação espectrofotométrica a 410nm.

GAWAD et.al. (1997) padronizaram método para doseamento de cetoconazol em comprimidos. Esse método é baseado na complexação do cetoconazol com Fe^{3+} que, na presença de tiocianato de potássio, torna-se rosa e é extraído com 1,2-dicloroetano, sendo detectado colorimetricamente em um comprimento de onda de 510nm.

Em 1994, KEDOR e colaboradores pesquisaram método para a determinação de cetoconazol em comprimidos e cremes, padronizado a 222nm e a 269nm, utilizando ácido clorídrico 0,01M como solvente.

KELANI e BEBAWY (1997) estudaram um método que determina a quantidade de cetoconazol em comprimidos após sua interação com 2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona (DDQ). A reação resulta na formação de composto altamente colorido, cuja leitura é realizada no comprimento de onda de 588nm.

Cromatografia Gasosa (CG):

HEYKANTS et.al. (1982) padronizaram um método CG para quantificação do cetoconazol em plasma e tecido vaginal humano, empregando como padrão um análogo do cetoconazol (R44744) no qual um grupo acetila é substituído por uma função 4-clorobenzila. Após extração com mistura de heptano e álcool isoamílico (95:5) as amostras

foram tratadas. Os resíduos foram dissolvidos com de metanol e foram injetadas alíquotas em um cromatógrafo gasoso Varian, modelo 200, equipado com detector de captura eletrônica ^{63}Ni . A coluna de vidro (0,5m x 2mm ID) com OV-22 a 3% em Supelcoort (80–100 mesh) foi operada isotermicamente à uma temperatura de 310°C com nitrogênio gasoso a um fluxo de 100mL/min. As temperaturas do injetor e detector foram 210 e 240°C, respectivamente. Sob estas condições, os tempos de retenção do cetoconazol e do padrão interno foram 2,0 e 4,0 minutos, respectivamente.

Os padrões foram preparados com plasma e brancos de tecido em concentrações de 0,01 a 10 μg /ml ou g e a quantificação foi realizada computando as relações das áreas dos picos dos padrões e das amostras. O limite de detecção foi 0,01 $\mu\text{g/g}$ de tecido. Este método é aplicado em estudos farmacocinéticos (Heykants et al, 1982).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

ALTON et.al. (1980) padronizaram um método rápido e seletivo utilizando CLAE. Após uma trabalhosa extração do plasma, o fármaco é separado através de CLAE utilizando coluna de μ Bonda-pak/CN em fase reversa e fase móvel tampão pH-6-acetonitrila (65:35 v/v) com detecção através luz UV, a 205nm. Esse método é recomendado para estudos farmacocinéticos.

WOESTENBORGHS et.al. (1980) também determinaram o cetoconazol em amostras de plasma humano. Após extração com uma mistura de álcool e álcool isoamílico, o fármaco é separado em uma coluna (15 cm x 2,1 mm ID) de Chromosorb LC-7, em fase reversa. As amostras foram diluídas com uma mistura de água-acetonitrila-dietilamina (40:60:0,05) à uma velocidade de fluxo constante de 0,50mL/min em cromatógrafo Hewlett-Packard, HPLC

1084B e detecção ultravioleta a 254nm. O padrão interno utilizado foi o terconazol e o limite de detecção no plasma foi de 2µg/mL.

GINSBURG et.al. (1983) estudaram a farmacocinética do cetoconazol em pediatria, usando cromatógrafo líquido Waters, equipado com uma bomba de alta pressão (M- 45) e detector de comprimento de onda variável (H 1450) fixado a 206nm. A separação foi alcançada com coluna de fase reversa de Hypersil-ODS. A fase móvel foi uma mistura de 60% de acetonitrila e 40% de tampão Sorensen 0,1M (pH 6,6). Os padrões foram preparados em acetonitrila. O cetoconazol apresentou um tempo de retenção de 5,75 minutos e não houve interferência de outros análogos.

Em 1989, AL-MESHAL propôs um método para a determinação de cetoconazol em plasma e comprimidos. A separação do fármaco do plasma foi obtida por extração com acetonitrila. A leitura das amostras foi realizada a 242nm, empregando benzafitrato como padrão interno.

KEDOR et.al. (1994) padronizaram um método para determinação de cetoconazol em cremes e comprimidos. Neste método o fármaco é previamente solubilizado em ácido clorídrico 0,1M, utilizando como padrão interno o terconazol e detecção a 225nm.

Método espectrofluorométrico:

MACHMER (1985) estudou a espectrofluorometria para dosar o cetoconazol em comprimidos. As intensidades de fluorescência das soluções amostras e padrão foram determinadas usando como comprimentos de onda de excitação 275nm e de emissão 385nm, utilizando-se como solvente e branco uma solução de ácido clorídrico 0,1N. A fonte de radiação foi calibrada previamente a 75–85% com solução 0,5ppm de sulfato de quinino.

2.4.11.3. Princípios básicos da Fluorimetria

A Fluorometria é uma técnica analítica baseada na fluorescência molecular. As substâncias fluorescentes têm a propriedade de absorver radiação na região ultravioleta e visível, promovendo a excitação de moléculas que, após processo preliminar de desativação vibracional através de colisões, retornam ao estado fundamental, emitindo radiação de comprimento de onda maior (fluorescente) que a radiação inicialmente absorvida (excitadora) (Guilbault, 1978; Ohlweiler, 1976; Willard et.al., 1988).

Uma espécie molecular fluorescente apresenta 2 espectros característicos: o espectro de excitação e o espectro de emissão ou de fluorescência. O espectro de excitação representa a eficiência relativa da fluorescência (medida em um máximo de fluorescência). O espectro de emissão representa as potências relativas de fluorescência para os diferentes comprimentos de onda (excitação com comprimento de onda fixo). Os 2 espectros se relacionam um com o outro aproximadamente à maneira de uma imagem especular, pois a excitação requer uma quantidade de energia eletrônica mais um aumento de energia vibracional, enquanto que a desativação devolve a energia eletrônica de excitação menos o incremento de energia vibracional. O espectro de fluorescência se situa em uma região de comprimentos de onda maiores em virtude das perdas de energia vibracional por colisões no estado eletrônico excitado (Guilbault, 1978; Ohlweiler, 1976; Willard et.al., 1988).

As substâncias que exibem mais intensa fluorescência são encontradas entre os compostos contendo grupos funcionais aromáticos. Compostos com estruturas carbonílicas alifáticas e alicíclicas e compostos com longas estruturas de ligações duplas, também podem ser fluorescentes, mas em número menor no caso de sistemas aromáticos. Os substituintes

podem afetar grandemente a fluorescência; assim o benzeno emite fluorescência de 270-310nm, ao passo que, dentre seus derivados, a anilina fluoresce a 310-401nm e o nitrobenzeno não é fluorescente. Experimentalmente, observou-se que a fluorescência é favorecida pelas estruturas rígidas (Guilbault, 1978; Ohlweiler, 1976; Willard et.al., 1988).

2.4.11.3.1. Instrumentos utilizados para medir a fluorescência

São genericamente denominados fluorômetros. Dividem-se em fluorômetros de filtro e espectrofluorômetros, conforme empreguem sistemas à base de filtros ou monocromadores para isolar a radiação excitadora desejada e a radiação fluorescente emitida. Os fluorômetros podem ser construídos como modelos de feixe simples ou duplo. Possuem lâmpadas de arco de mercúrio e de xenônio. A vantagem da lâmpada de xenônio é produzir um espectro contínuo com suficiente intensidade para qualquer comprimento de onda em sua faixa de operação.

Os espectrofluorômetros são constituídos à base de monocromadores. Os verdadeiros espectrofluorômetros são equipados com 2 monocromadores; um limita a radiação excitadora à uma estreita faixa e o outro permite isolar uma estreita faixa da radiação fluorescente (Guilbault, 1978; Ohlweiler, 1976; Willard et.al., 1988).

3. OBJETIVOS

- * Preparo de cremes O/A contendo promotores de permeação;

- * Padronização de metodologia analítica baseada na fluorimetria para quantificar o cetoconazol nas formulações e nos ensaios de liberação/permeação;

- * Avaliação da liberação e permeação do cetoconazol em membrana de celulose a partir de creme O/A;

- * Estudo da estabilidade do cetoconazol nos cremes O/A selecionados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Matérias primas, solventes e reagentes

- Cetoconazol (> 99,0%), matéria-prima de grau farmacêutico; procedência: EMS, lote 99064549;
- Cetoconazol (99,67%), substância química de referência; procedência: Chemo Ibérica S/A, lote: 8900215001;
- Polawax[®] (produto resultante da reação entre alcóois cetílico e estearílico com polioxietilenoglicóis), Croda;
- Propilenoglicol, grau farmacêutico, Galena;
- Mentol, grau farmacêutico, SP Farma;
- Álcool etílico, 95%, p.a., Merck;
- Butil-hidroxitolueno (B.H.T.), grau farmacêutico, Galena;
- Metabissulfito de sódio, grau farmacêutico, Synth;
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), grau farmacêutico, Galena;
- Germall II[®] (diazolidiniluréia), Mapric;
- Metilparabeno, grau farmacêutico, Galena;
- Propilparabeno, grau farmacêutico, Galena;
- Chemynol I[®] (imidazolidiniluréia), Chemyunion;
- Kathon[®] CG (metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona), Lonza;

- Ácido clorídrico, p. a., Synth;
- Sulfato de gentamicina, grau farmacêutico, Galena;
- Fosfato de potássio dibásico, p. a., Synth;
- Fosfato de potássio monobásico, p.a., Synth;
- Parafilm M[®], American National Can TM;
- Membrana sintética de acetato de celulose, Ref. D-9652 (espessura: 0,03mm);

4.1.2. Equipamentos e acessórios

- Células de Franz modificadas. Dimensões: 15mm de diâmetro, 80 mm de altura, capacidade de 12mL;
- Balança analítica Mettler, modelo H15, capacidade 160g;
- Balança Marte, modelo AS2000C, capacidade 0,5-2000g;
- Banho de água com termostato regulável para 37°C ou 56°C Fanem Ltda., modelo 102/4;
- Espectrofotômetro de fluorescência, Hitachi, modelo F-2000;
- Pipeta automática Finnpipette Digital, 1-5ml;
- Mixer, Walita, modelo RI 312;
- Banho de ultrassom Thorton, modelo T14;
- Viscosímetro Fungilab S.A., modelo Visco Star-R, hastes TR3, TR4 e TR5;
- Peagâmetro Digimed, modelo DM-20;
- Estufa Fanem Ltda., modelo 002CB;
- Refrigerador Prosdócimo - série Luxo, modelo 340.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo das formulações estudadas

Foram preparadas dez formulações, a partir da fórmula do creme básico, descrita a seguir, à qual foram incorporados 2g de cetoconazol e diferentes proporções de propilenoglicol e solução alcóolica de mentol, havendo a realização de ensaios de estabilidade preliminar. O Polawax[®], uma base autoemulsificante de caráter não-iônico, constitui a fase oleosa do creme base. Butil-hidroxitolueno e metabissulfito de sódio foram empregados com finalidade antioxidante, EDTA com finalidade quelante de metais, enquanto a solução Germal[®] II foi adicionada para atuar como conservante. Diferentes combinações foram estabelecidas e avaliadas quanto ao aspecto físico, valor de pH, viscosidade e teor, após exposição à temperatura ambiente (25 a 30°C), estufa (37°C) e geladeira (5°C).

4.2.1.1. Creme base

Polawax®	15,00g
Butil-hidroxitolueno (B.H.T.).....	0,10g
Metabissulfito de sódio	0,10g
EDTA.....	0,20g
Solução aquosa de Germall II® a 50% (p/p).....	0,50g
Propilenoglicol.....	q.s.
Solução alcóolica de mentol.....	q.s.
Água destiladaq.s.p.....	100,00g

4.2.1.2. Técnica de Preparação

Segue-se a técnica de preparo da emulsão, adotando a técnica de emulsão invertida.

Em um béquer de 250mL, foram colocados 0,1g de metabissulfito de sódio, 0,2g de EDTA e 84,1g de água destilada (fase aquosa). Em um recipiente de aço inox de 500mL de capacidade foram adicionados 15,0g de Polawax® e 0,1g de B.H.T. (fase oleosa). Os dois recipientes, contendo as misturas de substâncias, foram aquecidos a, aproximadamente, 65°C, havendo a formação de duas soluções lípidas. A fase aquosa foi adicionada à fase oleosa, sob vigorosa agitação com o auxílio de um *mixer*, havendo a formação da emulsão. Após o resfriamento da preparação a aproximadamente 25°C, adicionou-se, sob agitação, 0,5g de solução aquosa de Germall® a 50% (p/p) no próprio recipiente de aço inox.

À formulação base foram adicionados 2g de cetoconazol e diferentes quantidades de propilenoglicol e solução alcóolica de mentol, tendo sido obtidas nove (09) preparações, cuja composição está descrita no **Tabela 1**.

Tabela 1. Composição das emulsões estudadas. Todas as emulsões foram adicionadas de 2g de cetoconazol.

Formulação	Propilenoglicol (%)	Sol. alcóolica de mentol (%)	Creme base + Cetoconazol (%)
A	0	0	100
B	5	5	90
C	5	3	92
D	5	0	95
E	3	0	97
F	3	5	92
G	0	5	95
H	0	3	97
I	3	3	94
J	1	1	98

4.2.1.3. Descrição geral do preparo das formulações de A a J

Foi empregado o mesmo método de preparo que o da formulação, descrito no item 4.2.1.2. No entanto, a adição do propilenoglicol, solução alcóolica de mentol e cetoconazol, transcorreu da seguinte maneira:

- propilenoglicol:

O propilenoglicol foi adicionado no início da preparação, ou seja, faz parte da fase aquosa da formulação.

- solução alcóolica de mentol:

Previamente, preparou-se uma solução alcóolica de mentol (1:5 p/p). Foi adicionada à formulação, após o seu resfriamento de acordo com o **Tabela 1**.

- cetoconazol:

Foram pesados 2,0g e solubilizados em 5,0mL de solução de ácido clorídrico 0,3M e, em seguida, foram incorporados à todas as formulações, utilizando-se um almofariz com o auxílio de um pistilo.

4.2.2. Validação da metodologia analítica

Para quantificação do cetoconazol nas formulações estudadas e nos testes de liberação foi padronizado método fluorimétrico, baseado no descrito por MACHMER (1985).

O método foi validado, tendo sido definidos, em experimentos preliminares, os melhores comprimentos de onda de excitação e de emissão, tendo em vista respostas de melhor linearidade e maior intensidade.

4.2.2.1. Preparação das soluções

- Solução tampão:

Transferiram-se 13,6g de fosfato potássico dibásico e 4,0g de fosfato potássico monobásico para um balão volumétrico de 1000,0mL e dissolveram-se em quantidade suficiente de água destilada. Adicionaram-se 50,0mg de sulfato de gentamicina, dissolveram-se sob agitação e completou-se o volume com quantidade suficiente de água destilada. O pH foi ajustado para $7,0 \pm 0,2$, empregando ácido fosfórico ou hidróxido de sódio, quando necessário.

- Solução de ácido clorídrico 0,1M:

Transferiram-se, cuidadosamente, 8,5mL de ácido clorídrico concentrado para um balão volumétrico de 1000,0mL contendo aproximadamente 200mL de água destilada. Completou-se o volume com água destilada e homogeneizou-se.

- Soluções do padrão:

Foram pesados, exatamente, cerca de 50,0mg de cetoconazol, substância química de referência, e transferidos para um balão volumétrico de 50,0mL. Em seguida, o fármaco foi dissolvido em cerca de 10mL de solução de ácido clorídrico 0,1M e o volume completado com a mesma solução, obtendo-se uma solução padrão de concentração igual a 1,0mg/mL (solução Padrão S).

A solução Padrão S foi diluída com solução tampão obtendo-se soluções de cetoconazol nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 μ g/mL, de acordo com o **Tabela 2**.

Tabela 2. Diluições para obtenção das soluções padrões de cetoconazol de concentração entre 0,1 e 20,0 μ g/mL, a partir de solução padrão contendo 1,0mg/mL.

Soluções	1ª Diluição		2ª Diluição		Concentração final (μ g/mL)
	Volume de solução padrão S (mL)	Volume total após 1ª diluição com solução tampão (mL) (soluções padrão T)	Volume de soluções padrão T (mL)	Volume total após 2ª diluição com solução tampão (mL)	
P1	1,0	200,0	2,0	100,0	0,1
P2	2,0	200,0	2,0	100,0	0,2
P3	1,0	200,0	6,0	100,0	0,3
P4	2,0	200,0	5,0	100,0	0,5
P5	2,0	200,0	5,0	50,0	1,0
P6	2,0	200,0	5,0	25,0	2,0
P7	1,0	200,0	0,0	0,0	5,0
P8	2,0	200,0	0,0	0,0	10,0
P9	2,0	100,0	0,0	0,0	20,0

Solução padrão S = solução de cetoconazol contendo 1,0mg/mL em HCl 0,1M.

- Soluções do placebo:

Foram pesados, exatamente, cerca de 2,5g de formulação básica adicionada de 5g de propilenoglicol e 5g de solução alcóolica de mentol (Placebo da formulação B) e transferidos para um balão volumétrico de 50,0mL. Em seguida, adicionou-se uma quantidade suficiente de solução de ácido clorídrico 0,1M e o balão foi levado para o banho de ultrassom por dez minutos para homogeneização. O volume foi completado com mesmo solvente, obtendo-se a solução Placebo S, que foi filtrada em papel de filtro quantitativo e diluída com solução tampão, obtendo-se as soluções do placebo, conforme o **Tabela 3**.

Tabela 3. Diluições para obtenção das soluções placebo.

Soluções	1ª Diluição		2ª Diluição	
	Volume de solução placebo S (mL)	Volume total após 1ª diluição com solução tampão (mL) (soluções placebo T)	Volume de soluções placebo T (mL)	Volume total após 2ª diluição com solução tampão (mL)
Plac1	1,0	200,0	2,0	100,0
Plac2	2,0	200,0	2,0	100,0
Plac3	1,0	200,0	6,0	100,0
Plac4	2,0	200,0	5,0	100,0
Plac5	2,0	200,0	5,0	50,0
Plac6	2,0	200,0	5,0	25,0
Plac7	1,0	200,0	0,0	0,0
Plac8	2,0	200,0	0,0	0,0
Plac9	2,0	100,0	0,0	0,0

- Soluções placebo adicionadas de padrão:

As soluções placebo adicionadas de padrão (soluções PlacP) foram obtidas a partir da diluição das soluções Padrão S e Placebo S, conforme indicado no **Tabela 4**, obtendo soluções com concentração de cetoconazol variando de 0,1 a 20,0µg/mL.

Tabela 4. Diluições para obtenção das soluções mistura de placebo e cetoconazol de concentração entre 0,1 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$

Soluções	1ª Diluição			2ª Diluição		Concentração final de cetoconazol ($\mu\text{g/mL}$)
	Volume de solução Padrão S (mL)	Volume de solução Placebo S (mL)	Volume total após 1ª diluição com solução tampão (mL) (sol. PlacP S)	Volume das soluções PlacP S (mL)	Volume total após 2ª diluição com solução tampão (mL)	
PlacP1	1,0	1,0	200,0	2,0	100,0	0,1
PlacP2	2,0	2,0	200,0	2,0	100,0	0,2
PlacP3	1,0	1,0	200,0	6,0	100,0	0,3
PlacP4	2,0	2,0	200,0	5,0	100,0	0,5
PlacP5	2,0	2,0	200,0	5,0	50,0	1,0
PlacP6	2,0	2,0	200,0	5,0	25,0	2,0
PlacP7	1,0	1,0	200,0	0,0	0,0	5,0
PlacP8	2,0	2,0	200,0	0,0	0,0	10,0
PlacP9	2,0	2,0	100,0	0,0	0,0	20,0

4.2.2.2. Construção da reta de calibração

4.2.2.2.1. Condições da análise espectrofluorimétrica

Foram feitas as leituras espectrofluorimétricas das soluções do padrão em solução tampão nas concentrações de 0,1 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$, usando solução branco, empregando os seguintes parâmetros:

- comprimento de onda de excitação (λ_{Ex}) = 275nm;
- comprimento de onda de emissão (λ_{Em}) = 377nm;
- intervalo de varredura do espectro: 220-800nm;

- velocidade da varredura: 240nm/min;
- abertura da fenda: 10nm;
- lâmpada: Xe;
- solução branco (para acerto do “zero” no aparelho): solução tampão.

As soluções do padrão foram preparadas conforme item 4.2.2.1.

Para os cálculos, empregou-se o método dos mínimos quadrados, também denominado cálculo da linha de regressão de y (ordenada) em x (abscissa) (Consiglieri, 1992; Cornell, 1990).

4.2.2.3. Pesquisa de Interferentes (especificidade/seletividade)

Foram analisadas simultaneamente as soluções do padrão (de P1 a P9), as soluções do placebo (de Plac1 a Plac9) e as soluções do placebo adicionado de padrão (de PlacP1 a PlacP9), preparadas conforme o item 4.2.2.1.

As leituras de intensidade de fluorescência das soluções foram realizadas empregando as mesmas condições e parâmetros descritos em 4.2.2.2.1.

4.2.2.3.1. Cálculos das concentrações de cetoconazol nas amostras analisadas

$$C_A = \frac{F_A}{F_P} \times C_P \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

C_A = concentração de leitura das soluções das amostras

C_P = concentração de leitura das soluções do padrão

F_A = fluorescência apresentada pelas soluções das amostras

F_P = fluorescência apresentada pelas soluções dos padrões

$$C_P = m_p \times f_{\text{correção}} \times D_P \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

m_p = massa de padrão pesada

$f_{\text{correção}}$ = fator de correção (ou título) da substância química de referência

D_P = diluição das soluções do padrão

$$C_A = TE_A \times D_A \quad (\text{Equação 3})$$

onde:

TE_A = tomada de ensaio das amostras

D_A = diluição das soluções das amostras

4.2.2.4. Determinação dos limites de detecção e quantificação

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram determinados utilizando as soluções mistura do padrão e placebo de concentrações de 0,1 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ (PlacP1 a PlacP9), contra soluções do padrão (P1 a P9).

As soluções do padrão (de P1 a P9) e da mistura (PlacP1 a PlacP9) foram preparadas conforme item 4.2.1.1.

As leituras de intensidade de fluorescência das soluções foram realizadas empregando as mesmas condições e parâmetros descrito em 4.2.2.2.1.

Foram feitas três réplicas para cada amostra e foram calculadas, para cada concentração, a média, o desvio-padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV). Com esses dados, foram obtidos LD e LQ conforme as equações (USP 24^a ed., 1999):

$$LD = \frac{\text{Desvio Padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 3,3 \quad (\text{Equação 4})$$

$$LQ = \frac{\text{Desvio Padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 10 \quad (\text{Equação 5})$$

4.2.2.5. Determinação da Precisão e Exatidão

A precisão está relacionada com a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio, é expressa matematicamente pela porcentagem do coeficiente de variação (%CV), calculado pela seguinte fórmula (USP 24^a ed., 1999):

$$\%CV = (\text{desvio padrão} / \text{média}) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

A exatidão corresponde à variação entre o valor obtido após a análise e o valor real da amostra, e é calculada pela seguinte fórmula (USP 24^a ed., 1999):

$$E = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor real}} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Para tanto foram preparadas soluções padrão de cetoconazol nas concentrações de 0,2, 0,5 e 2,0µg/mL, conforme item 4.2.2.1., em 10 réplicas, tendo sido calculados o coeficiente de variação e a exatidão, em porcentagem.

As leituras de intensidade de fluorescência das soluções foram realizadas empregando as mesmas condições e parâmetros descrito em 4.2.2.2.1.

A precisão foi avaliada em ensaio intra-dia e inter-dias.

4.2.3. Testes de liberação

4.2.3.1. Planejamento estatístico

Foi empregado planejamento estatístico experimental para mistura usando as restrições impostas pela formulação (Cornell, 1990). O planejamento foi obtido com o programa Design Expert 5.0 e está apresentado na **Tabela 5**.

Tabela 5. Planejamento estatístico para os testes de liberação do cetoconazol.

Testes de liberação	Formulação estudada	Fator A: propilenoglicol (%)	Fator B: solução alcóolica de mentol (%)	Fator C: creme base + cetoconazol (%)
1	J	1	1	98
2	B	5	5	90
3	B	5	5	90
4	H	0	3	97
5	D	5	0	95
6	I	3	3	94
7	E	3	0	97
8	F	3	5	92
9	G	0	5	95
10	G	0	5	95
11	A	0	0	100
12	A	0	0	100
13	C	5	3	92
14	D	5	0	95

4.2.3.2. *Preparo da membrana de celulose*

A membrana de acetato de celulose permaneceu imersa em solução tampão por, pelo menos, 4 horas, sendo que a solução de lavagem foi substituída totalmente na segunda hora.

4.2.3.3. *Ensaio*

Círculos da membrana de, aproximadamente, 1,5cm de diâmetro, foram devidamente colocados em 3 células de Franz modificadas (células de difusão e/ou liberação) entre dois anéis de silicone e presos com pinças separando os compartimentos doador e receptor. Em seguida, foram colocados 12,0mL de fluido receptor, solução tampão. As células preparadas foram colocadas em banho de água termostaticado mantido à temperatura de 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$),

sob agitação, durante um período de 12 horas, sendo as extremidades vedadas com Parafilm M[®].

Após esse período, a solução receptora foi desprezada e colocou-se uma nova quantidade da mesma no compartimento receptor de cada célula, equivalente a 12,0mL. Na seqüência, foi aplicado, aproximadamente, 1,0g de cada formulação testada contendo cetoconazol sobre a membrana de duas células e a mesma quantidade da formulação placebo correspondente (formulação com todos os componentes exceto cetoconazol) na terceira célula, desempenhando o papel de controle. Nesse momento, considerado como tempo zero (T=0), o volume de cada célula foi esgotado, ou seja, foram retirados os 12,0 mL, previamente colocados. Uma nova quantidade de fluido receptor, igual a 12,0mL, foi colocada em cada célula, sendo que apenas as extremidades dos compartimentos receptores das células foram vedadas com Parafilm M[®].

Em intervalos pré-estabelecidos de 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 8,00; 10,00; 12,00; 24,00; 25,00 e 26,00 horas o procedimento descrito acima foi repetido. Estas amostras foram congeladas a -4° C para posterior análise espectrofluorimétrica.

4.2.3.4. Quantificação do cetoconazol nos testes de liberação

As amostras foram descongeladas e analisadas diretamente em espectrofotômetro de fluorescência, sob os parâmetros descritos em 4.2.2.2.1., em intervalo de tempo não superior a três dias, a partir do ensaio.

4.2.3.5. Cálculo dos parâmetros de difusão

Os valores dos parâmetros abaixo descritos foram calculados como média de duas réplicas para cada experimento, onde cada um era constituído por duas células contendo a formulação e uma célula que tinha a função controle.

O método utilizado para analisar os dados dos experimentos foi o método do *Lag Time* (Barry, 1983; Shah, 1993). Dessa maneira, determinou-se:

- Fluxo (J):

$$\mathbf{J \text{ (}\mu\text{g / cm}^2 \text{ x h)} = \text{coeficiente angular da equação da reta do gráfico} \quad (\text{Equação 8})$$

- Coeficiente de permeabilidade (P):

$$\mathbf{P \text{ (cm / h)} = \frac{J}{C}} \quad (\text{Equação 9})$$

onde: C = concentração do fármaco no compartimento doador da célula de difusão

- Tempo de latência (T_{lag}):

$$\mathbf{T_{lag} \text{ (h)} = \frac{-b}{a}} \quad (\text{Equação 10})$$

onde: b = coeficiente linear

a = coeficiente angular

- Coeficiente de difusão (D):

$$\mathbf{D \text{ (cm}^2 \text{ / h)} = \frac{e^2}{6 T_{lag}}} \quad (\text{Equação 11})$$

onde: e = espessura da membrana

- Coeficiente de partição (K):

$$\mathbf{K = e \times \frac{P}{D}} \quad (\text{Equação 12})$$

4.2.4 Determinações físico-químicas das formulações estudadas

4.2.4.1. Amostras

Foram estudadas as formulações de A a J, cujo preparo está descrito em 4.2.1.2. e 4.2.1.3. Quantidades suficientes de cada formulação foram preparadas, com e sem o fármaco. Foram avaliados: aspecto físico, valor de pH, viscosidade e teor, após exposição à temperatura ambiente (25 a 30°C), estufa (37°C) e geladeira (5°C). Essas determinações foram realizadas no dia da preparação (T₀), após uma semana (T₁), após 15 dias (T₂) e após 30 dias (T₃).

4.2.4.2. Determinação do pH

A determinação do pH das formulações estudadas foi realizada em peagâmetro, após diluição dos produtos em água destilada recém destilada e neutralizada na proporção 1:10 (Prista, 1981). Essas determinações foram realizadas à temperatura ambiente segundo parâmetros descritos em 4.2.4.1.

4.2.4.3. Determinação da viscosidade (η)

A viscosidade (η) foi determinada em viscosímetro, empregando cerca de 5g de cada formulação estudada. A agulha adequada foi mergulhada no cilindro que continha a amostra e ajustada à uma velocidade adequada. Após, aproximadamente, 30 segundos, o aparelho

forneceu a leitura de viscosidade (η), expressa em cPoise (cP). Essas determinações foram realizadas à temperatura ambiente segundo parâmetros descritos em 4.2.4.1.

4.2.4.4. Determinação do teor

Foram pesados, exatamente, cerca de 2,5g de cada preparação contendo cetoconazol (Formulações A a J) e transferidos para um balão volumétrico de 200,0mL. Adicionou-se quantidade suficiente de ácido clorídrico 0,1M, homogeneizou-se e completou-se o volume com solução de ácido clorídrico 0,1M. Em seguida, uma alíquota de 2,0mL foi transferida para balão volumétrico de 50,0mL, e o volume foi completado com solução tampão. Em seguida, as amostras foram analisadas diretamente em espectrofotômetro de fluorescência, sob os parâmetros estabelecidos em 4.2.2.2.1. Essas determinações foram realizadas à temperatura ambiente segundo parâmetros descritos em 4.2.4.1. O teor de cetoconazol em cada formulação foi calculado conforme descrito em 4.2.2.3.1.

5. RESULTADOS

5.1. Validação da metodologia analítica

5.1.1. Construção da reta de calibração

A reta de calibração está representada na **Figura 14**. A equação de reta obtida, passando pela origem (teste *t*, não significativo para interseção da reta), foi $y = 156,5x$ e o coeficiente de correlação (r^2) 0,9995. A **Tabela 6** apresenta os valores experimentais obtidos na construção da mesma.

Tabela 6. Resultados experimentais utilizados na construção da reta de calibração do cetoconazol para o método espectrofluorimétrico.

Concentração da solução padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Intensidade de Fluorescência
0,1	10,750
0,2	28,703
0,3	44,509
0,5	73,520
1,0	140,527
2,0	300,713
5,0	720,208
10,0	1571,664
20,0	3144,456

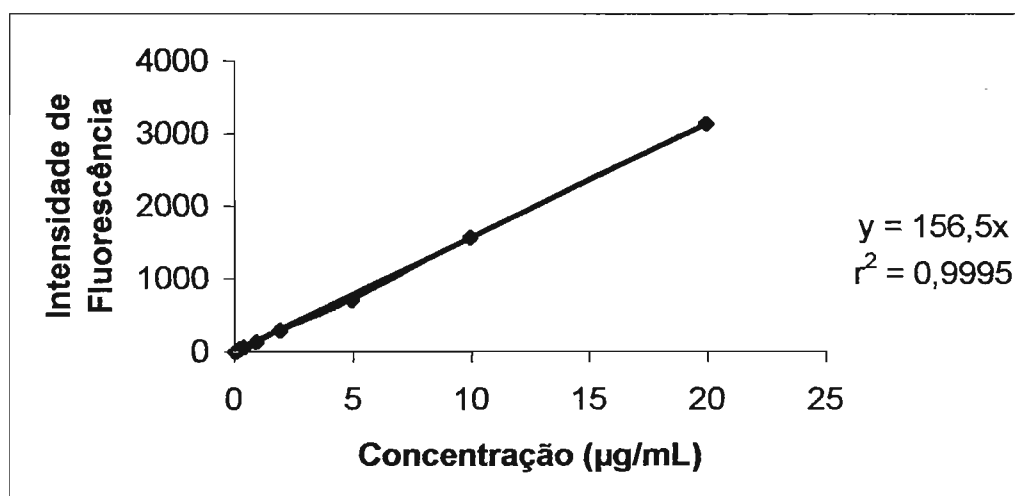


Figura 14. Retas de calibração obtidas a partir da medida de intensidade de fluorescência de soluções padrão de cetozonazol com concentrações variando de 0,1 a 20,0 µg/mL em solução tampão fosfato pH 7,0, considerando $\lambda_{\text{Ex}} = 275\text{nm}$ e $\lambda_{\text{Em}} = 377\text{nm}$. Tampão fosfato pH 7,0 foi empregado como branco.

5.1.2. Pesquisa de interferentes (especificidade/seletividade)

A **Tabela 7** mostra os valores de intensidade de fluorescência referente às soluções padrão de cetozonazol (P1 a P9), placebo (Plac1 a Plac9) e mistura (PlacP1 a PlacP9).

Tabela 7. Pesquisa de interferentes do método espectrofluorimétrico.

Concentração das soluções (µg/mL)	Intensidade de Fluorescência das soluções do padrão	Intensidade de Fluorescência das soluções do placebo	Intensidade de Fluorescência das soluções da mistura
0,1	10,750	0,010	10,915
0,2	28,703	0,009	28,901
0,3	44,509	0,001	44,610
0,5	73,520	0,004	73,232
1,0	140,527	0,000	140,777
2,0	300,713	0,000	296,022
5,0	720,208	0,004	735,440
10,0	1571,664	0,000	1610,123
20,0	3144,456	0,014	3222,119

5.1.3. Determinação dos limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o método espectrofluorimétrico foram calculados conforme indicadas em 4.2.2.4., obtendo-se os seguintes valores: LD = 0,003µg/mL e LQ = 0,01µg/mL

Os dados obtidos para a realização dos cálculos são mostrados na **Tabela 8.**

Tabela 8. Concentrações de cetoconazol ($\mu\text{g/mL}$) calculadas a partir das soluções PlacP1 a PlacP9, empregando método espectrofluorimétrico.

Cada amostra foi quantificada em triplicata e foram calculados a média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação e o desvio padrão médio (DPM).

Número do teste	0,1 $\mu\text{g/mL}$	0,2 $\mu\text{g/mL}$	0,3 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$	1,0 $\mu\text{g/mL}$	2,0 $\mu\text{g/mL}$	5,0 $\mu\text{g/mL}$	10,0 $\mu\text{g/mL}$	20,0 $\mu\text{g/mL}$
1	0,10	0,19	0,29	0,48	1,04	1,85	5,50	9,74	19,25
2	0,10	0,20	0,29	0,51	0,98	1,87	5,39	10,57	20,66
3	0,10	0,19	0,29	0,50	1,00	1,99	5,00	9,99	19,99
Média	0,10	0,19	0,29	0,50	1,01	1,90	5,30	10,10	19,97
D.P.	0,0000	0,0058	0,0000	0,0153	0,0306	0,0757	0,2627	0,4258	0,7053

DPM = 0,1690 / Inclinação da reta = 155,76.

5.1.4. Determinação da precisão e exatidão

A precisão do método para amostras analisadas no mesmo dia foi de 0,96% (0,2 $\mu\text{g/mL}$), 2,19% (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e 0,26% (2,0 $\mu\text{g/mL}$), como mostrado na **Tabela 9**. Já para amostras analisadas em dias diferentes foi 1,31% (0,2 $\mu\text{g/mL}$), 1,71% (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e 0,26% (2,0 $\mu\text{g/mL}$), como mostrado na **Tabela 10**.

Quanto à exatidão, a porcentagem de recuperação de cetoconazol nas amostras de creme base adicionadas de cetoconazol (PlacPn), variou de 98,44 a 102,47% (**Tabela11**).

Tabela 9. Precisão intra-dia do método espectrofluorimétrico.

Análise	Teor de cetoconazol (%)		
	0,2µg/mL	0,5µg/mL	2,0µg/mL
1	99,45	99,41	99,81
2	98,74	95,99	99,51
3	100,81	98,52	99,96
4	100,76	99,55	100,10
5	99,33	99,70	100,13
6	98,57	97,23	100,22
7	101,49	99,86	100,46
8	100,15	101,69	99,90
9	99,94	101,87	100,16
10	100,71	103,31	100,04
Média	100,00	99,71	100,03
D.P.	0,96	2,19	0,26
C.V.(%)	0,96	2,19	0,26

D.P. = desvio padrão; C.V. = coeficiente de variação.

Tabela 10. Precisão inter-dias do método espectrofluorimétrico.

Análise	Teor de cetoconazol (%)		
	0,2µg/mL	0,5µg/mL	2,0µg/mL
1	100,20	98,98	99,94
2	99,29	99,22	99,48
3	101,34	98,46	99,88
4	101,20	99,42	100,04
5	99,07	99,42	99,96
6	97,78	97,47	100,16
7	102,31	99,52	100,43
8	100,18	101,44	99,72
9	100,73	101,08	100,19
10	101,06	103,44	99,98
Média	100,32	99,84	99,98
D.P.	1,32	1,70	0,26
C.V.(%)	1,31	1,71	0,26

D.P. = desvio padrão; C.V. = coeficiente de variação.

Tabela 11. Exatidão do método analítico para quantificação do cetoconazol.

Concentração das soluções ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperação
0,1	101,53
0,2	100,69
0,3	100,23
0,5	99,61
1,0	100,18
2,0	98,44
5,0	102,11
10,0	102,45
20,0	102,47

5.2. Testes de liberação

5.2.1. Quantificação do cetoconazol nos testes de liberação

A partir de valores de intensidade de fluorescência obtidos das amostras retiradas das células de Franz modificadas, a cada intervalo de tempo, foram feitos cálculos para obtenção da quantidade liberada de cetoconazol, conforme descrito em 4.2.2.2.1. Os resultados são apresentados nas **Tabelas de 12 a 25**.

Tabela 12. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 1, empregando a formulação J.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	3,83	4,38
0,50	4,24	4,17
0,75	3,41	3,33
1,00	2,80	2,86
1,50	4,33	4,83
2,00	3,93	4,68
2,50	4,29	4,22
3,00	4,17	4,38
4,00	7,76	7,58
5,00	6,31	6,67
6,00	5,53	6,03
8,00	9,10	10,08
10,00	8,96	7,77
12,00	7,25	7,33
24,00	25,50	25,18
25,00	6,10	5,93
26,00	3,36	2,93

A quantidade liberada média acumulada foi de 111,62 μg após 26 horas.

Tabela 13. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 2, empregando a formulação B.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	2,96	2,56
0,50	1,67	1,45
0,75	1,46	1,92
1,00	1,13	1,12
1,50	3,16	2,92
2,00	3,20	2,89
2,50	3,36	2,90
3,00	2,60	3,00
4,00	4,70	5,20
5,00	4,88	4,49
6,00	4,62	3,44
8,00	7,27	6,69
10,00	6,06	6,86
12,00	5,80	6,28
24,00	24,57	23,91
25,00	4,30	4,61
26,00	4,25	2,66

A quantidade liberada média acumulada foi de 84,44 μg após 26 horas.

Tabela 14. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 3, empregando a formulação B.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	2,80	2,95
0,50	1,51	1,42
0,75	1,52	1,03
1,00	1,08	1,24
1,50	2,37	2,46
2,00	3,20	2,97
2,50	3,07	2,56
3,00	2,65	2,99
4,00	4,76	4,88
5,00	5,14	4,31
6,00	4,43	4,57
8,00	6,67	7,21
10,00	6,22	6,15
12,00	6,48	6,59
24,00	25,14	24,84
25,00	3,59	3,64
26,00	2,49	4,30

A quantidade liberada média acumulada foi de $83,63\mu\text{g}$ após 26 horas.

Tabela 15. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 4, empregando a formulação H.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	1,48	1,23
0,50	2,39	1,68
0,75	3,27	3,41
1,00	1,94	1,61
1,50	3,99	3,52
2,00	4,39	3,63
2,50	3,74	4,07
3,00	3,07	2,81
4,00	5,77	5,96
5,00	5,82	6,16
6,00	5,70	5,91
8,00	9,20	8,94
10,00	8,24	7,64
12,00	6,68	6,93
24,00	29,95	27,86
25,00	4,25	4,07
26,00	2,75	2,56

A quantidade liberada média acumulada foi de 98,82 μg após 26 horas.

Tabela 16. Quantidades de cetoconazol liberada (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 5, empregando a formulação D.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	2,52	2,72
0,50	1,55	1,24
0,75	1,82	1,49
1,00	2,44	2,88
1,50	2,97	3,48
2,00	3,30	3,34
2,50	5,36	4,98
3,00	2,23	3,11
4,00	5,75	6,59
5,00	5,08	5,37
6,00	6,15	6,28
8,00	5,77	5,52
10,00	6,44	6,79
12,00	5,35	5,00
24,00	21,14	21,42
25,00	3,35	3,67
26,00	2,06	2,45

A quantidade liberada média acumulada foi de 84,81 μg após 26 horas.

Tabela 17. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 6, empregando a formulação I.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	2,36	1,82
0,50	2,14	1,76
0,75	1,75	1,82
1,00	1,92	1,48
1,50	3,21	3,02
2,00	3,18	3,14
2,50	3,46	3,24
3,00	3,17	2,47
4,00	4,96	3,90
5,00	5,08	4,40
6,00	4,28	3,55
8,00	7,12	6,36
10,00	6,31	5,83
12,00	6,25	5,80
24,00	23,25	22,48
25,00	2,59	2,55
26,00	2,29	2,05

A quantidade liberada média acumulada foi de 79,49 μg após 26 horas.

Tabela 18. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 7, empregando a formulação E.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	1,89	1,68
0,50	1,58	1,55
0,75	1,74	1,53
1,00	0,92	1,30
1,50	3,58	4,23
2,00	2,62	2,67
2,50	2,79	3,53
3,00	2,83	2,07
4,00	5,50	6,13
5,00	5,53	6,12
6,00	4,69	5,48
8,00	9,36	9,36
10,00	8,54	8,98
12,00	7,50	7,18
24,00	30,49	31,11
25,00	3,94	3,96
26,00	3,15	2,80

A quantidade liberada média acumulada foi de 98,18 μg após 26 horas.

Tabela 19. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 8, empregando a formulação F.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	1,84	2,38
0,50	2,46	1,42
0,75	2,44	2,48
1,00	1,22	1,30
1,50	2,97	3,45
2,00	2,96	3,20
2,50	3,96	3,49
3,00	3,11	2,59
4,00	7,60	6,77
5,00	5,42	5,20
6,00	7,11	6,75
8,00	9,54	9,88
10,00	9,82	8,39
12,00	7,45	7,78
24,00	27,42	28,72
25,00	4,21	3,46
26,00	2,92	3,93

A quantidade liberada média acumulada foi de 101,82 μg após 26 horas.

Tabela 20. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 9, empregando a formulação G.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	2,42	2,09
0,50	1,76	1,45
0,75	1,70	1,44
1,00	2,11	2,24
1,50	4,67	5,06
2,00	3,87	4,34
2,50	4,59	3,83
3,00	3,13	2,41
4,00	6,29	6,69
5,00	5,44	5,28
6,00	5,83	5,57
8,00	8,34	7,93
10,00	8,96	8,75
12,00	9,28	8,43
24,00	29,26	29,19
25,00	4,77	4,43
26,00	3,50	3,22

A quantidade liberada média acumulada foi de 104,13 μg após 26 horas.

Tabela 21. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 10, empregando a formulação G.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	2,98	3,04
0,50	2,09	2,01
0,75	2,50	2,24
1,00	2,19	2,10
1,50	3,89	3,79
2,00	3,97	3,86
2,50	3,86	4,52
3,00	2,96	3,44
4,00	5,34	6,51
5,00	5,96	6,36
6,00	5,08	5,73
8,00	7,14	7,90
10,00	8,27	8,89
12,00	8,80	9,11
24,00	27,79	29,20
25,00	4,19	5,13
26,00	2,85	3,74

A quantidade liberada média acumulada foi de 103,72 μg após 26 horas.

Tabela 22. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 11, empregando a formulação A.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	1,60	1,62
0,50	1,41	1,77
0,75	1,38	1,85
1,00	1,07	1,47
1,50	3,33	3,64
2,00	4,11	3,48
2,50	2,69	3,19
3,00	2,68	2,80
4,00	5,35	6,14
5,00	5,59	5,88
6,00	6,13	4,72
8,00	9,88	9,35
10,00	9,93	9,51
12,00	8,52	8,71
24,00	32,64	33,01
25,00	4,69	4,72
26,00	2,76	3,21

A quantidade liberada média acumulada foi de 104,43 μg após 26 horas.

Tabela 23. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 12, empregando a formulação A.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	1,77	1,69
0,50	1,69	1,91
0,75	2,16	2,05
1,00	1,81	1,48
1,50	3,83	4,06
2,00	4,30	4,02
2,50	3,06	3,55
3,00	3,19	3,31
4,00	6,72	6,67
5,00	6,27	6,99
6,00	5,15	6,12
8,00	9,92	9,76
10,00	9,79	10,09
12,00	8,64	8,03
24,00	33,59	34,23
25,00	5,56	5,74
26,00	3,59	2,86

A quantidade liberada média acumulada foi de 111,80 μg após 26 horas.

Tabela 24. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 13, empregando a formulação C.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	4,42	3,67
0,50	3,92	3,81
0,75	3,14	3,69
1,00	2,90	3,54
1,50	6,04	5,69
2,00	5,13	4,69
2,50	5,23	4,77
3,00	5,63	4,97
4,00	7,76	7,72
5,00	8,61	7,86
6,00	7,99	7,32
8,00	12,90	11,98
10,00	11,17	10,36
12,00	11,98	11,71
24,00	38,45	38,99
25,00	7,14	6,60
26,00	4,42	4,77

A quantidade liberada média acumulada foi de 144,49 μg após 26 horas.

Tabela 25. Quantidades de cetoconazol liberadas (μg) em cada intervalo de tempo, no teste de liberação 14, empregando a formulação D.

TEMPO (h)	QUANTIDADE DE CETOCONAZOL LIBERADA (μg)	
	CÉLULA A	CÉLULA B
0	0	0
0,25	2,41	3,71
0,50	1,73	2,10
0,75	1,43	2,04
1,00	2,23	3,17
1,50	2,95	3,19
2,00	3,83	4,08
2,50	4,91	4,58
3,00	2,91	3,06
4,00	5,90	7,01
5,00	5,20	5,61
6,00	5,32	6,65
8,00	5,92	5,66
10,00	6,51	6,23
12,00	6,12	6,01
24,00	22,66	21,34
25,00	3,41	3,54
26,00	2,65	2,28

A quantidade liberada média acumulada foi de 88,19 μg após 26 horas.

5.2.2. Cálculo dos parâmetros de difusão

A relação entre os valores de quantidade liberada de cetoconazol / área e o tempo em que as amostras foram retiradas nos fornece um gráfico onde o coeficiente linear é o fluxo.

A seguir, estão, na forma de gráficos (**Figuras 15 a 28**), os valores médios de quantidade liberada de cetoconazol / área em função do tempo e os parâmetros de difusão tabelados para cada experimento realizado (**Tabelas 26 a 39**).

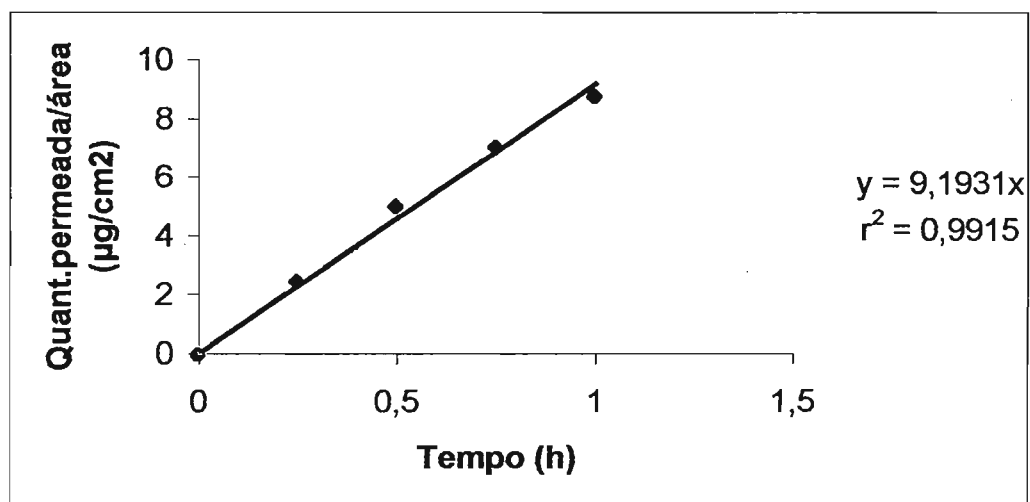
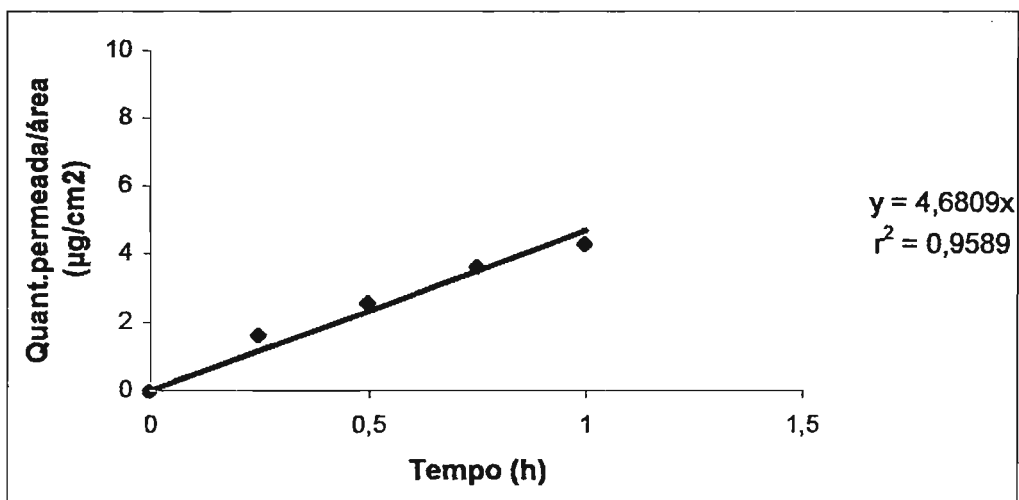


Figura 15. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 1 empregando a formulação J.

Tabela 26. Valores dos parâmetros de difusão do teste 1 empregando a formulação J.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	9,1931
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$4,60 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito



S

Figura 16. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 2 empregando a formulação B.

Tabela 27. Valores dos parâmetros de difusão do teste 2 empregando a formulação B.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	4,6809
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$2,34 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

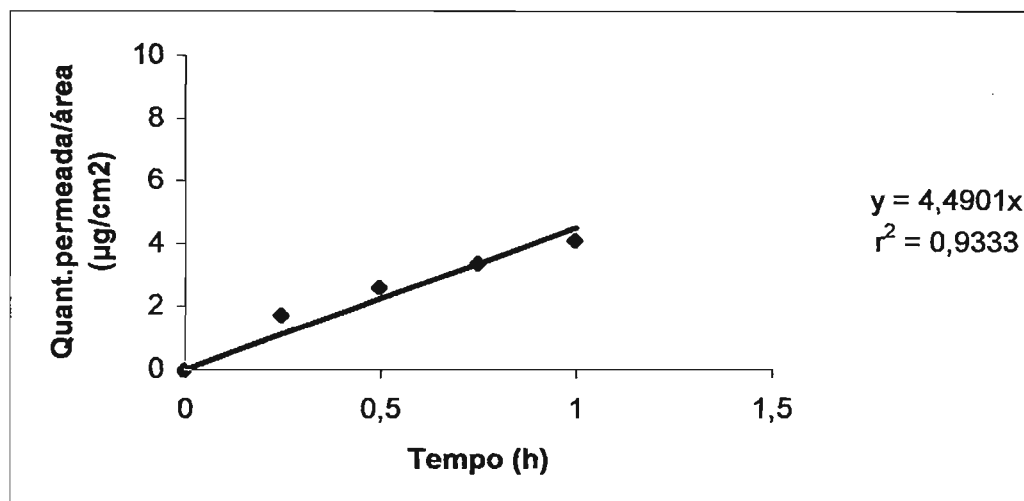


Figura 17. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 3 empregando a formulação B.

Tabela 28. Valores dos parâmetros de difusão do teste 3 empregando a formulação B.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	4,4901
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$2,24 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

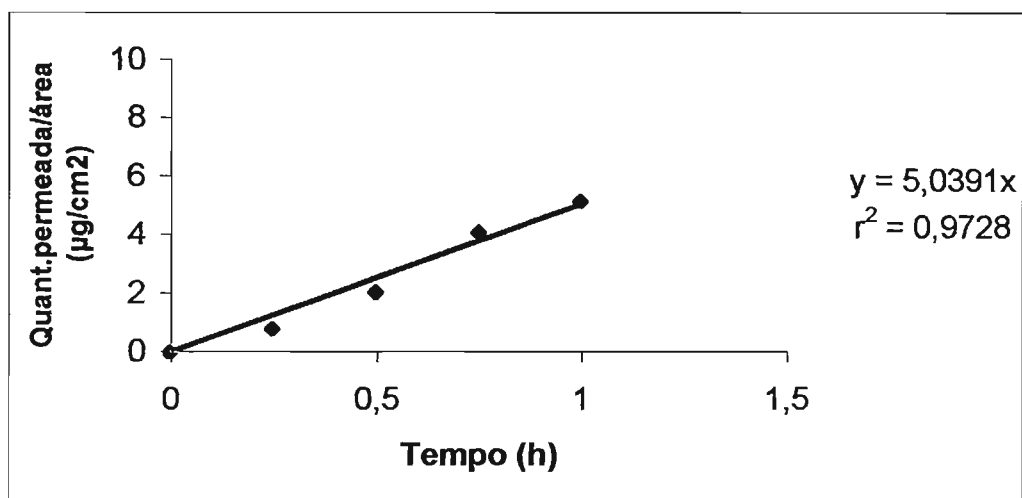


Figura 18. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 4 empregando a formulação H.

Tabela 29. Valores dos parâmetros de difusão do teste 4 empregando a formulação H.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	5,0391
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$2,52 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

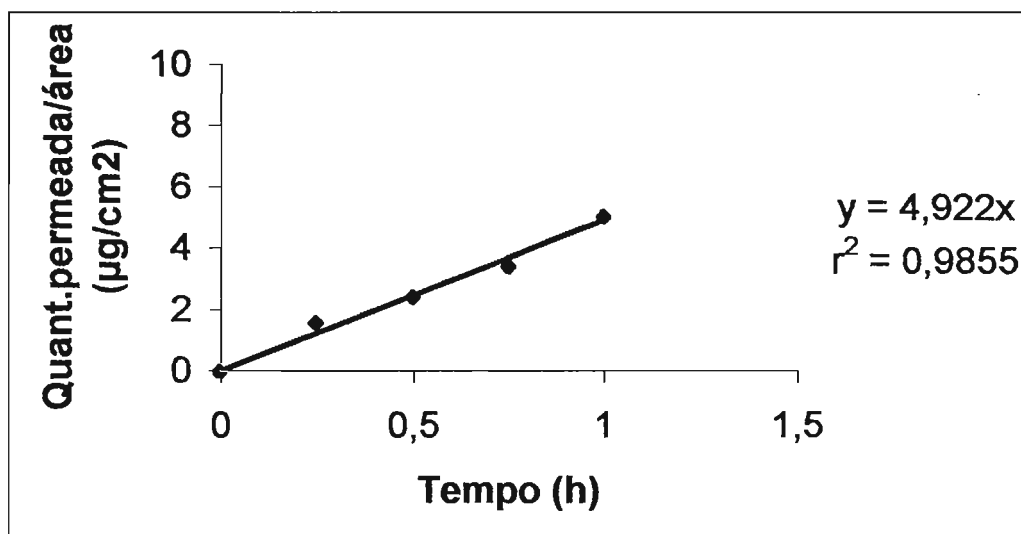


Figura 19. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 5 empregando a formulação D.

Tabela 30. Valores dos parâmetros de difusão do teste 5 empregando a formulação D.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	4,9220
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$2,46 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

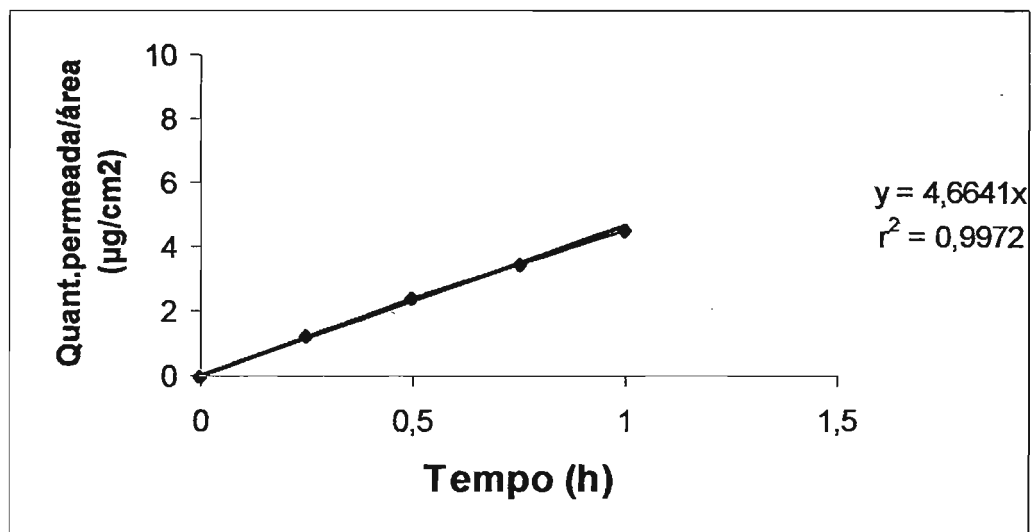


Figura 20. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 6 empregando a formulação I.

Tabela 31. Valores dos parâmetros de difusão do teste 6 empregando a formulação I.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	4,6641
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$2,33 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

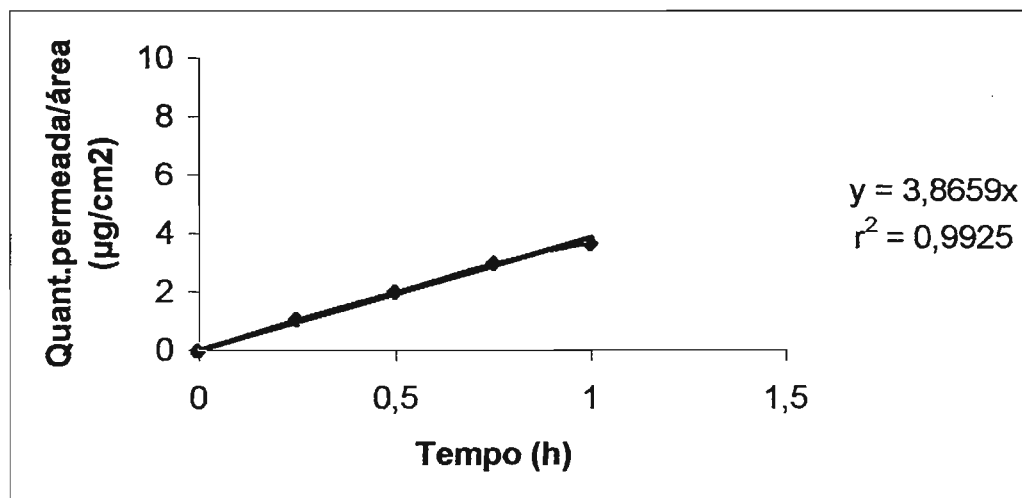


Figura 21. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 7 empregando a formulação E.

Tabela 32. Valores dos parâmetros de difusão do teste 7 empregando a formulação E.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	3,8659
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$1,93 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

5

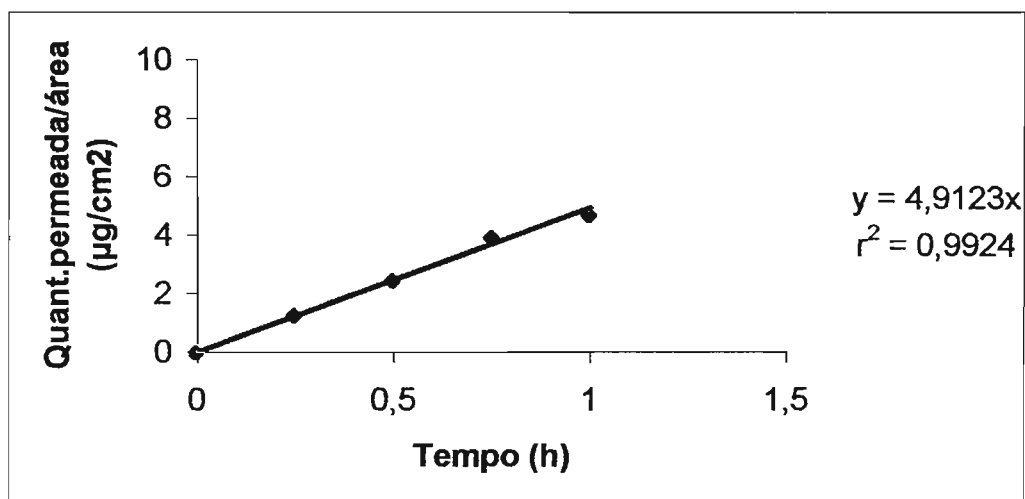


Figura 22. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 8 empregando a formulação F.

Tabela 33. Valores dos parâmetros de difusão do teste 8 empregando a formulação F.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	4,9123
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$2,46 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

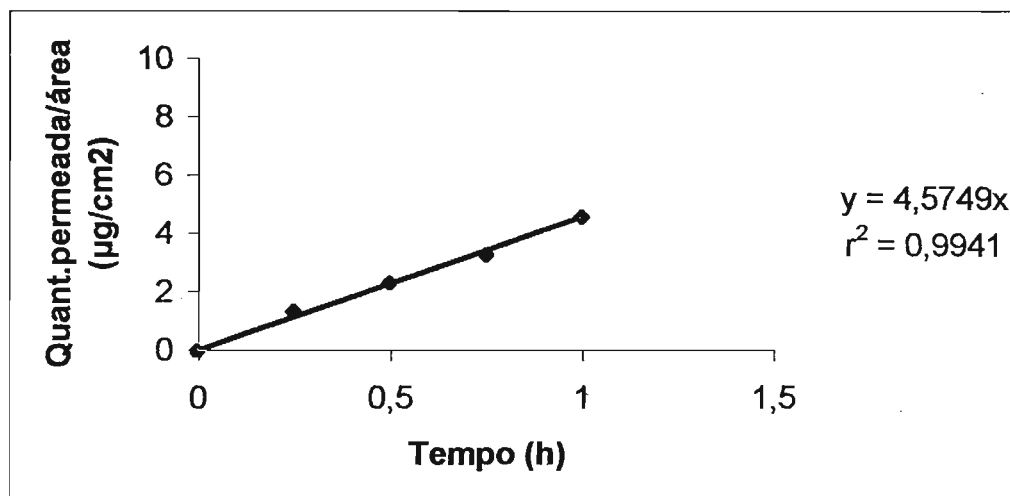


Figura 23. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 9 empregando a formulação G.

Tabela 34. Valores dos parâmetros de difusão do teste 9 empregando a formulação G.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	4,5749
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$2,29 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

G

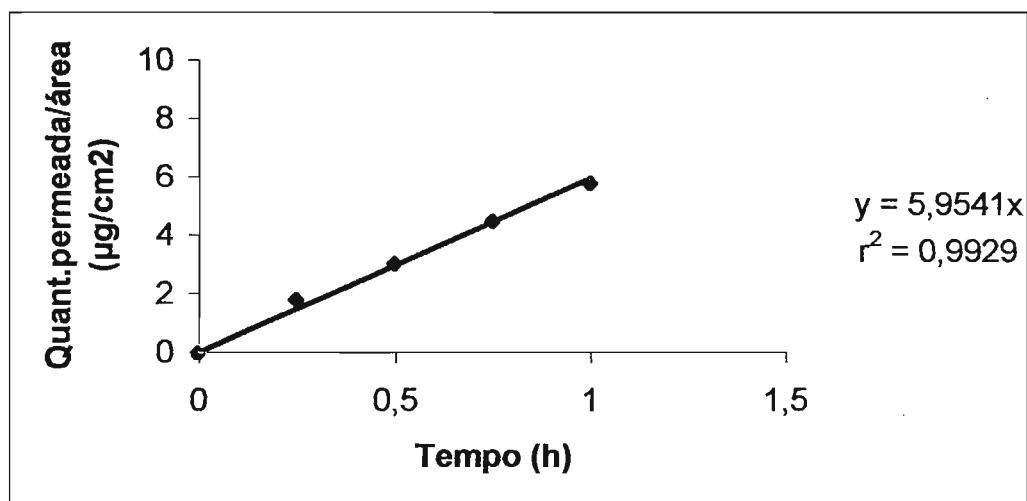


Figura 24. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 10 empregando a formulação G.

Tabela 35. Valores dos parâmetros de difusão do teste 10 empregando a formulação G.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	5,9541
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$2,98 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

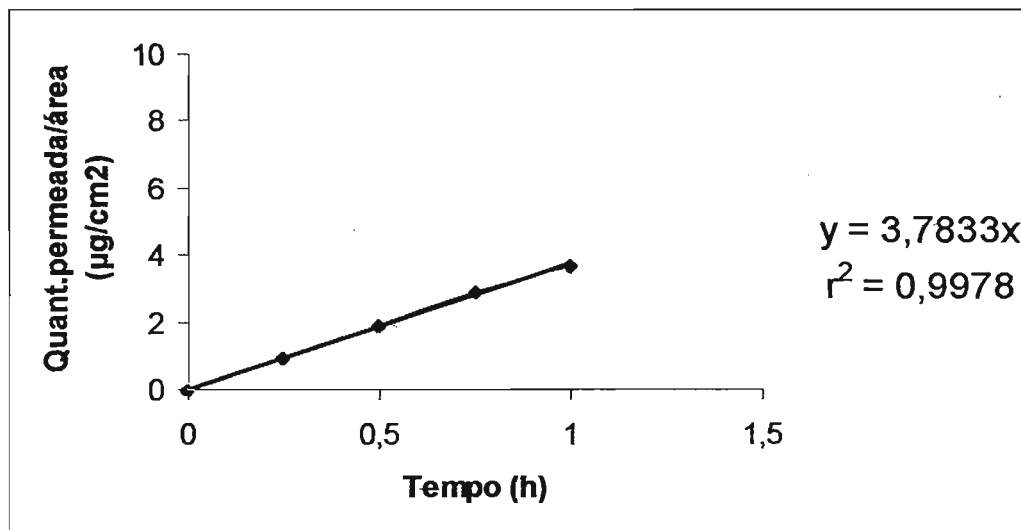


Figura 25. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 11 empregando a formulação A.

Tabela 36. Valores dos parâmetros de difusão do teste 11 empregando a formulação A.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	3,7833
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$1,89 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

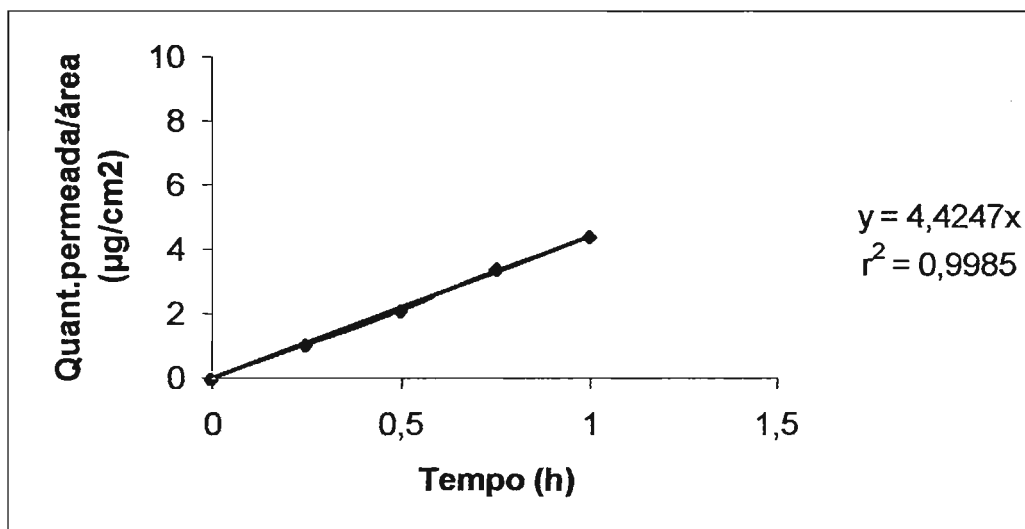


Figura 26. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 12 empregando a formulação A.

Tabela 37. Valores dos parâmetros de difusão do teste 12 empregando a formulação A.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	4,4247
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$2,21 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

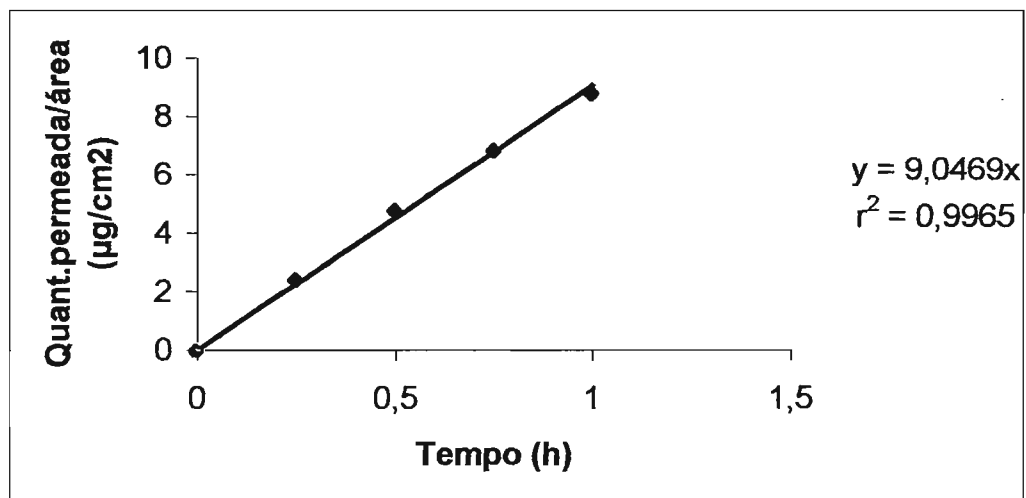


Figura 27. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 13 empregando a formulação C.

Tabela 38. Valores dos parâmetros de difusão do teste 13 empregando a formulação C.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	9,0469
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$4,52 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

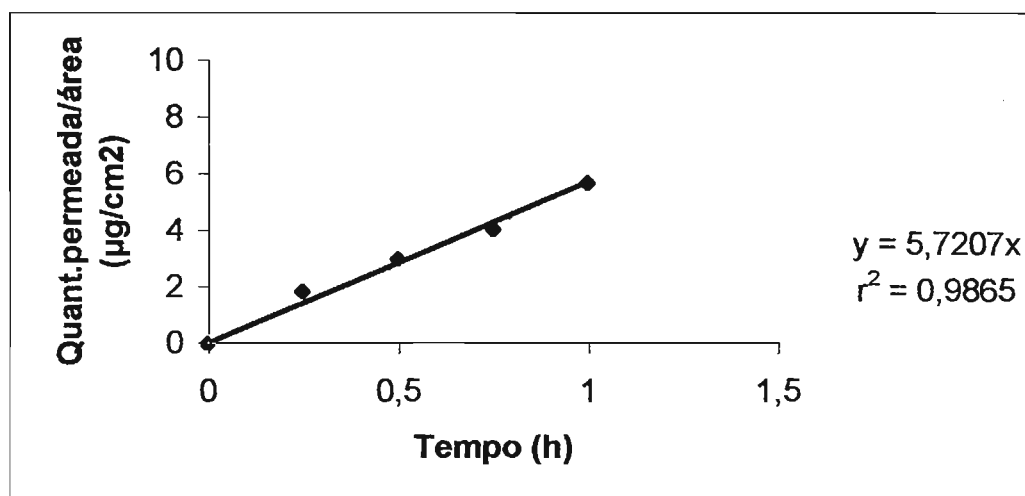


Figura 28. Gráfico das médias dos valores de quantidade de cetozonazol permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para o experimento 14 empregando a formulação D.

Tabela 39. Valores dos parâmetros de difusão do teste 14 empregando a formulação D.

Parâmetro	Valor
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$)	5,7207
C ($\mu\text{g}/\text{g}$)	20000
P (cm/h)	$2,86 \times 10^{-4}$
T_{lag} (h)	Tendendo a zero
e (cm)	0,03
D (cm^2/h)	Tendendo a infinito
K	Tendendo a infinito

5.2.3. Análise estatística

As respostas obtidas para o planejamento estatístico da **Tabela 5** do capítulo Material e Métodos foram o fluxo calculado na primeira hora de liberação/permeação e a viscosidade das formulações de A a J. Esses resultados estão na **Tabela 40**. Com os dados da **Tabela 40** foi realizada a análise estatística obtendo-se o modelo cúbico incompleto para o fluxo e o modelo quadrático para a viscosidade.

A análise estatística do modelo cúbico incompleto para fluxo está nas **Tabelas 41 e 42**.

Tabela 40. Resultados obtidos para as respostas do planejamento estatístico.

Teste de liberação	Formulação estudada	Fator A: propileno glicol	Fator B: Sol. alcóolica mentol	Fator C: Base + cetoconazol	Resposta: Fluxo após 1 hora	Resposta: viscosidade
1	J	1	1	98	9,1931	12600
2	B	5	5	90	4,6809	11200
3	B	5	5	90	4,4901	11200
4	H	0	3	97	5,0391	13700
5	D	5	0	95	4,922	16550
6	I	3	3	94	4,6641	13550
7	E	3	0	97	3,8659	12750
8	F	3	5	92	4,9123	13900
9	G	0	5	95	4,5749	12250
10	G	0	5	95	5,9541	12250
11	A	0	0	100	3,7833	9500
12	A	0	0	100	4,4247	9500
13	C	5	3	92	9,0469	17600
14	D	5	0	95	5,7207	16550

Tabela 41. Parâmetros da regressão para o modelo do fluxo (J).

G.L.= graus de liberdade

Componente	Coefficiente estimado	G.L.	Erro padrão	t para hipótese nula	Probabilidade
A-propilenoglicol	248,37	1	52,32	Não se aplica	Não se aplica
B-mentol	9,30	1	8,59	Não se aplica	Não se aplica
C-base	4,19	1	0,65	Não se aplica	Não se aplica
AB	-496,18	1	110,86	-4,48	0,0065
AC	-483,30	1	104,12	-4,64	0,0056
ABC	727,15	1	153,71	4,73	0,0052
AB(A-B)	-278,58	1	77,81	-3,58	0,0159
AC(A-C)	-326,99	1	69,91	-4,68	0,0054

Tabela 42. Análise de variância do modelo cúbico incompleto para o fluxo (J).

G.L.= graus de liberdade

Fonte de variação	Soma dos quadrados	G.L.	Quadrado médio	Razão F	Probabilidade
Modelo	32,97	8	4,12	4,91	0,0482
Resíduo	4,20	5	0,84		
Falta de ajuste	2,70	1	2,70	7,24	0,0546
Erro puro	1,49	4	0,37		

 $R^2_{aj.}=0,7063$.

A equação do modelo obtida para fluxo (J) é $J = 248,37A + 9,3B + 4,19C - 496,18AB + -483,30AC + 727,15ABC - 278,58AB(A-B) - 326,99AC(A-C)$.

As **Figuras 29 e 30** mostram as superfícies de resposta e linhas de contorno para o modelo do fluxo após a primeira hora do experimento, respectivamente.

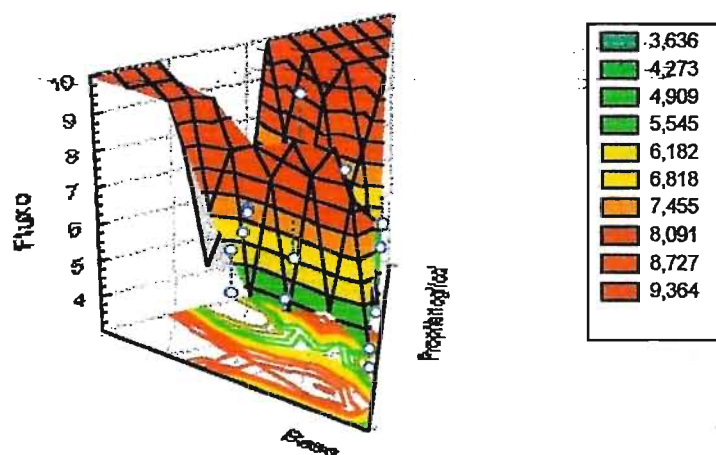


Figura 29. Superfície de resposta para o modelo do fluxo após a primeira hora do experimento.

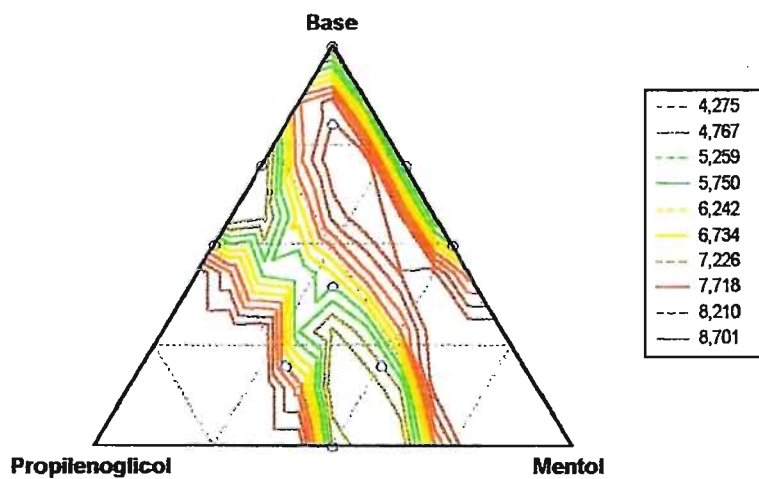


Figura 30. Linhas de contorno para o modelo do fluxo após a primeira hora do experimento.

A análise estatística do modelo quadrático para viscosidade está nas Tabelas 43 e 44.

Tabela 43. Parâmetros da regressão para o modelo da viscosidade.

G.L.= graus de liberdade

Componente	Coefficiente estimado	G.L.	Erro padrão	t para hipótese nula	Probabilidade
A-propilenoglicol	25725,41	1	6282,76	Não se aplica	Não se aplica
B-mentol	-4954,59	1	6282,76	Não se aplica	Não se aplica
C-base	9287,67	1	716,43	Não se aplica	Não se aplica
AB	6257,26	1	15835,26	0,40	0,7031
AC	-4122,00	1	11786,40	-0,35	0,7356
BC	41278,00	1	11786,40	3,50	0,0081

Tabela 44. Análise de variância do modelo quadrático para viscosidade.

G.L.= graus de liberdade.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	G.L.	Erro padrão	t para hipótese nula	Probabilidade
Modelo	7,070E+07	5	1,414E+07	11,90	0,0015
Resíduo	9,506E+06	8	1,188E+06		
Falta de ajuste	9,506E+06	4	2,377E+06	6,366+07	< 0,0001
Erro puro	0,000	4	0,000		

 $R^2_{aj}=0,8074$.

A equação do modelo obtida para viscosidade (η) é $\eta = 25725,41A - 4954,59B + 9287,67C + 6257,26AB - 4122,00AC + 41278,00BC$.

As **Figuras 31 e 32** mostram as superfícies de resposta e linhas de contorno para o modelo da viscosidade, respectivamente.

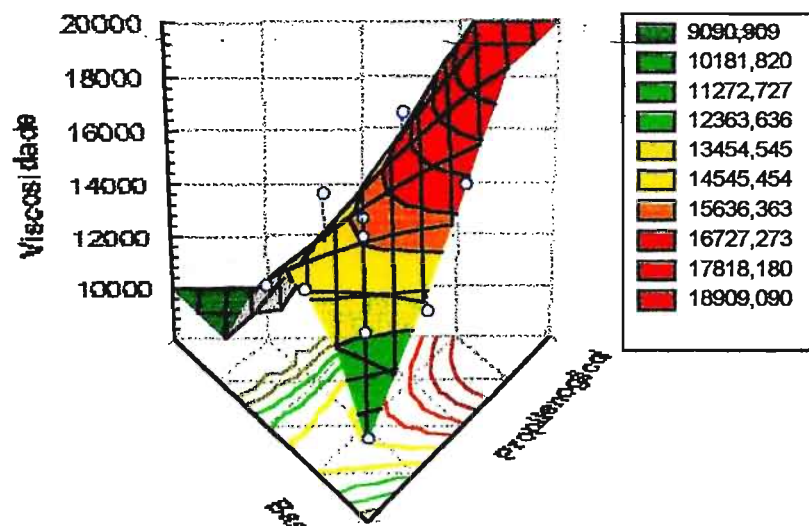


Figura 31. Superfície de resposta para o modelo da viscosidade.

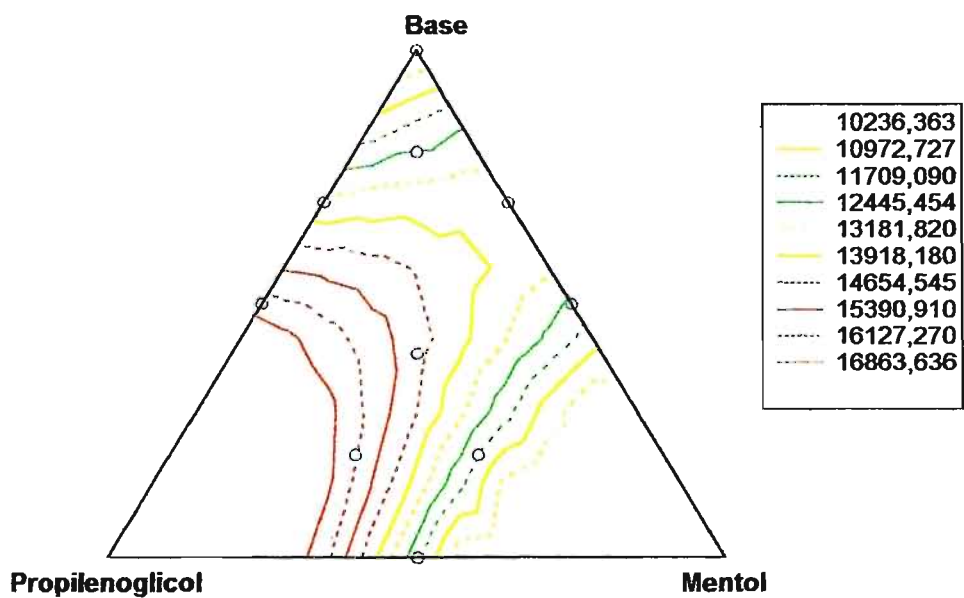


Figura 32. Linhas de contorno para o modelo da viscosidade.

5.3. Testes físico-químicos das formulações estudadas

5.3.1. Determinação do pH

Os valores de pH para as várias formulações estão relacionados nas **Tabelas 45 e 46**.

Tabela 45. Valores de pH das bases das formulações. T0 = dia de preparo; T1 = 7 dias; T2 = 14 dias; T3 = 30 dias; Amb.= 25°C; Gel.= 5 °C; Est.= 37 °C.

Form.	T 0		T 1		T 2			T 3		
	Amb.	Amb.	Gel.	Est.	Amb.	Gel.	Est.	Amb.	Gel.	Est.
A	4,30	4,41	4,50	4,24	4,50	4,38	4,34	4,54	4,76	4,21
B	5,10	5,07	4,65	4,65	4,97	4,72	4,57	5,01	4,93	4,91
C	4,64	4,48	4,70	4,81	4,60	4,82	4,72	4,76	4,70	4,51
D	4,74	4,76	4,47	4,51	4,61	4,67	4,51	4,86	4,56	4,42
E	4,85	4,48	4,80	4,72	4,43	4,91	4,60	4,62	4,76	4,52
F	4,70	4,62	5,67	4,78	4,78	4,69	4,77	4,78	4,79	4,46
G	4,41	4,72	4,58	4,55	4,78	4,63	4,58	4,70	4,78	4,56
H	4,98	4,80	4,56	4,65	4,94	4,62	4,77	4,80	4,90	4,62
I	5,01	5,08	4,82	5,08	5,06	4,72	4,51	4,91	4,79	4,67
J	5,35	5,10	4,80	4,85	4,93	4,99	4,76	5,21	5,17	4,97

Tabela 46. Valores de pH das formulações contendo cetoconazol. T0 = dia de preparo; T1 = 7 dias; T2 = 14 dias; T3 = 30 dias; Amb.= 25°C; Gel.= 5 °C; Est.= 37°C.

Form.	T 0		T 1		T 2			T 3		
	Amb.	Amb.	Gel.	Est.	Amb.	Gel.	Est.	Amb.	Gel.	Est.
A	3,56	3,57	3,56	3,53	3,63	3,66	3,53	3,49	3,54	3,51
B	3,65	3,72	3,54	3,81	3,64	3,63	3,68	3,60	3,53	3,64
C	3,68	3,69	3,56	3,63	3,62	3,65	3,68	3,53	3,58	3,74
D	3,64	3,69	3,62	3,76	3,70	3,65	3,69	3,60	3,57	3,73
E	3,65	3,72	3,55	3,50	3,57	3,62	3,65	3,55	3,63	3,65
F	3,57	3,78	3,55	3,65	3,34	3,60	3,69	3,54	3,63	3,81
G	3,58	3,55	3,56	3,67	3,67	3,57	3,66	3,51	3,57	3,68
H	3,57	3,63	3,50	3,73	3,64	3,62	3,69	3,60	3,56	3,68
I	3,72	3,72	3,70	3,78	3,72	3,70	3,78	3,73	3,57	3,72
J	3,63	3,63	3,59	3,79	3,61	3,63	3,90	3,69	3,67	3,68

5.3.2. Determinação da viscosidade

Os valores de viscosidade para as várias formulações estão relacionados nas Tabelas 47 e 48.

Tabela 47. Valores de viscosidade (cP) das bases das formulações. T0 = dia de preparo; T1 = 7 dias; T2 = 14 dias; T3 = 30 dias; Amb.= 25°C; Gel.= 5°C; Est.= 37°C.

Form.	T 0		T 1		T 2			T 3		
	Amb.	Amb.	Gel.	Est.	Amb.	Gel.	Est.	Amb.	Gel.	Est.
A	18250	18850	20300	30050	19900	20150	30500	19950	21500	35500
B	21950	24050	20050	39600	24000	22000	39000	24200	23100	40500
C	28300	27750	25900	40950	28500	28150	40700	30800	29500	42000
D	29750	22450	23800	33450	25500	26950	34150	38050	28600	35000
E	23500	25100	22600	34950	20250	23900	37750	28150	24450	38000
F	26800	28400	20650	26400	23500	20150	32850	21950	19440	39700
G	24300	22800	21650	27600	31150	21200	33050	35900	23400	35500
H	21100	21600	19600	24150	21900	19550	31050	22150	21400	30500
I	18100	17050	18200	25500	20050	22350	31750	21600	26650	32050
J	21950	21700	20850	19100	23900	22950	29250	27200	24000	31650

Tabela 48. Valores de viscosidade (cP) das formulações contendo cetoconazol. T0 = dia de preparo; T1 = 7 dias; T2 = 14 dias; T3 = 30 dias; Amb.= 25°C; Gel.= 5°C; Est.= 37°C.

Form.	T 0		T 1		T 2			T 3		
	Amb.	Amb.	Gel.	Est.	Amb.	Gel.	Est.	Amb.	Gel.	Est.
A	9050	11700	13550	13950	12250	13050	17350	13150	14400	18350
B	11200	10450	10700	10450	13100	11950	12450	16550	12700	17450
C	17600	16650	17500	19100	18500	17500	18950	21200	18450	20300
D	16550	14300	16400	16400	14750	16050	17950	16700	16700	21550
E	12750	14000	17450	17200	15750	18250	02150	19650	20400	22550
F	13900	14450	14150	15550	14050	14550	18050	15550	14450	20450
G	12250	13700	14150	16500	15950	17650	19750	16700	17650	20500
H	13700	15950	15800	13600	15950	16750	19750	17150	16900	21500
I	13550	14000	14300	16450	15250	15250	19550	16600	17800	21500
J	12600	14050	16550	14700	16050	16550	19050	16750	16200	20500

5.3.3. Determinação do teor

Os valores de teor de cetoconazol das várias formulações estão relacionados na Tabela 49.

Tabela 49. Valores de teor de cetoconazol (mg/g) das formulações estudadas. T0 = dia de preparo; T1 = 7 dias; T2 = 14 dias; T3 = 30 dias. Amb.= 25°C; Gel.= 5 °C; Est.= 37 °C.

Form.	T 0		T 1		T 2			T 3		
	Amb.	Amb.	Gel.	Est.	Amb.	Gel.	Est.	Amb.	Gel.	Est.
A	19,5	19,3	19,6	19,4	19,4	19,5	19,6	19,6	19,2	19,7
B	20,4	21,6	20,7	20,4	20,9	20,6	20,2	18,7	20,0	19,8
C	20,5	20,4	21,3	20,8	20,6	20,6	20,2	19,5	19,2	19,6
D	19,7	21,0	19,9	20,2	20,5	19,8	19,8	19,1	20,0	19,5
E	20,2	20,2	20,2	18,9	20,0	20,4	20,1	20,4	21,1	19,6
F	19,6	19,6	19,9	19,5	19,8	19,9	20,0	20,4	19,3	19,9
G	19,8	21,4	19,5	19,1	20,2	19,5	19,6	19,2	19,2	19,6
H	19,9	21,3	19,0	20,2	20,5	19,7	20,0	20,4	19,9	20,1
I	19,4	20,4	19,3	20,8	20,3	19,6	19,6	19,8	20,4	19,4
J	20,8	20,5	20,0	20,3	20,1	19,8	19,7	19,8	19,8	19,9

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos inúmeros pesquisadores vêm realizando criteriosos estudos com a finalidade de determinar e entender os fatores farmacocinéticos, físico-químicos e farmacotécnicos, que envolvem a ação de produtos dermatológicos e de ação transdérmica.

Quando a pele é utilizada como via de administração de fármacos, duas situações devem ser consideradas: o efeito local pode ser o objetivo do tratamento, ou a pele pode servir como rota para atingir a circulação. No primeiro caso, são consideradas as preparações cutâneas tópicas ou dermatológicas, e no segundo, as preparações transdérmicas. O produto dermatológico é destinado a liberar o(s) fármaco(s) na pele para o tratamento de patologias cutâneas, sendo a pele o órgão alvo. Desse produto exige-se máxima atuação na pele e mínima exposição à toxicidade sistêmica, ou seja, é ideal que se tenha uma ótima retenção do fármaco na pele com pequeno ou inexistente fluxo através dela (Ansel et.al., 1995; Barry, 1983; Barry, 1993; Bentley, 1994; Chien, 1987; Flynn, 1990; Flynn, 1993; Shah, 1993).

A literatura menciona diversas alternativas que procuram aumentar a disponibilidade de fármacos aplicados topicamente. Tais estudos envolvem o emprego de promotores de permeação/penetração, a tecnologia de pró-fármacos, frequência de aplicação e o desenvolvimento e entendimento de sistemas como as microcápsulas, os complexos de inclusão como as ciclodextrinas, os lipossomas e as microemulsões (Barry, 1983; Bentley, 1994; Hsieh, 1994; Zatz, 1993).

Dentre as causas de patologias cutâneas, as infecções fúngicas são uma das causas mais comuns, sendo as preparações farmacêuticas de aplicação tópica e de ação antimicótica de grande

importância no combate dessas enfermidades (Guzzo et.al., 1996; Jawetz et.al., 1980; Martindale, 1993).

Há uma grande quantidade de fármacos de ação antimicótica disponíveis comercialmente. O cetoconazol, um antimicótico imidazólico de amplo espectro, merece destaque por ser indicado no tratamento de infecções causadas por uma variedade de fungos e leveduras (Bennett, 1996; Dollery, 1991; Finch, 1996; Información de medicamentos, 1989; Olin, 1996; Remington's, 1995; USP DI, 1997).

Na avaliação da ação de produtos de ação dermatológica e transdérmicos, testes clínicos podem ser precedidos, e em algumas vezes substituídos por testes *in vitro*. Esses testes, devido às suas peculiaridades, permitem entender os fenômenos físico-químicos que ocorrem entre a aplicação do produto e o efeito medido farmacológica ou clinicamente, de maneira prática, rápida e sem a interferência de fatores biológicos (Barry, 1983; Bentley, 1994; Bronaugh, Collier, 1993; Franz et.al.,1993; Gummer et.al., 1987, Skelly et.al., 1987; Wester, Maibach, 1993).

Essas considerações deram suporte ao presente trabalho quanto ao interesse em desenvolver bases dermatológicas adequadas como veículo do cetoconazol assim como avaliar sua liberação empregando método *in vitro*. Para tanto, foram avaliadas formulações de cremes O/A de uso tópico contendo cetoconazol, incluindo estudos preliminares da estabilidade dessas preparações. Foram testados vários constituintes, entretanto, a composição do veículo (creme base) mais satisfatória foi a descrita em 4.2.1.1.

Durante o desenvolvimento da formulação, foram selecionados promotores compatíveis que atuassem por mecanismos distintos, o que pode ser um fator positivo para uma melhor penetração e/ou permeação do fármaco quando administrado na pele (Arellano et.al., 1996; Barry,

1993; Cornwell et.al., 1996; Goodman, Barry, 1988; Goodman, Barry, 1989; Kitagawa et.al., 1998; Obata et.al., 1993 A; Orjales, 1998; Pershing et.al., 1990; Sheth et.al., 1986; Williams, Barry, 1989; Yum et.al., 1994).

Além dos promotores propilenoglicol e solução alcóolica de mentol elegeu-se o Germall[®] (diazolidiniluréia) como conservante, uma vez que não apresentou nenhuma incompatibilidade com os outros componentes da formulação durante os testes preliminares de misturas binárias, quando as mesmas foram colocadas em placas e deixadas em estufas a 37°C por, aproximadamente, 48 horas. Os outros conservantes testados foram associação de Nipagin[®] (metilparabeno) e Nipazol[®] (propilparabeno), Cheminol I[®] (imidazolidiniluréia) e Kathon CG[®] (associação de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona).

Como consequência das características físico-químicas, foi necessário adicionar à formulação butil-hidroxitolueno (BHT) e metabissulfito de sódio, antioxidantes comprovadamente eficazes, e, ainda, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) que funciona como o agente quelante ou sequestrante de metais na formulação. O creme O/A obtido apresenta ótimas características quanto ao aspecto, espalhamento e capacidade emulsionante pois contém Polawax[®], cera não iônica resultante da reação entre alcóois cetílico e estearílico com polioxietilenoglicóis aquosa (Prista et.al., 1981; Prista et.al., 1992; Remington's, 1995).

A técnica escolhida para a obtenção da emulsão foi a técnica da "emulsão invertida". Essa técnica proporciona uma melhor estabilidade à emulsão, uma vez que há a formação de uma emulsão A/O inicialmente e, posterior formação da emulsão O/A definitiva após a adição da total quantidade de componentes da fase aquosa (Prista et.al., 1981; Prista et.al., 1992; Remington's, 1995).

A seleção das formulações para avaliação da liberação do cetoconazol foi realizada empregando planejamento experimental estatístico, baseado no Modelo de Mistura Quadrática (Cornell, 1990). Esse modelo permite avaliar a influência de diferentes quantidades (0, 1,0, 3,0 e 5,0%) dos promotores de permeação/penetração, propilenoglicol e solução alcóolica de mentol, nas formulações, com relação à liberação do cetoconazol.

Para a determinação do cetoconazol nas preparações farmacêuticas e nos testes de liberação foi necessário o desenvolvimento de metodologia analítica sensível e seletiva, capaz de quantificar o fármaco nas baixas concentrações presentes no fluido receptor. A técnica espectrofluorimétrica descrita por MACHMER (1985) foi útil como indicativo de que essa metodologia poderia ser aplicada ao fármaco em estudo, fornecendo resultados precisos e exatos, mesmo em baixas concentrações. Estudos preliminares foram realizados com soluções padrão de cetoconazol em tampão fosfato para selecionar os parâmetros e comprimentos de onda de excitação (λ_{Ex}) e de emissão (λ_{Em}) mais adequados quanto à sensibilidade, reprodutibilidade e linearidade de resposta. Os demais parâmetros estudados na validação do método incluíram: linearidade, especificidade/seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

A linearidade indica a faixa de concentração de analito em que os resultados fornecidos pelo método são diretamente proporcionais à sua quantidade presente na amostra (USP 24^a ed., 1999). O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 0,1 μ g/mL a 20,0 μ g/mL e a reta de calibração apresentou um coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,9995. Verificou-se, como pode ser visto na **Figura 14**, que a reta passa pela origem, ou seja, a interseção da reta apresenta valor não significativo para P=95% (teste t).

A especificidade/seletividade indica a capacidade do método em quantificar o analito, mesmo na presença de outros componentes, tais como excipientes (USP 24^a ed., 1999). Foi possível observar especificidade/seletividade do método analítico na faixa de concentração de 0,1µg/mL a 20,0µg/mL; pelas leituras de intensidade de fluorescência das amostras analisadas (**Tabela 6**) pode-se observar que a interferência dos excipientes presentes na quantificação do cetoconazol foi praticamente inexistente.

O limite de detecção representa a menor concentração de analito que pode ser detectada pelo método, mas não necessariamente quantificada (USP 24^a ed., 1999). O limite de detecção obtido foi de 0,003µg/mL.

O limite de quantificação representa a menor concentração de analito que pode ser quantificada através do método, com exatidão e precisão aceitáveis (USP 24^a ed., 1999). O limite de quantificação obtido foi de 0,01µg/mL.

A precisão indica o grau de concordância entre resultados individuais obtidos pela aplicação repetitiva do método à amostra (USP 24^a ed., 1999). Segundo os valores de coeficiente de variação (CV) apresentados nas **Tabelas 9 e 10**, pode-se afirmar que o método apresenta excelente precisão uma vez que os valores obtidos são inferiores a 2,2%. Foi possível certificar-se que as amostras podem ser congeladas para análise posterior e que o método apresenta precisão inter-dias, uma vez que as mesmas foram analisadas no primeiro dia, congeladas (-4°C) e reanalisadas após três dias, sem haver variação significativa nos valores de intensidade de fluorescência (**Tabela 10**), mantendo baixos coeficientes de variação.

A exatidão indica a proximidade entre os resultados obtidos pela utilização do método e o valor real, podendo ser expressa em termos de porcentagem de recuperação (USP 24^a ed., 1999).

A **Tabela 11** apresenta os resultados obtidos no teste de recuperação. Considera-se que quanto mais a medida se aproxima do valor verdadeiro mais exato é o método. As quantidades recuperadas situam-se entre 98,44 e 102,47%, indicando, assim, boa exatidão do método na faixa de concentração de 0,1 a 20,0µg/mL.

Para os testes de liberação, a membrana de celulose permaneceu imersa em solução tampão para que ocorresse sua hidratação. Esse procedimento também é recomendado, pois as membranas sintéticas geralmente possuem certas substâncias (conservantes, plastificantes, entre outras), que devem ser removidas, uma vez que podem alterar os resultados de maneira significativa (Haigh, Smith, 1994).

Antes do início dos testes de liberação, ou seja, antes da aplicação da amostra das formulações testadas, foi necessário deixar o sistema por um período de 12 horas em banho de água termostaticado mantido à 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), para que houvesse a estabilização do mesmo.

A primeira coleta ocorreu no tempo igual a zero (h) para certificar de que a membrana não estava danificada (perfurada ou com fissuras). Isso era possível, uma vez que a leitura dessa amostra era igual à do branco (solução tampão), comprovando-se que não havia ocorrido liberação de cetoconazol da formulação testada.

Durante os testes de liberação, as amostras coletadas nos diferentes intervalos de tempo foram congeladas, uma vez que no teste de precisão inter-dias foi evidenciado que não há alterações significativas nas amostras no período de três dias, pois praticamente não há variação de leitura de intensidade de fluorescência.

Durante o desenvolvimento da metodologia para a avaliação da difusão do cetoconazol procurou-se escolher um meio receptor que melhor atendesse às condições exigidas (garantir

condições *sink*, manter a viabilidade da membrana durante o experimento, evitar contaminação microbiana, entre outras). O fluido receptor selecionado foi solução tampão, descrita no item 4.2.2.1., acrescida de sulfato de gentamicina. A função da gentamicina é a de evitar a contaminação microbiana do sistema.

O emprego de membrana de celulose no experimento é vantajoso em relação à pele, uma vez que não há diferença de espessura ou de variabilidade na sua constituição. Esse tipo de membrana é bastante útil na avaliação da liberação do fármaco, auxiliando na escolha do veículo mais adequado. Nessa fase, a pele pode ser considerada como um fator que apresenta muitas variações, podendo interferir significativamente no resultado final (Ansel et.al., 1995; Barry, 1983; Rieger, 1993, Riviere, 1993). Essas vantagens motivaram a escolha da membrana sintética nesta fase do estudo para avaliação da capacidade das preparações em liberar o fármaco para permeação. Posteriormente, testes *in vivo* ou *in vitro* utilizando membranas biológicas devem ser realizados para possibilitar resultados mais próximos à administração na pele.

O experimento utilizou o método do *Lag Time*, baseado nas leis de Fick, como forma de obter os parâmetros de difusão descritos nas Tabelas 26 a 39 (Barry, 1983; Shah, 1993; Shah, 1994).

O modelo de membrana empregada apresentou comportamento de uma membrana homogênea de apenas uma fase, esse método utiliza apenas dados obtidos após estabelecimento de fluxo constante. Sob essa condição, esses são lineares, possibilitando a determinação do fluxo (J) e do coeficiente de permeabilidade (P) através da equação da reta. O *Lag Time* é calculado através da extrapolação dessa reta no eixo do tempo (x). De acordo com esses parâmetros, é possível determinar o coeficiente de difusão (D) e o coeficiente de partição (K), aplicando-se as Leis de

Fick e conhecendo-se a concentração inicial do cetoconazol no compartimento doador, além da espessura da membrana (e) (Barry, 1983; Lopes, 1999; Shah, 1993; Shah, 1994).

Uma vez que os parâmetros fluxo (J) e coeficiente de permeabilidade são obtidos diretamente da plotagem dos dados, os mesmos possuem uma confiabilidade maior quando comparados com os outros parâmetros de difusão (D e K), que são influenciados pela espessura da membrana.

Analisando as **Tabelas 12 a 39** e as **Figuras 15 a 28** é possível observar que a Formulação J (teste 1) apresentou os maiores valores de fluxo ($9,1931\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$) e coeficiente de permeabilidade ($4,60 \times 10^{-4}\text{cm}/\text{h}$) após a primeira hora do teste de liberação e, conseqüentemente, houve uma grande quantidade média liberada de cetoconazol ($111,62\mu\text{g}$) após 26 horas da aplicação da formulação. Já a Formulação C (teste 13) apresentou os segundos maiores valores de fluxo ($9,0469\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$) e coeficiente de permeabilidade ($4,52 \times 10^{-4}\text{cm}/\text{h}$) após a primeira hora do teste de liberação e, conseqüentemente, houve a maior quantidade média liberada de cetoconazol ($144,49\mu\text{g}$) após 26 horas da aplicação da formulação.

Por outro lado, a Formulação A (teste 11) apresentou os menores valores de fluxo ($3,7833\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$) e coeficiente de permeabilidade ($1,89 \times 10^{-4}\text{cm}/\text{h}$) após a primeira hora do teste de liberação, apesar de ter havido uma razoável quantidade média liberada de cetoconazol ($104,43\mu\text{g}$) após 26 horas da aplicação da formulação. Já a Formulação I (teste 6) apresentou baixos valores de fluxo ($4,6641\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$) e coeficiente de permeabilidade ($2,33 \times 10^{-4}\text{cm}/\text{h}$) e, conseqüentemente, houve a menor quantidade média liberada de cetoconazol ($79,49\mu\text{g}$) após 26 horas da aplicação da formulação.

A **Tabela 42** indica um valor de probabilidade na análise de variância igual a 0,0482, indicando que o modelo é significativo ao nível de 5%. O valor obtido para o coeficiente de determinação ajustado para os graus de liberdade, R^2_{aj} , foi de 0,7063, sendo assim, 70,63% dos pontos experimentais explicam o modelo apresentado para fluxo em uma hora de experimento.

A **Tabela 44** indica que o modelo é significativo ao nível de 5%. O valor obtido para R^2_{aj} foi de 0,8074, sendo assim, 80,74% dos pontos experimentais explicam o modelo apresentado para viscosidade.

A avaliação da liberação e permeação do cetoconazol em membrana sintética neste trabalho despertou a curiosidade e a necessidade em realizar novos estudos com os promotores estudados. A otimização da formulação básica e ajustes das concentrações destes promotores são alguns dos pontos que podem ser pesquisados.

7. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que foi realizado o presente trabalho e com base nos resultados obtidos pode-se concluir:

- ✓ Foi possível avaliar, através de estudo *in vitro*, a liberação e a permeação do cetoconazol a partir de creme O/A através de membrana sintética de acetato de celulose.
- ✓ Cremes O/A não-iônicos foram considerados bons veículos para o cetoconazol pois liberaram o cetoconazol prontamente nos testes de liberação.
- ✓ O método espectrofluorimétrico proposto é preciso, exato, específico e rápido para a determinação e quantificação de cetoconazol em cremes e em testes de liberação *in vitro*.
- ✓ Entre os parâmetros de difusão, o fluxo e o coeficiente de permeabilidade foram os mais adequados na avaliação da liberação e permeação do cetoconazol através de membrana sintética de acetato de celulose.
- ✓ Através dos resultados dos testes de liberação e da análise estatística pode-se observar que o propilenoglicol apresentou melhores características como promotor de permeação/penetração quando comparado com a solução alcóolica de mentol.

✓ A formulação J (teste 1), contendo 1% p/p de propilenoglicol e 1% p/p de solução alcóolica de mentol, apresentou os maiores valores de fluxo ($9,1931\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$) e coeficiente de permeabilidade ($4,60 \times 10^{-4}\text{cm}/\text{h}$) após a primeira hora do teste de liberação. Já a Formulação C (teste 13), contendo 5% p/p de propilenoglicol e 3% p/p de solução alcóolica de mentol, apresentou os segundos maiores valores de fluxo ($9,0469\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$) e coeficiente de permeabilidade ($4,52 \times 10^{-4}\text{cm}/\text{h}$) após a primeira hora do teste de liberação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUNASSIF, M.A., EL-SHAZLY, B.E.D.M. D₁ Differential potentiometric determination of ketoconazole and its formulations. *Anal. Lett.*, Monticello, v.22, n.10, p.2233-2247, 1989.
- AGACHE, P. Epiderme, pêlo, glândulas sebáceas e sudoríparas. In: PRUNIÉRAS, M. **Manual de cosmetologia dermatológica**. 2.ed. São Paulo: Organizações Andrei, 1994. cap.1, p.17-81.
- AL-MESHAL, M.A. Determination of ketoconazole in plasma and dosage forms by high-performance liquid chromatography and a microbiological method. *Anal. Lett.*, Monticello, v.22, n.10, p.2249-2263, 1989.
- ALTON, K.B.. Determination of the antifungal agent, Ketoconazole, in human plasma by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.221, p.337-344, 1980.
- ANSEL, H.C., POPOVICH, N.G., ALLEN, L.V. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 7.ed. Malvern: Williams & Wilkins, 1995. p.357-361.
- ARELLANO, A., SANTOYO, S., MARTÍN, C., YGARTUA, P. Enhancing effect of terpenes on the *in vitro* percutaneous absorption of diclofenac sodium. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.130, p.141-145, 1996.

De acordo com a NBR 6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1999 [Cd-rom].

- BARRY, B.W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption.** New York: Marcel Dekker, 1983. v.18, 480p.
- BARRY, B.W. Vehicle effect: what is an enhancer? In: SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration.** New York: Plenum, 1993. cap.14, p.261-276.
- BARRY, B.W., BRACE, A.R. Permeation of oestrone, oestradiol, oestriol and dexamethasone across cellulose acetate membrane. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.29, p.397-400, 1977.
- BARRY, B.W., EL EINI, D.I.D. Influence of non-ionic surfactants on permeation of hydrocortisone, dexamethasone, testosterone and progesterone across cellulose acetate membrane. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v.28, p.219-227, 1976.
- BEHL, C.R., CHAR, H., PATEL, S.B., MEHTA, D.B., PIEMONTESE, D., MALICK, A.W. *In vivo* and *in vitro* skin uptake and permeation studies. Critical considerations and factors which affect them. In: SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration.** New York: Plenum, 1993. cap.13, p.225-259.
- BENY, M.G. Fisiologia da pele. *Cosmet. Toiletries, Ed. Port.*, São Paulo, v.12, p.44-50, 2000.
- BENNETT, J.E., Fármacos antimicrobianos. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., MOLINOFF, P.B., RUDDON, R.W., GILMAN, A., eds. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica.** 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996. cap.49, p.868-869.

- 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 - USP).
- BLOCK, L.H. Medicated applications. In: GENNARO, A.R., ed. **Remington's pharmaceutical sciences**. 18.ed. Easton: Mack, 1990. cap.87, p.1596-1602.
- BRASS, C., CALGIANI, J.N., BLASCHKE, T.F., DEFELICE, R., O'REILLY, R.A., STEVENS, D.A. Disposition of ketoconazole, an oral antifungal, in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.21, n.1, p.151-158, 1982.
- BRITISH Pharmacopoeia: addendum 1996. London: Her Majesty's Stationery Office, 1993. p.1792-1793.
- BRONAUGH, R.L. Diffusion cell design. In: SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum, 1993. cap.6, p.117-125.
- BRONAUGH, R.L., COLLIER, S.W. *In vitro* methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J.L., ed. **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured, 1993. cap.4, p.93-111.
- BRONAUGH, R.L., STEWART, R.F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies IV. The flow-through diffusion cell. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.74, p.64-67, 1985.
- CHIEN, Y.W. Advances in transdermal systemic medication. In: _____. **Transdermal controlled systemic medications**. New York: Marcel Dekker, 1987. cap.1, p.1-22.

- CLARKE'S isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.696-697.
- CONSIGLIERI, V.O. Doseamento da vitamina B₆ por espectrofotometria derivada no ultravioleta. São Paulo, 1992. 117p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- CORNELL, J.A. **Experiments with mixtures**: designs, models, and the analysis of mixture data. New York: Wiley, 1990.
- CORNWELL, P.A., BARRY, B.W., BOUWSTRA, J.A., GOORIS, G.S. Modes of action of terpene penetration enhancers in human skin; differential scanning calorimetry, small-angle X-ray diffraction and enhancer uptake studies. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.127, p.9-26, 1996.
- CORRÊA, M.A. Incorporação de naproxeno em sistema microemulsionado: liberação *in vitro* e avaliação biológica. São Paulo, 1997. 146p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- DEF 98/99: dicionário de especialidades farmacêuticas. 27.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1998. 1094 p.
- DEF 99/2000: dicionário de especialidades farmacêuticas. 27.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2000. 1186p.
- DOLLERY, C.T., ed. **Therapeutic drugs**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1991. v.2, p.K21-K24.

- EL-SHABOURI, S.R., EMARA, K.M., KHASHABA, P.Y., MOHAMED, A.M. Charge-transfer complexation for spectrophotometric assay of certain imidazole antifungal drugs. *Anal. Lett.*, Monticello, v.31, n.8, p.1367-1385, 1998.
- EUROPEAN Pharmacopoeia: supplement 1999. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 1998. p.629-631.
- FINCH, R.G., SNYDER, I.S. Drogas antifúngicas. In: CRAIG, C.R., STITZEL, R.E. **Farmacologia moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap.59, p.584-585.
- FLYNN, G.L. General introduction and conceptual differentiation of topical and transdermal drug delivery systems. Differentiation with respect to delivery kinetics. In: SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum, 1993. cap.20, p.369-391.
- FLYNN, G.L. Topical drug absorption and topical pharmaceutical systems. In: BANKER, G.S., RHODES, C.T., eds. **Modern pharmaceuticals**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1990. p.263-325. (Drug and the pharmaceutical sciences, v.40).
- FRANZ, T.J., LEHMAN, P.A., McGUIRE, E.L. *In vivo* methods for the assessment of percutaneous absorption in man. In: ZATZ, J.L., ed. **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured, 1993. cap.3, p.73-92.
- GAWAD, F.M.A. Investigation of ketoconazole-iron (III) complex and its spectrophotometric determination in pharmaceutical preparations. *Farmaco*, Amsterdam, v.52, n.2, p.119-122, 1997.

- GINSBURG, C.M., McCracken Jr., J.M., OLSEN, K. Pharmacology of ketoconazole suspension in infants and children. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.23, n.5, p.787-789, 1983.
- GOODMAN, M., BARRY, B. Action of penetration enhancers on human skin as assessed by the permeation of model drugs 5-fluorouracil and estradiol. I. Infinite dose technique. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.91, n.4, p.323-327, 1988.
- 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.
- GRENDahl, J.G., SUNG, J.P. Quantitation of imidazoles by agar disk diffusion. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, Washington, v.14, n.3, p.509-513, 1978.
- GUILBAULT, G.G. **Practical fluorescence**. New York: Marcel Dekker, 1978. p.1-159.
- GUMMER, C.L., HINZ, R.S., MAIBACH, H.I. The skin penetration cell: a design update. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.40, p.101-104, 1987.
- GUPTA, S.K., BASHAW, E.D., HWANG, S.S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of transdermal products. In: SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum, 1993. cap.17, p.311-332.

- GUZZO, C.A., LAZARUS, G.S., WERTH, V.P. Dermatological pharmacology. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., MOLINOFF, P.B., RUDDON, R.W., GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p.1593-1616.
- HAIGH, J.M., SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for *in vitro* diffusin experiments. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.2, p.311-330, 1994.
- HAM, A.W. Sistema tegumentar: pele e seus anexos. In: _____. **Histologia**. 3.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1967. cap.23, p.571-599.
- HEYKANTS, J.J.P., WOESTENBORGHES, R.J.H., BISSCHOP, M.P.J.M., MERKUS, J.M.W.M. Distribution of oral ketoconazole to vaginal tissue. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, 23, p.331-333, 1982.
- HSIEH, D.S. Understanding permeation enhancement technologies. In: _____. **Drug permeation enhancement: theory and applications**. New York: Marcel Dekker, 1994. cap.1, p.3-17.
- INFORMACIÓN de medicamentos. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo de España, 1989. v.2, p.1411-1412. (OPAS publicacion científica, 525).
- JAWETZ, E., MELNICK, J.L., ADALBERG, E.A. **Microbiologia médica**. 13.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. p.265-273, 278-279.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: _____. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap.18, p.303-314.

- KEDOR, E.R.M., NERY, M.M.F., SANTORO, M.I.R.M. Determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations by ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *Anal. Lett.*, Monticello, v.27, n.2, p.363-376, 1994.
- KELANI, K., BEBAWY, L.I. Spectrophotometric determination of some *n*-donating drugs using DDQ. *Anal. Lett.*, Monticello, v.30, n.10, p. 1843-1861.
- KITAGAWA, S., HOSOKAI, A., KASEDA, Y., YAMAMOTO, N., KANEKO, Y., MATSUOKA, E. Permeability of benzoic acid derivatives in excised guinea pig dorsal skin and effects of *l*-mentol. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.161, p.115-122, 1998.
- KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico guanabara**: 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.18.13-18.23.
- KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. Agentes anti-sépticos, antifúngicos e antibacterianos. In: _____. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. cap.30, p.522-546.
- 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 – USP).
- LOPES, P.S., KANEKO, T.M. Membranas no estudo de permeação cutânea. *Cosmet. Toiletries, Ed. Port*, São Paulo, v.12, p.62-65, 2000.
- MACHMER, M.B. Determinación espectrofluorométrica de ketoconazol. *Rev. Fac. Farm. Univ. Los Andes*, Merida, n.25, p.97-123, 1985.

- MAITANI, Y., COULTEL-EGROS, A., OBATA, Y., NAGAI, T. Prediction skin permeabilities of diclofenac and propranolol from theoretical partition coefficients determined from cohesion parameters. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.82, n.4, p.416-420, 1993.
- MAK, V.H.W., POTTS, R.O., GUY, R.H. Percutaneous penetration enhancement *in vivo* measured by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Pharm. Res.*, New York, v.7, n.8, p.835-841, 1990.
- MÄNNISTÖ, P.T., MÄNTYLÄ, R., NYKÄNEN, S., LAMMINSIVU, U., OTTOILA, P. Impairing effect of food on ketoconazole absorption. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.21, n.5, p.730-733, 1982.
- MARTIN, A., BUSTAMANTE, P. **Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences.** 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap.13, p.324-361.
- MARTINDALE, W.H. **The extra pharmacopoeia.** 30.ed. London: Pharmaceutical Press, 1993. p.315-332.
- MERCK index. 12.ed. Withehouse Station, 1996. p.904-905.
- MÜLLER, B., KREUTER, J. Enhanced transport of nanoparticle associated drugs through natural and artificial membranes: a general phenomenon? *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.178, p.23-32, 1999.
- NICOLAU, G., YACOBI, A. Skin metabolism. cutaneous first-pass effect of a transdermally absorbed prostaglandin. In: SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration.** New York: Plenum, 1993. cap.16, p.291-308.

- OBATA, Y., TAKAYAMA, K., MAITANI, Y., MACHIDA, Y., NAGAI, T. Effect of ethanol on skin permeation of nonionized and ionized diclofenac. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.89, p.191-198, 1993 (A).
- OBATA, Y., TAKAYAMA, K., MAITANI, Y., MACHIDA, Y., NAGAI, T. Effect of pretreatment of skin with cyclic monoterpenes on permeation of diclofenac in hairless rat. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.16, n.3, p.312-314, 1993 (B).
- ODDS, F.C. Laboratory evaluation of antifungal agents: a comparative study of five imidazole derivatives of clinical importance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.6, p. 749-761, 1980.
- OHLWEILER, O.A. Fluorometria. In: _____. **Química analítica quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v.3, cap.29, p.748-758.
- OLIN, B.R., KASTRUP, E.K., eds. **Drug facts and comparisons**. 50.ed. Saint Louis: Facts and Comparisons, 1996. p.2798-2799.
- ORJALES, I.R. Agentes promotores de la permeación percutánea. *Rev. Cubana Farm.*, Havana, v.32, n.1, p.68-75, 1998.
- OSTRENGA, J., STEINMETZ, C., POULSEN, B. Significance of vehicle composition I: relationship between topical vehicle composition, skin penetrability, and clinical efficacy. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.60, n.8, p.1175-1179, 1971.
- PERSHING, L.K., LAMBERT, L.D., KNUTSON, K. Mechanism of ethanol-enhanced estradiol permeation across human skin *in vivo*. *Pharm. Res.*, New York, v.7, n.2, p.170-175, 1990.

- POZZO, A.D., LIGGERI, E., DELUCCA, C., CALABRESE, G. Prediction of skin permeation of highly lipophilic compounds; *in vitro* model with a modified receptor phase. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 70, p.219-222, 1991.
- PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste-Gulbenkian, 1981. v.1. p.526.
- PRISTA, L.N., BAHIA, M.F.C.C., VILAR, E. **Dermofarmácia e cosmética**. Porto: Associação Nacional das Farmácias, 1992. v.1, p.13-138.
- RANGARAJAN, M., ZATZ, J.L. Skin delivery of vitamin E. *J. Cosmet. Sci.*, New York, v.50, n.4, p.249-279, 1999.
- REMINGTON'S the science and practice of pharmacy. 19.ed. Easton: Mack, 1995. p.1327-1331.
- RICHARDSON, M.D., WARNOCK, D.W. Fungal infection: diagnosis and management. Oxford: Blackwell Science, 1993. p.1-8, 44-47.
- RIEGER, M.M. Factors affecting sorption of topically applied substances. In: ZATZ, J.L., ed. **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured, 1993. cap.2, p.33-72.
- RIVIERE, J.E. Biological factors in absorption and permeation. In: ZATZ, J.L., ed. **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured, 1993. cap.5, p.113-125.
- SADEGHI, S., SHAMSIPUR, M. A new extractive-spectrophotometric method for the determination of ketoconazole from pharmaceutical preparations. *Anal. Lett.*, Monticello, v.31, n.15, p.2691-2705, 1998.
- SEKI, T., KAWAGUCHI, T., SUGIBAYASHI, K., JUNI, K., MORIMOTO, Y. Percutaneous absorption of azidothymidine in rats. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.57, p.73-75, 1989.

SHAH, J.C. Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method. *Int J. Pharm.*, Amsterdam, v.90, 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, p.283-290, 1994.

SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum, 1993 .453p.

SHAH, V.P. Skin penetration enhancers: scientific perspectives. In: HSIEH, D.S., ed. **Drug permeation enhancement: theory and applications**. New York: Marcel Dekker, 1994, cap.2, p.19-23.

SHAH, V.P., SKELLY, J.P. Practical considerations in developing a quality control (*in vivo* release) procedure for topical drug products. In: SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum, 1993. cap.5, p.107-116.

SHETH, N.V., FREEMAN, D.J., HIGUCHI, W.I., SPRUANCE, S.L. The influence of Azone[®], propylene glycol and polyethylene glycol on *in vitro* skin penetration of trifluorothymidine. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.28, p.201-209, 1986.

SKELLY, J.P., SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., GUY, R.H., WESTER, R.C., FLYNN, G., YACOBI, A. FDA and AAPS report of the workshop on principles and practices of *in vitro* percutaneous penetration studies: relevance to bioavailability and bioequivalence. *Pharm. Res.*, New York, v.4, n.3, p.265-267, 1987.

- TOJO, K. Design and calibration of *in vitro* permeation apparatus. In: CHIEN, Y.W., ed. **Transdermal controlled systemic medication**. New York: Marcel Dekker, 1987. p.127-158.
- UNITED States Pharmacopoeia. 22.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1989. p.747-748.
- UNITED States Pharmacopoeia, 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1994. p.864-865.
- UNITED States Pharmacopoeia, 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.945-946.
- USP DI. 17.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1997. p.1784-1786. [Drug information for the health care professional, v. 1].
- WENKERS, B.P., LIPOLD, B.C. Skin penetration of nonsteroidal antiinflammatory drugs out a lipophilic vehicle: influence of the viable epidermis. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.88, n.12, p.1326-1331, 1999.
- WESTER, R.C., MAIBACH, H.I. Animal models for percutaneous absorption. In: SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum, 1993. cap.18, p.333-349.
- WILLARD, H.H., MERRITT Jr., L.L., DEAN, J.A., SETTLE Jr., F.A. Fluorescence and phosphorescence spectrophotometry. In: _____. **Instrumental methods of analysis**. 7.ed. Belmont: Wadsworth, 1988. cap.8, p.197-223.

- 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.
- YUM, S., LEE, E., TASKOVICH, L., THEEUWES, F. Permeation enhancement with ethanol: mechanism of action through skin. In: HSIEH, D.S. **Drug permeation enhancement: theory and applications**. New York: Marcel Dekker, 1994. cap.8, p.143-170.
- ZATZ, J.L. **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured, 1993. 300p.
- ZATZ, J.L. Drug release from semisolids: effect of membrane permeability on sensitivity to product parameters. *Pharm. Res.*, New York, v.12, n.5, p.787-789, 1995.

9. RESUMO

Cetoconazol é um fármaco antimicótico largamente utilizado e veiculado por diversas formas farmacêuticas. Apesar de ser comprovadamente eficaz, é uma substância muito hepatotóxica quando administrado por via oral. Por esse motivo justifica-se o seu emprego em preparações tópicas e sistemas transdérmicos. Essa substância apresenta razoáveis níveis de penetração e/ou permeação cutânea, mas esses níveis podem ser melhorados através da incorporação, às formulações, de substâncias denominadas promotores de permeação/penetração (*enhancers*). Essas substâncias têm a função de modificar a difusão dos fármacos através da pele. Neste trabalho, foi estudada a liberação/permeação do cetoconazol de cremes O/A contendo os promotores de permeação/penetração, propilenoglicol e uma solução alcóolica de mentol, empregados em associação e isoladamente na concentração de 0 a 5% p/p.

O estudo foi conduzido *in vitro*, utilizando célula de Franz modificada com o emprego de membrana sintética de acetato de celulose. Foram preparadas e testadas dez formulações, a partir de uma fórmula de creme O/A não-iônico.

Dentre as dez formulações estudadas aquela que apresentou melhores resultados quanto aos parâmetros de fluxo e coeficiente de permeabilidade, após uma hora do início do experimento, foi uma formulação que apresenta 1% p/p de propilenoglicol e 1% p/p de solução alcóolica de mentol.

Palavras chaves: permeação cutânea, creme O/A, preparações tópicas, promotores de permeação/penetração, célula de Franz, membrana de acetato de celulose, cetoconazol, propilenoglicol, etanol, mentol.

10. ABSTRACT

Ketoconazole is an antifungal drug and is largely employed in many delivery systems and dosage forms. Oral administration is not recommended because of its hepatotoxic effects, so topical preparations are employed. This drug shows skin penetration and/or permeation levels, but these levels may be enhanced by the addition of enhancers. These substances modify the diffusion of drugs through skin.

In this work, the liberation/permeation of ketoconazole from O/W creams was studied. These creams have propylene glycol and na alcoholic menthol solution as enhancers, in a range from 0 to 5%w/w. It was an *in-vitro* experiment, employing Franz modified cells and synthetic cellulose membrane Ten nonionic O/W creams were made and tested.

Among the ten tested formulations the one which showed best results in flux and permeability coefficient, after 1 hour, was a formulation which has 1% w/w of menthol alcoholic solution concentrations.

Key words: skin permeation, O/W cream, topical preparations, enhancers, Franz cell, cellulose acetate membrane, ketoconazole, propylene glycol, ethanol, menthol.