**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área: Produção e Controle Farmacêuticos

**DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS DERMATOLÓGICOS
CONTENDO CORTICOSTERÓIDES: AVALIAÇÃO DA
LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO TRANSCUTÂNEA
POR METODOLOGIA *IN VITRO***

Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Tese para Obtenção do Grau de Doutor

Orientador:

Prof^ª Assoc. Érika Rosa Maria Kedor

São Paulo

1994

Trabalho realizado nos Laboratórios
de Farmacotécnica e Tecnologia
Farmacêutica, da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo,
sob financiamento da FAPESP.

Ao meu pai, MIGUEL e minha irmã
RAQUEL.

Ao meu marido GEOFFREY, que
sempre me apoiaram, incentivaram e
compreenderam.

A minha mãe, DARCI, por tudo que sempre foi e será para mim.

MÃE,

As leis divinas nos reuniram
e através da família o seu amor
perpetuou em nossos corações.

A nossa confiança em DEUS
e a certeza da imortalidade
do Espírito nos dá a confiança
de que “continuamos juntos”,
mesmo distantes.

Mãe, a certeza de nos reencontrarmos
nos encoraja para a vida
Nestas palavras, a minha homenagem
de amor, de carinho e de gratidão
para sempre.

À Prof. Assoc. ÉRIKA ROSA
MARIA KEDOR que, novamente foi
responsável pela minha orientação e
também pelo apoio, confiança e
amizade.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas e funcionários das Disciplinas de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, especialmente o Prof. Dr. NEWTON LONDOLFO PEREIRA pelas sugestões e apoio e a Profa. JULIANA MALDONADO MARCHETTI HERNANDES, pelas sugestões e apoio.

À minha grande amiga Prof. Dr.ª. PATRÍCIA MARIA BERARDO GONÇALVES MAIA CAMPOS pela dedicação, compreensão, apoio e incentivo incomparáveis.

À Prof. Dr.ª. MARIA INÊS ROCHA MIRITELLO SANTORO pelo apoio, estímulo e amizade.

Ao Prof. Dr. DERMEVAL DE CARVALHO, pelo estímulo, apoio e oportunidade de realizar parte deste trabalho em seu Laboratório.

Ao Prof. Dr. GERALDO MAIA CAMPOS, pela colaboração na realização dos testes estatísticos.

Ao Prof. Dr. JOHN COLLETT, pelas valiosas sugestões.

Aos Professores e funcionários do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio nos trabalhos em cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao Alexandre Maldonado Marchetti, pela grande colaboração prestada para a digitação deste trabalho.

À FAPESP pelo financiamento e oportunidade de realização deste trabalho.

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

MARIA VITÓRIA LOPES BADRA BENTLEY

“DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS DERMATOLÓGICOS CONTENDO
CORTICOSTERÓIDES: AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO TRANSCUTÂNEA
POR METODOLOGIA *IN VITRO*”.

Comissão Julgadora

Tese para Obtenção do Grau de Doutor.

Prof. Tit. Lúcia Rosa Maria Kedie.

Presidente e Orientador

Prof. Dea. Maria José Vieira Fonseca

1º. Examinador

Prof. Tit. Demerval de Carvalho

2º. Examinador

Prof. Dea. Silvia Stepienets.

3º. Examinador

Prof. Tit. João Henrique Helou.

4º. Examinador

São Paulo, 02 de agosto de 1994.

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO.....	01
2 -	REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1.	GENERALIDADES.....	05
2.2.	A PELE COMO VIA DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS.....	08
2.2.1.	Anatomia e fisiologia.....	08
2.2.1.1.	Epiderme.....	09
2.2.1.2.	Derme.....	10
2.2.1.3.	Apêndices da pele.....	10
2.3.	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS.....	13
2.3.1.	Terminologia.....	13
2.3.2.	Aparelhos utilizados nos testes <i>in vitro</i>	14
2.3.3.	Membranas utilizadas nos estudos de liberação <i>in vitro</i> de princípios ativos contidos em produtos dermatológicos.....	20
2.3.4.	Soluções receptoras utilizadas nos testes <i>in vitro</i>	25
2.3.5.	Estudos <i>in vitro</i> de liberação e absorção cutânea de corticosteróides.....	26
2.4.	SUBSTÂNCIAS QUE PROMOVEM A ABSORÇÃO CUTÂNEA.....	31
2.5.	HIDROGÉIS E SUA UTILIZAÇÃO EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	37
2.6.	ANÁLISE DE CORTICOSTERÓIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	39
3 -	PROPOSIÇÃO.....	42
4 -	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1.	MATERIAL.....	45
4.1.1.	Solventes, reagentes e matérias-primas.....	45

4.1.2. Soluções padrão.....	46
4.1.3. Equipamentos e acessórios.....	47
4.1.4. Animais de laboratório.....	50
4.1.5. Formulações desenvolvidas.....	50
4.1.5.1. Géis hidrófilos contendo uréia.....	50
4.1.5.2. Géis hidrófilos contendo lecitina.....	52
4.2. MÉTODOS.....	55
4.2.1. Determinação das propriedades físico-químicas das formulações.....	55
4.2.1.1. Determinação do pH.....	55
4.2.1.2. Determinação do comportamento reológico.....	55
4.2.2. Padronização da metodologia <i>in vitro</i> para os estudos de liberação e penetração transcutânea dos corticosteróides contidos nas formulações desenvolvidas.....	57
4.2.2.1. Célula de difusão <i>in vitro</i>	57
4.2.2.2. Solução receptora.....	62
4.2.2.2.1. Determinação do coeficiente de solubilidade dos acetatos de hidrocortisona e de dexametasona, da triamcinolona acetonida e da desonida nas duas fases receptoras.....	62
4.2.2.3. Membranas.....	63
4.2.3. Padronização da metodologia analítica para determinação de corticosteróides por CLAE.....	63
4.2.3.1. Condições cromatográficas.....	64
4.2.3.2. Procedimentos de extração.....	65
4.2.3.3. Curva padrão de calibração.....	65
4.2.3.4. Verificação da eficiência do processo de extração- determinação da recuperação relativa.....	66

4.2.3.5. Determinação por CLAE da quantidade de corticosteróides nas formulações desenvolvidas.....	68
4.2.3.6. Determinação por CLAE da quantidade de corticosteróide retida na pele de camundongos sem pêlo nos experimentos <i>in vitro</i>	68
4.2.4. Determinação do coeficiente de partição óleo/água dos corticosteróides empregados nas formulações.....	69
4.2.5. Condução dos experimentos de liberação e penetração transcutânea <i>in vitro</i> , utilizando a célula de difusão nº 3.....	69
4.2.6. Análise dos resultados.....	70
5 - RESULTADOS.....	71
5.1. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES.....	72
5.1.1. Determinação do pH.....	72
5.1.2. Determinação do comportamento reológico.....	73
5.2. PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA <i>IN VITRO</i> PARA OS ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO PERCUTÂNEA DOS CORTICOSTERÓIDES CONTIDOS NAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS.....	76
5.2.1. Células de difusão <i>in vitro</i>	76
5.2.2. Determinação dos coeficientes de solubilidade.....	77
5.3. PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CORTICOSTERÓIDES POR CLAE.....	78
5.3.1. Condições cromatográficas.....	78
5.3.2. Curva padrão de calibração.....	78
5.3.3. Verificação da eficiência do processo de extração - Determinação da Recuperação Relativa (Rr).....	91
5.3.4. Determinação por CLAE da quantidade de corticosteróides nas	

formulações de gel hidrófilos desenvolvidas.....	92
5.4. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA DOS CORTICOSTERÓIDES EMPREGADOS NAS FORMULAÇÕES.....	93
5.5. EXPERIMENTOS DE LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO TRANSCUTÂNEA <i>IN VITRO</i> , UTILIZANDO A CÉLULA DE DIFUSÃO Nº 3.....	94
6 - DISCUSSÃO.....	115
7 - CONCLUSÃO.....	130
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
9 - RESUMO.....	152
10-SUMMARY.....	154

1 - INTRODUÇÃO

Atualmente a Tecnologia Farmacêutica tem dado especial atenção à avaliação da eficácia terapêutica do produto acabado. Um produto farmacêutico elegante, estável e com dosagem correta, pode não proporcionar uma ação medicamentosa adequada. Vários fatores podem ser responsáveis por esta falha na atividade do produto, como por exemplo, os fatores fisiológicos, os quais dependem, na maioria das vezes, do paciente ou do substrato biológico da medicação. Nesta situação, o farmacêutico formulador não possui condições de atuar diretamente. Entretanto, existem vários fatores inerentes ao próprio fármaco, à forma farmacêutica, à formulação e ao processo tecnológico de fabricação, que influem, quase sempre de forma direta e expressiva, na disponibilidade dos medicamentos. Nestes casos, o papel do formulador é fundamental e sua responsabilidade indeclinável.

A determinação, a interpretação e a modulação da biodisponibilidade dos medicamentos, através de suas formulações, constituem, na realidade, os principais objetivos de uma ciência galênica denominada *Biofarmácia*, que está sendo extensamente difundida e praticada entre pesquisadores farmacotécnicos nos últimos anos. A prática da *Biofarmácia* requer, como premissa fundamental, uma formação farmacocinética básica, um conhecimento profundo dos mecanismos de liberação e absorção dos fármacos, bem como da modificação destes processos mediante meios físico-químicos e tecnológicos.

Nos produtos dermatológicos, a formulação que contém o princípio-ativo influencia de maneira significativa na ação final do medicamento. Isto porque, várias interações entre princípio(s) ativo(s) e veículo(s) são estabelecidas, interações estas, que podem modificar, como por exemplo, o coeficiente de partição do(s) fármaco(s) entre o veículo e a pele. Podem, também, alterar a integridade do estrato córneo e, nesta situação, a solubilidade do fármaco na camada córnea e/ou a facilidade com o qual ele se difunde através deste tecido, encontram-se afetadas.

A absorção de princípios-ativos na pele envolve dois passos consecutivos: a liberação dessa substâncias pelo veículo, e, sua subsequente absorção cutânea. Os princípios-ativos incorporados em veículos inadequados podem ser pouco ou nada absorvidos pela pele. Baseado neste fato, pode-se considerar que os estudos de liberação medicamentosa proporcionam

dados valiosos sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste em liberar os componentes ativos (23).

As características de liberação de um fármaco a partir de um veículo dermatológico podem ser avaliadas determinando-se o coeficiente de partição óleo/água do fármaco. Entretanto, estudos de liberação *in vitro* e *in vivo* proporcionam dados mais significativos. Durante a fase de desenvolvimento de produtos dermatológicos é adequado empregar procedimentos de liberação *in vitro* para selecionar veículos e adjuvantes farmacotécnicos, que em conjunto, possam proporcionar uma atividade terapêutica adequada.

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 (co-polímeros hidrófilos), associados a adjuvantes (principalmente alteradores da permeabilidade cutânea) que sejam biocompatíveis com as membranas celulares (5).

Os corticosteróides representam uma fatia expressiva do conjunto de fármacos destinados ao uso dermatológico. Esta classe de substâncias apresenta uma atividade anti-inflamatória na pele, e têm sido empregada no tratamento de diversas patologias cutâneas (30).

Baseado nas colocações acima e na importância das substâncias corticosteróides em dermatologia, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver preparações dermatológicas adequadas para a veiculação desses fármacos, fazendo uso de metodologia *in vitro* para a avaliação dos parâmetros: liberação e penetração transcutânea.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1. GENERALIDADES

Desde 1952, os corticosteróides têm ocupado uma posição de destaque entre as medicações usadas para o tratamento tópico de várias doenças cutâneas (107).

De maneira geral, os corticosteróides atuam na pele difundindo-se através das membranas celulares e formando complexos com receptores citoplasmáticos específicos, os quais, por meios bioquímicos estimulam a síntese de várias enzimas responsáveis pelo efeito anti-inflamatório dos corticosteróides (35). A Figura 1 mostra as fórmulas estruturais de algumas das substâncias corticosteróides utilizadas topicamente.

Atualmente, encontram-se no mercado cerca de 115 especialidades farmacêuticas de uso tópico contendo corticosteróides isolados ou em associação com agentes anti-microbianos (28). Os corticosteróides são utilizados topicamente devido sua potente ação anti-inflamatória na pele, sendo indicados no tratamento de eczemas, eczemas infantis, dermatite atópica, dermatite de contato, dermatite venerata, dermatite seborréica, neurodermatite, psoríase, intertrigem, etc. Quando presentes em loções, cremes, géis ou pomadas é possível aumentar a penetração da preparação na pele por meio de um penso oclusivo. A atividade anti-inflamatória na pele é aumentada através de reações de esterificação nas posições 17 ou 21 e pela formação de acetonidas cíclicas nas posições 16 e 17 (69).

Associada ao efeito anti-inflamatório a terapia cutânea com corticosteróides apresenta efeitos colaterais decorrentes da absorção sistêmica dessas substâncias, o qual dependerá do veículo utilizado em cada formulação. O uso de pensos oclusivos em grandes áreas de pele, bem como o uso prolongado desses medicamentos aumenta a absorção sistêmica dos corticosteróides. A medicação tópica com corticosteróides na gravidez, deve ser criteriosa e considerada a relação risco-benefício, uma vez que estudos em animais mostraram que o uso prolongado e em altas doses podem produzir malformações congênitas no feto (55, 107).

Os corticosteróides podem ser metabolizados na pele por meio de enzimas esterases. No entanto, as substâncias que contem grupos 17-hidroxi substituídos ou que são fluorados, apresentam maior resistência ao metabolismo local na pele. Assim, a aplicação repetida dessas

substâncias produz um depósito acumulativo na pele, resultando em um efeito farmacológico mais duradouro. Em contrapartida, os efeitos colaterais decorrentes da absorção sistêmica são exacerbados (35, 55, 107).

De maneira geral, os corticosteróides utilizados em dermatologia são praticamente insolúveis em água, solúveis em álcool, acetona e clorofórmio. A lipossolubilidade é requerida pois substâncias que possuem coeficientes de partição óleo/água elevados apresentam uma boa penetração na pele (55, 69).

Acetato de Hidrocortisona $R = -COCH_3$

Triamcinolona Acetonida $R = H$

Fluocinolona Acetonida $R = H$

Acetato de Dexametasona $R = -COCH_3$

Desonida

Acetato de Betametasona $R = COCH_3$ e $R' = H$

Figura 1: Fórmulas estruturais dos principais corticosteróides utilizados em dermatologia.

2.2. A PELE COMO VIA DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS

2.2.1. Anatomia e fisiologia

Para que possamos entender e controlar as características biofarmacêuticas das formulações dermatológicas é primeiramente necessário conhecer as características da pele.

A pele, o maior órgão do corpo humano, combina-se com as mucosas do trato respiratório, digestivo e urogenital, formando uma cápsula, que separa as estruturas internas do corpo do ambiente externo. Para um ser humano de 70 kg tem-se uma área superficial de pele igual 1,8 m², sendo que a cada centímetro quadrado podem-ser encontrados 10 folículos pilosos, 12 nervos, 15 glândulas sebáceas, 100 glândulas sudoríparas, 3 vasos sanguíneos com 92 cm total de comprimento, 360 cm de nervos e 3×10^6 células. Devido ser o tecido do corpo mais acessível, pode-se facilmente danificá-lo mecânica-, química-, e biologicamente e por irradiação (6).

A pele é composta por tecidos distintos, mas mutuamente dependentes: a epiderme celular, estratificada e avascular, e, a derme de tecido conectivo. Abaixo da derme tem-se a camada adiposa subcutânea (hipoderme). A figura 2 mostra as diferentes camadas da pele bem como seus apêndices.

Figura 2: A pele e seus apêndices (6).

2.2.1.1. Epiderme

A espessura da epiderme varia de acordo com a região do corpo, sendo mais espessa nas palmas das mãos e planta dos pés e mais fina ao redor dos olhos. Encontra-se estratificada, pela ordem na qual se forma, nas seguintes camadas (6):

- **Camada basal:** onde ocorre constantes mitoses para renovar a epiderme. Localiza-se na junção dermo-epidermal.

- **Estrato germinativo:** onde se observam alterações morfológicas e histoquímicas nas células. Tem-se nesta camada os queratinócitos.

- **Estrato granuloso:** onde os queratinócitos produzem grânulos de queratohialina, precursores da queratina.

- **Estrato lúcido:** presente nas palmas das mãos e planta dos pés. São regiões pobres em hialina, formando uma camada fina e translúcida logo acima do estrato granuloso.

- **Estrato córneo:** constitui a camada mais superficial da epiderme, onde as células estão em estágio final de diferenciação. Representa uma região importante no controle da absorção cutânea de fármacos. A permeabilidade seletiva desta estrutura apresenta-se como tema central em muitos aspectos biofarmacêuticos de medicamentos tópicos. É no estrato córneo que se tem o efeito reservatório, isto é, algumas substâncias (principalmente corticosteróides) podem ficar localizadas na forma de depósitos nesta região da epiderme (77, 99).

2.2.1.2. Derme

A derme representa uma camada mais espessa que a epiderme. Consiste basicamente de uma matriz de tecido conectivo formado por proteínas fibrosas (75% de colágeno, 4% de elastina, 0,4% de reticulina) envolvidas em mucopolissacarídeo. Encontram-se na derme os vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e os apêndices cutâneos.

2.2.1.3. Apêndices da pele

A região da derme e epiderme acomodam vários apêndices como: glândulas sebáceas e sudoríparas (écrinas e apócrinas) folículos pilosos e unhas.

A pele como um todo desempenha várias funções, como (6):

- a) **Função mecânica:** envolver fluidos e tecidos do corpo;
- b) **Função barreira:** proteger contra a entrada de microorganismos, substâncias químicas, radiação, calor e choque mecânico.

- c) Receber estímulos externos: tato, calor, dor;
- d) Regular a temperatura corpórea;
- e) Sintetizar e metabolizar substâncias;
- f) Secretar substâncias;
- g) Regular a pressão sanguínea.

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 no local. A pele e seus apêndices regulam a entrada de substâncias externas no organismo. A penetração de fármacos na pele pode ocorrer por duas vias (6):

- **Via transepidérmica:** representada pela via intra e intercelular. O estrato córneo representa principal barreira contra a entrada de substâncias;
- **Via apêndices:** representada pelo folículo pilossebáceo e poros.

Para uma dada substância penetrar na pele é necessário que primeiramente ocorra a difusão e liberação da mesma do veículo bem como sua partição nas diversas camadas da pele. As figuras 3 e 4 mostram, esquematicamente, as rotas de penetração e locais de atuação de várias classes de substâncias utilizadas em dermatologia (6, 105).

Figura 3: Representação da membrana do estrato córneo, ilustrando as duas possíveis rotas de penetração de substâncias (105).

CAMADAS DA PELE

ROTAS DE PENETRAÇÃO

MEDICAMENTOS

Figura 4: Rotas de penetração de substâncias medicamentosas na pele e exemplos de medicamentos apropriados para as patologias das várias camadas cutâneas (6, 32).

2.3. ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS

Os métodos *in vitro* possibilitam entender os fenômenos que ocorrem entre a administração do produto e o efeito medido farmacológica ou clinicamente, de maneira prática e rápida, sem a interferência de fatores biológicos. Geralmente, nos procedimentos *in vitro* para estudo de produtos dermatológicos, o princípio ativo difunde-se através de uma membrana artificial ou natural para uma solução receptora, onde é feita a determinação analítica do conteúdo de princípio-ativo liberado ao longo do tempo.

2.3.1. Terminologias

Antes de relatarmos os trabalhos realizados por vários autores, faz-se necessário esclarecer e uniformizar várias terminologias que são encontradas em diversos artigos científicos e livros, e, que também serão empregadas ao longo deste trabalho.

SHAH et al. (112) publicaram um interessante artigo no qual discorreram sobre os princípios e critérios para o desenvolvimento e otimização de produtos dermatológicos. Esses autores atentaram para o problema da mistura de termos que tem sido utilizados na designação dos processos que ocorrem nos estudos de liberação *in vitro* de medicamentos tópicos. Algumas definições foram estabelecidas, como:

- a) **Produto dermatológico:** o local de ação é a pele. Deve apresentar uma alta retenção do fármaco na pele e pequeno fluxo através da mesma.
- b) **Produto de ação transdérmica:** o efeito desejado é sistêmico. Deve apresentar baixa retenção do fármaco na pele e grande fluxo através da mesma.

- c) **Fluxo de uma substância na pele:** quantidade de substância que atravessa a pele em uma determinada área de superfície durante um intervalo de tempo.
- d) **Permeação e absorção transcutânea ou percutânea:** transporte de substância através da pele. Está relacionada com produtos transdérmicos.
- e) **Retenção cutânea:** localização de substâncias na pele.
- f) **Permeável:** capaz de ser atravessada ou capaz de atravessar a pele.
- g) **Retentiva:** capaz de aprisionar substância na pele ou capaz de ser aprisionada na pele.
- h) **Permeabilidade:** grau com que a pele é capaz de ser atravessada por uma substância.
- i) **Retentividade:** grau com que a pele é capaz de aprisionar uma substância.
- j) **Permeante:** substância que atravessa a pele.

2.3.2. Aparelhos utilizados nos testes *in vitro*

A literatura mostra que uma grande variedade de aparelhos, nos mais diferentes modelos, tem sido empregada em estudos de cinética de liberação e/ou permeação dos fármacos contidos em produtos de ação transdérmica e dermatológicos (18, 30, 34, 37, 38, 42, 47, 48, 61, 129).

Os aparelhos dos testes *in vitro* podem ser denominados de "células de liberação ou difusão", cujos modelos e funcionamento são os mais variados. De maneira geral, as células de

difusão funcionam por dois sistemas: a) fluxo contínuo, onde a solução receptora é bombeada continuamente, ou b) estático, onde o volume da solução receptora é o mesmo durante todo o experimento. TOJO (124) esquematizou de maneira aprimorável os sistemas e modelos mais comuns de difusão, conforme mostram as figuras 5 e 6.

Na figura 6, o modelo A representa um sistema de difusão horizontal, podendo ser fabricado para pequenos (3,4 mL) ou grandes volumes (140-290 mL), sendo que, a área de difusão (área da membrana disponível para a difusão) é proporcional a estes volumes. O modelo B mostra uma típica célula de difusão vertical projetada por FRANZ (34), e, que tem sido utilizada frequentemente em estudo de cinética de liberação e absorção percutânea. Já o modelo C, representa uma típica célula de difusão de FRANZ modificada, a qual foi elaborada para solucionar os problemas que a anterior apresentava quanto a homogeneidade de mistura no compartimento receptor. O modelo D esquematiza uma célula de difusão vertical com disco rotativo acoplado a um copo de dissolução da Farmacopéia Norte-Americana de um litro (89).

GUMMER et al. (42) atentaram para o problema da diferença no desempenho das diversas células de difusão utilizadas nos estudos *in vitro* de liberação e permeação cutânea. Estes autores realizaram um estudo comparativo com diversas células de difusão quanto a uniformidade de agitação no compartimento receptor, bem como, o volume da fase receptora. Baseado nos resultados obtidos, foram selecionadas duas células de difusão de fluxo contínuo, as quais apresentaram as seguintes especificações: pequeno volume, agitação instantânea, possibilidade de variação da área de superfície da membrana, e, também, compatibilidade com os aparelhos de agitação comumente utilizados em laboratório.

BRONAUGH et al. (13) verificaram a absorção percutânea da N-nitrosodietanolamina (impureza presente em produtos cosméticos) empregando uma célula de difusão semelhante a de FRANZ. Os autores utilizaram três veículos diferentes e pele humana dissecada neste estudo.

Sistemas estático

Sistema de fluxo contínuo

Figura 5: Sistemas de funcionamento de células de difusão *in vitro* (124).

O aparelho projetado por OLSZEWSKI e KUBIS (83) para estudo da liberação de princípios ativos contidos em bases de pomadas, permitiu o acompanhamento do processo de liberação continuamente, pois este era provido de um sistema de coleta de fração. Os testes realizados com pomadas contendo sulfatiazol mostraram-se adequados, apresentando resultados com boa reprodutibilidade.

Figura 6: Modelos de células de difusão para estudos de liberação e/ou permeação de fármacos contidos em produtos dermatológicos (124).

Figura 6: Continuação.

KNECZKE et al. (59) utilizaram uma célula de difusão estática para o estudo da liberação do ácido salicílico em vaselina sólida. Através deste estudo foi possível obter informações sobre a influência da concentração de ácido salicílico, bem como da viscosidade e da cristalinidade daquele veículo, na liberação do fármaco em questão.

Uma interessante célula de difusão automatizada foi projetada por ROLLAND et al. (96) para estudar a influência da formulação, solução receptora, e oclusão na liberação *in vitro* de fármacos contidos em formas farmacêuticas de uso tópico. O sistema era provido de bomba peristáltica, através da qual a solução receptora era constantemente bombeada para um detector e retornava para o compartimento receptor. Um sistema de fluxo diferente foi adaptado a uma célula de difusão proposta por BRONAUGH e STEWART (16), onde a solução receptora entrava em contato com a membrana de difusão através de perfusão, e as diversas amostras eram obtidas por meio de coletor de fração.

SCHEUPLEIN et al. (105) estudou os mecanismos de absorção percutânea por meio de uma pequena célula de difusão, a qual era composta por duas metades unidas por meio de uma presilha. Essas duas metades ficavam separadas por um disco perfurado que suportava uma membrana epidermal. Por meio deste aparelho, os autores verificaram a permeabilidade do estrato córneo a álcoois de diferentes pesos moleculares.

Um simples equipamento para estudo de liberação em sistema estático foi projetado por TURAKKA et al. (129). Tal aparelho consistia de um béquer onde era colocado a solução receptora. Uma membrana de diálise foi presa em uma das extremidades de um cilindro de vidro e inserido no béquer para que a membrana ficasse em contato com a fase receptora. O sistema todo era mantido 37 °C e as amostras coletadas periodicamente para posterior análise da quantidade de fármaco liberada.

A avaliação da cinética de absorção cutânea *in vitro*, considerando a viabilidade e o metabolismo da pele, pôde ser efetuada através de interessante e complexo aparelho construído por HOLLAND et al. (50). Neste equipamento as condições bioquímicas de uma membrana natural (pele dissecada de camundongo) foram mantidas por meio de fluxo de meio de cultura estéril, o qual era gaseificado com 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono. Nestas condições os

autores verificaram a permeação cutânea do benzopireno, bem como, o metabolismo cutâneo deste composto.

2.3.3. Membranas utilizadas nos estudos de liberação *in vitro* de princípios ativos contidos em produtos dermatológicos

Alguns experimentos de liberação *in vitro* são conduzidos na ausência de membrana e constituem, basicamente, na verificação da cinética de liberação de um fármaco presente em uma formulação para uma fase imiscível, a qual se supõe possuir propriedades semelhantes à pele. As limitações desses métodos recaem no fato de que não são consideradas as complexidades anatômicas, biológicas e físico-químicas da pele humana. BUSSE et al. (18) estudaram a liberação do 17-valerato de betametasona contido em pomadas, utilizando um sistema com uma fase oleosa líquida (a pomada) contendo o corticosteróide, flutuando sobre uma solução hidroalcoólica, representando a pele. Abaixo dessa solução estava uma fase clorofórmica que simulava a circulação sanguínea. As três camadas eram agitadas e a quantidade de corticosteróide liberada dosada na fase clorofórmica.

Os estudos de liberação *in vitro* aproximam-se mais das condições *in vivo* quando se utilizam sistemas com membranas. Devido as amostras de pele humana serem de difícil obtenção e variarem quanto a sua permeabilidade, muitos pesquisadores usam outros materiais para simulá-la. A membrana de acetato de celulose tem sido utilizada como uma membrana com características hidrófilas em células de difusão para estudos de liberação *in vitro*. TURAKKA et al. (129) verificaram a influência de diversos tensoativos na liberação dos ácido orto-, meta- e para-hidroxibenzoico contidos em bases triglicérides, utilizando uma membrana de éster de celulose em uma célula de difusão.

Um estudo comparativo da liberação do ácido salicílico de uma microemulsão e de emulsão água/óleo, foi realizado por STUPAR et al. (119). Foi observada a influência do tipo de membrana na quantidade de ácido salicílico liberada. Atingiu-se uma maior liberação quando uma

membrana lipófila (nitrato de celulose) foi empregada, e, uma menor liberação quando se associou tal membrana com outra de celulose regenerada.

SHAH et al. (113) utilizaram uma membrana composta por uma mistura de ésteres de celulose (acetato e nitrato de celulose) no estudo de liberação *in vitro* de cremes contendo 17-valerato de betametasona. O fluxo da liberação deste fármaco através da membrana foi calculado, e as curvas de liberação em regressão linear apresentaram ótimos coeficientes de correlação.

No estudo da liberação da prednisona, a partir de microemulsões óleo/água, GASCO et al. (38) empregaram membrana hidrófila impregnada com dodecanol. Esta membrana tratada foi pressionada sobre uma membrana hidrófila formando assim, um sistema com características hidrófilas e lipófilas.

Um sistema de membrana em multicamada foi projetado por NEUBERT et al. (78) para ser empregado em estudos de penetração de fármacos na pele. O referido sistema funciona, segundo os autores, como receptor e pode simular a penetração de substâncias na pele humana dissecada.

As membranas de dimetil-polissiloxano têm sido extensamente utilizadas em estudos de transporte de fármacos por serem hidrófobas, de fácil preparo e permeação (12, 19, 39, 59, 64, 79, 96).

KUROSAKI et al. (64) realizaram um estudo comparativo da permeação do ácido flufenâmico em três modelos de membranas: pele abdominal de rato, membrana de silicone e estrato córneo isolado de pele de cobaia. Foi possível verificar que os modelos de membranas hidrófobas, como as de silicone, são inadequados para avaliar o aumento da permeação percutânea de fármacos a partir de formas farmacêuticas contendo veículos que atuam no estrato córneo.

HATANAKA et al. (49) desenvolveram um sistema de membrana artificial composto por membrana de silicone e de poli-(2-hidroxietilmetacrilato), para estudos *in vitro* da permeabilidade cutânea de fármacos. Foi determinada a permeabilidade da membrana para vários fármacos, com diferentes propriedades físico-químicas e esta, comparada com a pele dissecada de ratos sem pêlo. Os resultados obtidos mostraram que a membrana desenvolvida apresentou uma propriedade barreira similar ao modelo de pele animal utilizado.

Dentre as membranas de origem natural, a pele humana é insubstituível nos estudos de penetração e permeação cutânea. Entretanto, devido às dificuldades na aquisição desta membranas, as peles de animais, como ratos (14, 47, 70, 104, 109), camundongos com e sem pêlo (17, 30, 33, 40, 52, 82, 94, 104), coelhos (27) cobaias e cricetos (64, 82, 120), porcos (94, 104), cães sem pelo (94), macacos (120, 132) tem sido empregadas como membranas naturais.

A pele humana pode ser obtida pela dissecação de cadáveres (13, 34, 100, 106, 110) cirurgias (75). Vários procedimentos são utilizados no tratamento das amostras de pele humana. SCHUMANN (106) utilizou pele humana da região abdominal, obtida 24 horas *post mortem* e mantida em refrigerador por um período máximo de 12 horas. Foi possível verificar, por testes *in vitro*, que o butilhidroxianisol, adjuvante presente em várias formulações tópicas, penetra nas diversas camadas da pele. Foram considerados fatores como quantidade aplicada, área da pele exposta aos produtos, bem como metabolismo do referido fármaco na pele.

FRANZ (34) obteve ótimas correlações entre os dados de absorção percutânea, obtidos por métodos *in vitro* e *in vivo*, de 12 compostos orgânicos. Segundo o autor, a utilização de amostras de pele humana armazenadas em congelador, por um período de três meses, não alterou as características de permeabilidade desta membrana natural.

A penetração de substâncias em pele dissecada pode ser verificada utilizando somente a camada epidérmica. BRONAUGH et al. (13) aqueceram amostras de pele abdominal humana, em água a 60 °C, por alguns segundos, removeram a epiderme, e a utilizaram nos estudos *in vitro* de penetração percutânea da N-nitrosodietanolamina, eventualmente contida em veículos cosméticos.

O limitado número de amostras de pele humana, bem como a deterioração da sua função barreira durante a armazenagem são fatores limitantes, durante a execução de numerosos experimentos. REGNIER et al. (93) propuseram a obtenção de uma epiderme reconstituída a partir de queratinócitos humanos. A medida da absorção percutânea do ácido benzóico, da testosterona e da hidrocortisona revelaram que, sob as mesmas condições experimentais, a epiderme reconstituída exibiu uma função barreira com propriedades qualitativas similares a da pele humana normal, ou seja, as substâncias hidrófilas penetraram mais rapidamente do que as hidrófobas.

No sentido de verificar a validade dos resultados *in vitro* de absorção percutânea, através da pele humana e em vários modelos animais, PRÍBORSKY e MÜHLBACHOVÁ (91) realizaram um estudo comparativo com pele de rato, cobaia, coelho, porco, desmamado, camundongo e pele humana. A absorção percutânea de soluções de erioglaucina (Azul Brilhante) foi verificada em todas essas amostras de pele, sendo, o modelo animal que mais se aproximou à pele humana foi a cobaia.

WESTER e MAIBACH (131) encontraram boa correlação nos dados de absorção percutânea do ácido benzóico, da testosterona e da hidrocortisona em experimentos *in vivo* com macaco Rhesus e com humanos.

A pele de camundongo sem pêlo foi empregada em alguns estudos e apresentou-se adequada para substituir a pele humana (30). No entanto, a utilização de pele de camundongo sem pêlo em estudos *in vitro* de absorção cutânea, deve ser feita de maneira cautelosa, uma vez que, este tecido parece ser susceptível a algumas alterações quando comparados com a pele de cadáver humano. O aumento da permeabilidade da camada córnea da pele desses animais pode ocorrer devido à excessiva hidratação, ao tratamento com acetona e com promotores de penetração. Quanto à hidratação, a permeabilidade é aumentada, em relação a pele humana, somente após dois dias de experimento. Até este período, a pele de camundongo sem pêlo pode ser empregada assegurando-se uma boa semelhança a pele humana, conforme mostra a Figura 7 (7, 11).

Figura 7: Coeficientes de permeabilidade para a água em função do tempo de hidratação para as peles de cadáver humano e de camundongos sem pêlo (7).

Em extenso estudo realizado por BRONAUGH et al. (15) foram determinadas as características da pele humana e de diferentes espécies de animais, tais como espessura das camadas da pele, densidade e tamanho dos folículos pilosos, e constante de permeabilidade a diferentes compostos. Os autores concluíram através dos dados obtidos e da literatura, que a escolha do modelo animal é dependente das características físico-químicas da substância que se pretende verificar a absorção percutânea.

Muito recentemente, alguns autores estudaram o uso de pele de cobra (*Elaphe obsoleta*) como modelo de membrana natural para estudos de permeação. A facilidade de obtenção desta pele e o fato de não ser necessário sacrificar o animal são fatores vantajosos em relação a pele de cadáveres humanos (128, 133).

2.3.4. Soluções receptoras utilizadas nos testes *in vitro*

A escolha da solução receptora colocada nas células de difusão *in vitro* deve ser feita criteriosamente, objetivando garantir o sucesso do experimento. Em muitos estudos, prefere-se a solução isotônica tamponada a pH = 7,4 como fase receptora (23, 71, 102). Entretanto, sempre é necessário garantir "sink conditions", ou seja, a atividade termodinâmica do fármaco no fluido receptor não deve exceder 10% da sua solubilidade de saturação para, assim, ser garantida uma permeação favorável, e, assegurar uma eficiente coleta do permeante (131).

Substâncias hidrófobas, as quais podem ser definidas como substâncias com baixa solubilidade em água, solúveis em solventes orgânicos e altos valores de coeficiente de partição óleo/água, possuem uma dificuldade em se partilhar para um meio receptor aquoso. Assim, o uso de meios não aquosos ou tampões isotônicos contendo solubilizantes parece ser uma alternativa.

BRONAUGH e STEWART (14) verificaram a absorção cutânea de dois princípios aromáticos de natureza hidrófoba através de metodologia *in vitro*. Soluções receptoras lipófilas substituíram a solução fisiológica, objetivando tentar melhorar a absorção e aproximar com os resultados obtidos *in vivo*. Assim, o soro de coelho e diluições aquosas de albumina de soro

bovino, solventes orgânicos e quatro tensoativos não iônicos, foram empregados como solução receptora. A solução aquosa de polietilenoglicol-20-oleil-éter a 6%, foi a que apresentou melhores resultados, uma vez que os seguintes fatores foram associados: boa correlação com o teste *in vivo*, e, pequena danificação na membrana (pele dissecada de rato) usada no teste *in vitro*.

A solubilidade do fármaco na solução receptora e o fato desta não alterar a forma farmacêutica por difusão através da membrana, foram os fatores que ROLLAND et al. (96) levaram em consideração na escolha da solução receptora em seus experimentos. Foram empregadas uma substância lipófila (derivado do ácido naftóico), uma membrana de silicone, duas fases receptoras (n-octanol e solução aquosa de Polisorbato 80 a 0,25%), bem como quatro bases tópicas. A solução aquosa de tensoativo apresentou-se mais adequada, uma vez que o n-octanol atravessou a membrana e dissolveu algumas das formas farmacêuticas utilizadas.

SURBER et al. (120) verificaram que a adição de 3,0% de polietilenoglicol 20 ou 3,0% de albumina, na fase receptora, aumentou o fluxo da acitretina através da pele de macaco nos experimentos *in vitro*.

No sentido de aproximar os resultados *in vitro* com as situações *in vivo*, SCOTT e RAMSEY (108) testaram diferentes soluções receptoras para avaliar *in vitro*, a absorção percutânea de um inseticida piretróide através da pele de rato. As soluções aquosas de etanol a 50,0%, de polietilenoglicol-20 cetiléter (Cetomacrogol 1000) a 6,0% e de soro de carneiro, apresentaram-se adequadas para o estudo.

2.3.5. Estudos *in vitro* de liberação e absorção cutânea de corticosteróides

A literatura referente aos estudos *in vitro* de liberação e absorção cutânea de corticosteróide é extremamente extensa. Os trabalhos mais significativos estão relatados a seguir.

TANAKA et al. (121) utilizaram o acetato de dexametasona como um modelo de fármaco para investigar a influência da solubilidade e da distribuição de uma substância em emulsões óleo/água nas características de liberação da preparação. A quantidade de acetato de

dexametasona liberada de emulsões contendo 3,0% de Polisorbato 80 foi aumentada mas, quando a concentração do fármaco era superior a 500,0 mg/mL, cristais do mesmo foram observados, e a liberação não foi mais influenciada pelo aumento da concentração do tensoativo.

Os corticosteróides fluocinonida e flucloronida foram avaliados quanto à sua liberação *in vitro* a partir de pomadas hidrófobas contendo diferentes tensoativos (23). Os resultados obtidos mostraram que o tipo de tensoativo influencia na liberação, pois as interações físico-químicas entre fármaco e tensoativo ocorrem de maneira diferente para cada substância tensoativa.

AMERONGEN et al. (2) verificaram a liberação do corticosteróide budesonida em duas preparações comerciais utilizando uma célula de difusão de fluxo contínuo e membrana sintética. Para validação do processo de difusão foram otimizadas a solução receptora, a velocidade do fluxo, a quantidade de produto aplicado etc. A budesonida apresentou uma lenta liberação quando estava incorporada em uma pomada gordurosa e rápida liberação em cremes água/óleo.

NIEMI et al. (81) determinaram *in vitro* a liberação da hidrocortisona a partir de cremes óleo/água contendo lauril sulfato de sódio, cetomacrogol 1000 ou cetrimida. O lauril sulfato de sódio apresentou uma influência positiva na liberação do fármaco. Este fato foi relacionado, pelos autores, à sua maior capacidade de solubilização do corticosteróide.

Em recente trabalho, NEUBERT et al. (79) verificaram a liberação *in vitro* de formulações tópicas comerciais contendo 17-valerato de betametasona e hidrocortisona. Os resultados obtidos mostraram que para uma mesma substância corticosteróide o perfil de liberação difere de produto para produto. Este fato pode, segundo os autores, acarretar preparações não bioequivalentes.

Várias formulações foram testadas por SMID-KOBAR et al. (117) quanto a liberação *in vitro* do fosfato sódio de dexametasona e da dexametasona base. Os dados obtidos foram discutidos com relação à composição, à viscosidade do veículo, à estrutura interna do sistema, bem como às propriedades dos fármacos.

SHAH et al. (113) obtiveram uma boa correlação entre o ensaio *in vivo* de vasoconstrição e a liberação *in vitro* do 17-valerato de betametasona e hidrocortisona contidas em cremes comerciais. O fluxo do corticóide através de uma membrana sintética e a velocidade de liberação foram determinados para cada formulação. As diferenças de liberação entre as amostras de um mesmo fabricante foram atribuídas às diferenças na origem das matérias-primas e na manufatura dos produtos.

A liberação da triamcinolona-acetonida através da epiderme humana foi verificada por KADIR et al. (58). A influência de promotores de absorção percutânea também foi determinada mostrando que estes influenciam no coeficiente de partição da triamcinolona-acetonida entre o estrato córneo e o veículo.

COLDMAN et al. (24) conduziram um estudo *in vitro* para examinar a penetração percutânea da fluocinolona-acetonida e seus ésteres a partir de veículos contendo diferentes quantidades de isopropanol, associados com propilenoglicol ou miristato de isopropila. A penetração foi aumentada quando da evaporação do isopropanol, e quando a atividade termodinâmica do corticosteróide foi aumentada nos veículos não voláteis. A precipitação do fármaco em veículos saturados atuou de maneira negativa na penetração.

Os parâmetros: fluxo do permeante, resistência da membrana, coeficiente de partição, coeficiente de difusão, atividade termodinâmica, e outros, foram determinados por KUBOTA et al. (62) quando avaliaram a absorção *in vitro* da betametasona base e do 17-valerato de betametasona em solução aquosa. O corticóide mais lipófilo (éster) partilhou-se, preferencialmente, nas camadas viáveis da pele (derme e epiderme viável).

SHAHI e ZATZ (115) avaliaram o efeito da formulação no fluxo da hidrocortisona através da pele de camundongo. Os autores concluíram que o fluxo deste fármaco, contido em géis ou soluções, varia inversamente com a concentração de propilenoglicol e independe da concentração de 2-propanol.

PANCHAGNULA e RITSCHER (86) comprovaram através de estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* que o dietilenoglicol monoetil éter aumenta a penetração da dexametasona e da hidrocortisona na pele, e, diminui a permeação dessas substâncias através da pele. Os parâmetros

solubilidade e coeficiente de partição óleo/água, quantidade de fármaco retido na pele, e, distribuição dos fármacos nas camadas da pele, foram determinados e considerados quando da interpretação dos resultados.

A absorção transcutânea, em pele de rato, da triamcinolona-acetonida e outros fármacos, derivados da pirrolidona, foi verificada por SASAKI et al. (102). Segundo esses autores, a retenção cutânea e o incremento na permeação desses fármacos foi decorrente da presença dos derivados de pirrolidona.

A cinética de permeação percutânea da triamcinolona-acetonida foi verificada *in vitro* por CHOW et al. (22) utilizando membrana sintética e pele de camundongo sem pêlo. Os autores verificaram que a penetração através da membrana sintética foi diferente da membrana natural. O efeito promotor da penetração percutânea do 1-dodecilazocicloheptano-2-ona foi dependente da sua concentração, e, avaliado segundo os seguintes parâmetros: fluxo do corticosteróide através das membranas, efeito reservatório na pele de animal, coeficiente de partição do fármaco entre a membrana e o veículo, bem como constante de difusão do permeante na membrana.

MIREJOVSKY e TAKRURI (73) realizaram interessante estudo do comportamento *in vitro* e *in vivo* de promotores de absorção na penetração cutânea e percutânea da hidrocortisona em pele viva e dissecada de camundongos sem pêlo. A hexametilenolauramida apresentou-se como adequado promotor de absorção cutânea para a hidrocortisona, mesmo em baixas concentrações.

A penetração de dois corticosteróides tópicos, fluocinolona-acetonida e fluocinonida, através da pele humana foi investigada para várias formulações de géis hidrófilos contendo propilenoglicol em diferentes concentrações (85). A liberação, a penetração, e os resultados *in vitro* e *in vivo* indicaram que o comportamento *in vivo* é diretamente dependente da penetrabilidade do fármaco em estudo.

O acetato de hidrocortisona e o 17-valerato de betametasona foram empregados como modelos de fármacos no estudo de penetração e retenção cutânea realizado por MICHNIAK et al. (71). Os autores utilizaram pele de camundongos sem pêlo em células de difusão, para avaliar o efeito de ésteres e amidas do ácido clofíbrico como promotores de absorção. As amidas proporcionaram uma melhor retenção cutânea e penetração transcutânea para o fármaco que os

demais derivados. Os autores, diante dos resultados obtidos sugeriram as amidas do ácido clofibrico como adjuvantes eficazes e inócuos.

2.4. SUBSTÂNCIAS QUE PROMOVEM A ABSORÇÃO CUTÂNEA

Durante vários anos, pesquisadores tem sugerido diversas substâncias adjuvantes, as quais, temporariamente, podem alterar a permeabilidade da pele. Tais substâncias, se inócuas, poderiam ser usadas em dermatologia para aumentar a penetração de fármacos, e, ainda, para tratar pacientes sistemicamente pela via cutânea. A seguir tem-se o conjunto de propriedades as quais uma substância deve possuir para ser utilizada como "promotora de absorção cutânea" (6):

- a) Ser farmacologicamente inerte e não possuir ação nos sítios receptores da pele ou do corpo de maneira geral;**
- b) Não ser tóxica, irritante ou alergênica;**
- c) Sua ação deve ser imediata à aplicação e a duração do efeito deve ser adequado;**
- d) Quando removida da pele, o tecido deve recuperar imediata e completamente suas propriedades normais de barreira;**
- e) Ser química e fisicamente compatível com uma grande variedade de fármacos e veículos farmacêuticos;**
- f) Ser um excelente solvente para os fármacos;**
- g) Possuir boa espalhabilidade;**
- h) Incorporar-se em loções, suspensões, pomadas, cremes, géis, aerossóis e adesivos cutâneos;**
- I) Possuir baixo custo, não possuir odor e cor e ser cosmeticamente aceitável.**

Infelizmente, não existe um único adjuvante que satisfaça completamente todas estas exigências. Entretanto, algumas substâncias possuem muitos desses atributos, e foram investigadas clinicamente ou em laboratório, conforme relatado a seguir.

HORI et al. (51) classificaram os promotores de absorção cutânea em diagrama, segundo suas propriedades físico-químicas. Duas áreas foram delimitadas no diagrama. Uma delas representou os compostos com maiores características hidrófilas, incluindo substâncias como o propilenoglicol, o etanol, os derivados da pirrolidona e o dimetilsulfóxido. Na outra área, fizeram parte os compostos hidrófobos como o ácido oleico, o álcool e o ácido lauricos, o miristato de isopropila, o 1-dodecilazacicloheptano-2-ona, o n-decil metil sulfóxido e o n,n-dimetil-m-toluamida.

As diferenças de hidrofilia e lipofilia das várias substâncias promotoras de absorção cutânea fazem com que as mesmas atuem por mecanismos diferentes. A figura 8 ilustra a via polar e apolar pelas quais esses adjuvantes podem exercer seus efeitos na pele (7).

Um extenso estudo foi realizado por BARRY e BENNETT (8) com promotores de absorção cutânea. Os modelos de fármaco polar (manitol) e apolar (hidrocortisona e progesterona) foram empregados para avaliar *in vitro* o modo de ação de vários promotores de absorção: a) solventes que promovem a penetração de fármacos polares e apolares, tais como os derivados da pirrolidona, a n-metilformanida e o propilenoglicol associado a Azona; b) promotores que afetam a rota polar de penetração, tais como o propilenoglicol associado ao decil-metil-sulfóxido; e c) acelerantes, os quais preferencialmente modificam a rota apolar, como o propilenoglicol isolado e associado ao ácido oleico.

O fato do a-bisabolol não possuir ação irritante ou tóxica na pele viva levaram KADIR e BARRY (57) a avaliarem, por meio de metodologia *in vitro*, sua atividade como promotor de penetração cutânea para produtos dermatológicos e de ação transdérmica. Os autores verificaram que amostras de pele humana pré-tratadas com misturas de a-bisabolol-propilenoglicol 1:1 apresentaram-se 17 vezes mais permeáveis ao 5-fluoruracil e 63 vezes mais permeáveis a triamcinolona-acetonida, quando comparadas com a pele não tratada. Os estudos de

calorimetria realizados sugeriram que o α -bisabolol atua aumentando a fluidez dos lipídeos da pele, facilitando assim, a penetração de fármacos pouco difusíveis.

O dimetilsulfóxido representa a substância mais estudada nos últimos anos como promotor de absorção cutânea (6, 26, 33, 54). O mecanismo pelo qual o dimetilsulfóxido altera a permeabilidade cutânea ainda não está completamente elucidado. Em baixas concentrações, esta substância parece formar pontes de hidrogênio com a água, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, substâncias iônicas etc. Tal fato facilitaria a migração de fármacos através da pele. Um outro modo possível de ação para o dimetilsulfóxido seria a capacidade deste em danificar ou produzir grandes mudanças estruturais na pele, quando em altas concentrações. A alta atividade osmótica do dimetilsulfóxido pode distorcer a estrutura laminada do estrato córneo, inchá-lo, e induzir a formação de canais. Estes, por sua vez, promoveriam a passagem de vários fármacos. Apesar da confirmada capacidade em facilitar a penetração cutânea de fármacos, o uso do dimetilsulfóxido deve ser feito de maneira cautelosa devido ao inconveniente da irritação cutânea causada por este produto (123).

Os derivados de pirrolidona tem sido empregados juntamente com vários fármacos para promover a penetração e estabelecer um reservatório para estes no estrato córneo (1, 103). SASAKI et al. (102) investigaram o efeito acelerante de penetração cutânea de uma combinação de duas pirrolidonas (1-metil-2 e 1-lauril-2-pirrolidona). A penetração do 5-fluoruracil foi exacerbada na presença da combinação, viabilizando, assim, a via de administração transdermal para este fármaco.

Figura 8: Mecanismo de ação de promotores de absorção na pele (7).

A azona (azocicloalcano-2-ona) também é um composto que tem a capacidade de alterar a permeabilidade cutânea (6, 10, 41). Sua aplicação é sugerida em preparações tópicas contendo anti-bacterianos, antifúngicos, corticosteróides, iododeoxiuridina e 5-fluorouracil.

O propilenoglicol e o etanol são solventes muito empregados como promotores de penetração na pele. A concentração de propilenoglicol na preparação é um fator crítico uma vez que o excesso desta substância pode aumentar o coeficiente de partição veículo/pele, comprometendo, assim, a liberação do fármaco (8, 10, 26, 85). Em muitos casos, esses líquidos funcionam como co-solventes para produzir soluções saturadas ou quase saturadas do princípio-ativo, e, dessa forma, maximizar a atividade termodinâmica do penetrante. Essa otimização leva a um aumento da absorção percutânea, ainda que o estrato córneo esteja inalterado (6).

Os tensoativos representam uma classe de substância que alteram progressivamente a natureza da barreira cutânea, facilitando, assim, a penetração de fármacos. Os cremes contêm tensoativos como agentes emulsificantes, porém, nas concentrações utilizadas, essas substâncias provavelmente possuem um pequeno efeito na permeabilidade cutânea. Entretanto, eles podem alterar as características da pele de tal forma que promovam a passagem de substâncias hidrófilas (6, 10, 29, 46, 101).

DI COLO et al. (29) verificaram a influência das interações fármaco-tensoativo e pele-tensoativo na absorção percutânea de dois fármacos (benzocaína e 2-etilhexil p-dimetilaminobenzoato), os quais diferem em suas propriedades lipófilas. Os resultados obtidos sugeriram que os tensoativos empregados (monooleato de sorbitano e n-lauril éter de polioxietileno) interagiram tanto com os fármacos como com a pele. O grau destas interações são dependentes da polaridade dos tensoativos e dos fármacos.

Recentemente, KONTURRI et al. (60) realizaram um estudo da caracterização eletroquímica da pele humana por meio de espectroscopia, no sentido de avaliar os efeitos do acetato de dodecil-n,n-dimetilamino e da azona neste tecido. Estes alteradores da permeabilidade cutânea parecem abrir novas rotas de penetração e aumentar a desordem da matriz lipoidal. Em consequência foram aumentadas a resistência ôhmica, as propriedades capacitivas e a dimensão fractal da pele.

O ácido oleico apresentou-se efetivo como acelerador da permeação da ergotamina através da pele de coelho. Preparações contendo 10% de ácido oleico aumentaram cerca de 50 vezes a quantidade do fármaco penetrada após 24 horas, quando comparada com formulações-controle (80).

Sob o ponto de vista da segurança e da eficácia, provavelmente a água seja o melhor promotor de penetração. Quase todos os fármacos são melhor penetráveis no estrato córneo hidratado do que no tecido seco. Baseado neste fato, a princípio, qualquer substância a qual seja inerte farmacologicamente e promover a hidratação do estrato córneo, pode ser considerada um acelerador de penetração. Como exemplos, podemos citar o Fator de Hidratação Natural (FHN), os seus análogos e a uréia. Alguns umectantes naturais localizam-se na pele, protegidos por um componente lipídico. Esses umectantes, comumente denominados como FHN, podem ser extraídos do estrato córneo pela água, após tratamento com solvente. A composição do FHN é a seguinte: 40% ácidos graxos livres, 12% ácido carboxílico-pirrolidona, 7% uréia, 5% sódio, 1,5% cálcio, 4% potássio, 12% lactato etc (6).

A uréia tem sido empregada em cremes contendo corticosteróides no sentido de aumentar a hidratação cutânea do estrato córneo e, assim, promover a penetração dos fármacos. A uréia modifica o estado de hidratação da camada córnea, porém, para ela atuar deve-se aguardar um tempo suficiente. Alguns estudos verificaram que cremes contendo 10% de uréia aumentam a penetração cutânea de corticosteróides (6, 72). Para outros fármacos, a presença da uréia na formulação não influenciou a permeação através de pele (80).

A lecitina constitui um emulsificante natural, e, devido a sua semelhança com os fosfolipídeos das membranas naturais, são atualmente adjuvantes biocompatíveis empregados em produtos dermatológicos. CHOWHAW e PRITCHARD (23) estudaram a liberação de corticosteróides contido em pomada hidrófoba na presença de vários tensoativos e álcoois graxos, além da lecitina. Os resultados obtidos mostraram que este fosfolipídeo, quando na concentração de 5%, aumentou consideravelmente a velocidade de liberação dos corticóides.

2.5. HIDROGEIS E SUA UTILIZAÇÃO EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Os hidrogéis heterogêneos são formados a partir de mistura de polímeros, de co-polímeros segmentados ou de polímeros interpenetrantes. Estes veículos tem sido muito investigado como carreadores de fármacos, devido as seguintes características: a) grande compatibilidade com os tecidos devido a mínima irritação mecânica resultante do seu alto conteúdo aquoso; e b) propriedades de transporte de massa dos hidrogéis manipulados por nível ou cinética de intumescimento (24, 87, 126). A combinação de polímeros hidrófilos e hidrófobos produz hidrogéis compostos com fases separadas. O processo de combinação é um método simples, o qual associa as vantagens dos diferentes materiais, assim, o polímero resultante, algumas vezes, apresenta propriedades sinérgicas. As vantagens do sistema de combinação de polímeros no controle de liberação de fármacos estão relacionados com a facilidade na fabricação das preparações, a manipulação das propriedades das preparações (hidratação, velocidade de degradação e força mecânica), a carga de fármaco e a utilização da fase dispersa predominante como um microreservatório para aumentar as propriedades de liberação. Alguns sistemas de hidrogéis são sintetizados usando segmentos de polímeros hidrófilo/hidrófobo, blocos ou enxertos de co-polímeros e polímeros conjugados por ligações químicas covalentes. Os co-polímeros anfifílicos formados por dois ou três blocos podem ser sintetizados com polioxietileno biodegradável ou não (5).

O interesse na aplicação de um bloco específico de co-polímero (polioxietileno/polioxipropileno/polioxietileno) na liberação de fármacos está baseada em sua transição gel-sol termo-reversível. Este bloco de co-polímero contém aproximadamente 70,0% de polioxietileno e um peso molecular de 12.500. No comércio pode-se encontrar este produto sob duas denominações Pluronic® PF-127 ou Poloxamer 407. Devido as características de sua estrutura molecular, este bloco de co-polímero forma micelas em solução aquosa e exhibe gelatinização termo-reversa em concentrações acima de 20,0%, isto é, apresenta-se como um líquido à baixas temperaturas e um gel quando atinge a temperatura ambiente (126).

ATTWOOD e colaboradores (3) estudaram as propriedades micelares do bloco de co-polímeros polioxietileno / polioxipropileno em água e em soluções de eletrólitos por espectroscopia de fóton, dispersão de luz e viscosimetria. Os autores verificaram, por esses métodos, que o aumento da temperatura resulta em uma desidratação micelar. Esta desidratação micelar é causada por mudanças conformacionais nas cadeias de polioxipropileno, levando a expulsão da água além de um aumento no volume anidro da micela. O aumento do tamanho micelar foi um outro fator observado nos experimentos.

TOMIDA et al. (126) verificaram as características de liberação *in vitro* do diclofenaco e da hidro cortisona incorporados de géis de Poloxamer 407. O aumento da concentração do co-polímero no gel diminuiu a liberação do corticóide. No caso do diclofenaco, o pH do gel foi crítico no controle de sua velocidade de liberação, sugerindo a ocorrência de interações entre a forma ionizada de fármacos hidrófobos com as micelas não iônicas do co-polímero.

Os blocos de co-polímeros a base de óxidos de etileno e propileno tem apresentado interesse como agentes solubilizantes. COLLETT e TOBIN (25) verificaram a relação que existe entre a estrutura de vários blocos de co-polímeros e solubilização de algumas acetanilidas para-substituídas. Os autores concluíram que a solubilização destas substâncias parecem depender tanto da estrutura do co-polímero como da natureza do soluto.

2.6. ANÁLISE DE CORTICOSTERÓIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As metodologias analíticas empregadas em experimentos *in vitro* de liberação e penetração cutânea devem ser seletivas e de alta sensibilidade, uma vez que são pequenas as quantidades de fármacos a serem dosados. Os métodos mais adequados são o radioimunoensaio e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (112).

A CLAE tem sido empregada em muitos estudos de liberação *in vitro* e absorção *in vivo* de corticosteróides (63, 71, 86, 102, 113). Para a análise dessas substâncias em formas farmacêuticas, a metodologia por CLAE também é adequada.

ORR et al. (84) empregaram a CLAE como metodologia analítica para verificar a uniformidade de dosagem em sete pomadas comerciais contendo hidrocortisona a 1%. Após extração com dimetilpentano e metanol, o conteúdo de hidrocortisona foi determinado utilizando-se fase móvel metanol: água (75:25) a um fluxo de 1,4 mL/min, coluna Spherisorb 5ODS (25 cm x 4,6 mm), volume de injeção de 20,0 mL e norestisterona como padrão interno.

O diacetato de diflorasona foi quantificado em cremes e pomadas através de CLAE, sob as seguintes condições: coluna de sílica (10 cm x 4,6 mm) de 3 mm de diâmetro: fase móvel cloreto de butila, saturado por água: cloreto de metileno, saturado por água: tetrahydrofurano: ácido acético (350:125:10:15), fluxo de 2,5 mL/min e diacetato de isoflupredona como padrão interno. As amostras foram submetidas a extração com clorofórmio e posteriormente à análise por CLAE a 254 nm. A recuperação do diacetato de diflorasona nas diferentes amostras ficaram em torno de 100%. O método proposto apresentou-se reprodutível e adequado para utilização em estudos de estabilidade (116).

GAGNE e LODGE (36) analisaram o fosfato sódico de dexametasona contido em preparações farmacêuticas (soluções oftálmicas, injeções e inalantes) através de CLAE. As determinações foram realizadas após diluição das amostras e padrão interno com a fase móvel dihidrogênio-fosfato de potássio a 0,07 M: tetrahydrofurano: metanol (300:18:182), fluxo de 1,5

mL/min, coluna cromatográfica C_{18} (30 cm x 3,9 mm), 5 μ L de injeção e detecção a 254 nm. O padrão interno foi o dietilftalato. O método empregado apresentou linearidade em 0,15 a 1,50 μ g e coeficiente de correlação igual a 0,9999. O fosfato de dexametasona pôde ser detectado na presença de excipientes e fármacos, os quais normalmente estão presentes nas formulações examinadas.

TOKUNAGA et al. (125) desenvolveram um ensaio por CLAE para a determinação de vários corticosteróides que normalmente estão presentes em cremes e pomadas. As condições cromatográficas empregadas foram coluna de fase reversa C_{18} , fase móvel acetonitrila: água (45:55 ou 55:45). As amostras sofreram prévia extração em coluna de sílica eluídas com diclometano e metanol (4:1). Através deste método foi possível separar e quantificar o acetato de cortisona e de dexametasona, a fluormetolona, e o valerato de betametasona das preparações dermatológicas.

Um sensível e seletivo método por CLAE em fase reversa foi desenvolvido por MARON et al. (67) para a determinação e verificação da estabilidade do 17-benzoato de betametasona contido em veículos hidrófobos. A 17-metiltestosterona foi empregada como padrão interno. A extração do corticóide foi realizada com metanol e acetonitrila (7:2), cromatografadas em coluna de fase reversa C_{18} , fase móvel metanol: acetonitrila: água (7:2:4), e detectadas no ultra-violeta a 254 nm. O método apresentou linearidade nas concentrações de 25 a 62,5 μ g/mL.

A determinação de corticosteróides em fluidos biológicos por CLAE é muito empregada em estudos de biodisponibilidade. TOOTHAKER et al. (127) realizaram um estudo comparativo entre a CLAE com detecção no ultra-violeta e fluorescência para analisar a hidrocortisona em plasma humano. O método cromatográfico empregou a 4-pregnona-17 α , 21-triol-3, 11-diona como padrão interno. A hidrocortisona foi extraída das amostras de plasma, previamente basificadas, por cloreto de metileno. O resíduo seco da fase orgânica foi ressuspensão na fase móvel (solução aquosa de metanol a 60%) e 20 mL foram injetados no cromatógrafo. Os autores empregaram pré-coluna (2,1 x 70 mm) e coluna de fase reversa (4,6 x 250 mm), através da qual foi bombeada a fase móvel a um fluxo de 1,0 mL/min. A detecção ocorreu a 254 nm e os tempos de eluição foram 10 e 8 min para hidrocortisona e o padrão interno, respectivamente. O

método acima apresentou uma linearidade entre 5,0 e 700,0 ng/mL e boa correlação com o método de CLAE com detector de fluorescência.

A determinação simultânea da betametasona, do acetato de betametasona e da hidrocortisona em fluidos biológicos foi realizada por PETERSEN et al. (88) através de CLAE. O acetato de hidrocortisona foi empregado com padrão interno e as amostras (plasma, sangue e urina) foram extraídas com diclorometano seguido de cromatografia em um sistema de fase reversa (coluna C₈ de 250 mm x 4,6 mm e 10 µm de diâmetro) e, eluição com a fase móvel metanol: água (60:40). A detecção a dois comprimentos de onda (254 nm e 240 nm) foi empregada para ensaiar a especificidade do sistema e a sensibilidade encontrada foi 10 ng de cada corticosteróide. Os autores não utilizaram a alcalinização no processo de extração para evitar a hidrólise dos ésteres. A estabilização destes ésteres nas amostras de fluidos biológicos foi possível com a utilização de sal sódico do ácido etilenodiaminotetracético a concentração de 0,1% p/v.

ROSE e JUSKO (97) desenvolveram um sensível, específico e reprodutível método de CLAE para determinação simultânea da prednisona, prednisolona e cortisol em fluidos biológicos, empregando a dexametasona como padrão interno. As amostras foram extraídas com cloreto de metileno, lavadas com solução de hidróxido de sódio e cromatografada em uma coluna de sílica microparticulada, com detecção no ultra-violeta a 254 nm. A fase móvel empregada foi metanol: cloreto de metileno (3:97) com fluxo de 2,0 mL/min. A sensibilidade do método foi maior do que 15 ng para os quatro corticosteróides, apresentado-se adequado para o acompanhamento da biodisponibilidade da prednisona em pacientes que fazem uso deste fármaco.

3 - PROPOSIÇÃO

Este trabalho foi planejado com as seguintes fases de execução:

- 1 -** Preparo de formulações dermatológicas a base de bloco de Poloxamer 407 contendo como adjuvante uréia ou lecitina, para incorporação de corticosteróide;
- 2 -** Padronização da metodologia *in vitro* para os estudos de liberação, penetração transcutânea e retenção cutânea na pele de animal;
- 3 -** Padronização da metodologia analítica para determinação dos corticosteróides por CLAE nas formulações, nos estudos de liberação e na pele de animal;
- 4 -** Estudos *in vitro* de liberação, penetração transcutânea e retenção cutânea dos corticosteróides contidos nas formulações desenvolvidas.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas

- Acetato de hidrocortisona; USP XXI
- Acetato de dexametasona; USP XXI
- Triamcinolona-acetonida; USP XXI
- Desonida; USP XXI
- Timerosal; USP XXI
- Bloco de co-polímero (POE/POP/POE) - Pluronic® PF-127, BASF Wyandotte Corp.;
- Uréia p.a.; Reagen;
- Propilenoglicol p.a.; Reagen;
- Vaselina líquida, FAVAb;
- Lecitina (L- α -fosfatidilcolina de soja, Catálogo Sigma nº P5638, Lote 121H0048);
- Mistura de metil, etil, propil e butil-parabeno e fenoxietanol - Phenonip®, Croda;
- Cloreto de sódio p.a., MERCK;
- Fosfato monobásico de sódio p.a., Ecibra;
- Fosfato dibásico de sódio p.a., Ecibra;
- Polietilenoglicol-20 etil éter (Catálogo Sigma nº 5884, Lote 120H0360);
- Metanol para cromatografia Lichrosolv®, MERCK;
- Clorofórmio p.a., MERCK.
- Miristato de isopropila (Catálogo Sigma nº 8136, Lote 53H0375);
- EDTA sódico p.a., Reagen;

4.1.2. Soluções padrão

- Solução estoque de desonida (11 β , 21-Dihidroxi-16 α , 17 α -isopropilidenodioxypregna-1, 4-dieno-3,20-diona) na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ (Padrão interno), em metanol;
- Solução estoque de triamcinolona-acetonida (9 α -Flúor-11 β , 21-Dihidroxi-16 α , 17 α -isopropilidenodioxipregna-1, 4-dieno-3, 20-diona) na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, em metanol;
- Solução estoque de acetato de hidrocortisona (21-Acetoxy-4-pregnen-11 β , 17 α , 21-tiol-3,20-diona, Catálogo Sigma nº H-4126, Lote 62H0654) na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, em metanol;
- Solução estoque de acetato de dexametasona (9 α -Flúor-16 α -metil-11 β , 17 α , 21-Trihidroxi-1,4-pregnadieno-3,20-diona-21-acetato, Catálogo Sigma nº D-1881, Lote 107F0949), na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e 4,0 $\mu\text{g/mL}$ (Padrão interno), em metanol;
- Solução estoque de dexametasona (9 α -Flúor-11 β , 17 α , 21-Trihidroxi-16 α -metilpregna-1, 4-dieno-3, 20-diona, Catálogo Sigma nº D-1756, Lote 23H0091) na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, em metanol;
- Solução estoque de hidrocortisona (11 β , 17 α , 21-Trihidroxipregna-4-eno-3,20-diona Catálogo Sigma nº H-4001, Lote 13H0525) na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, em metanol.

4.1.3. Equipamentos e acessórios

- Cromatógrafo líquido, modelo CG 480-C, acoplado a um detector ultra-violeta, com comprimento de onda fixado a 254 nm, volume do injetor igual a 20,0 µL.
- Coluna cromatográfica LICLOCART RP-18-50957/0001 - MERCK, 125 mm x 4 mm, 5 µm;
- Pré-coluna RP-18-50957/0001 - MERCK, 4mm x 4mm, 5µm;
- Registrador potenciométrico CG, modelo 1001;
- Membranas para filtração de solventes orgânicos MILLIPORE® (FHUP), 0,5 µm;
- Ultra-som, Microsonic, modelo SX-20;
- Agitador mecânico TAYO S-SF, tipo "Mixer";
- Agitador mecânico horizontal (220 ± 10 ciclos/min), Pachane, modelo TE 240;
- Balança analítica "Mettler" H 10W, para carga máxima de 160 g;
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 1 a 100 mL, 100 a 1000 mL e 1 a 10 mL.
- Microseringa de 25 mL - HAMINTON;

- Papel de filtro qualitativo, 12,5 cm de diâmetro;
- Unidades filtrantes descartáveis, 0,5 μm , 13 mm de diâmetro - Membrana hidrófila modificada PTFE, Catálogo Sigma nº Z22.742-0, Lote 93H0959);
- Pipeta de polietileno para transferência de líquidos - SIGMA, capacidade 2 mL;
- Centrífuga FANEN, Modelo 201;
- Balões volumétricos de 10, 50 e 100 mL;
- Pipetas graduadas de 1, 5 e 10 mL;
- Pipetas volumétricas de 1 mL;
- Funil de vidro;
- Funil de separação de 500 mL;
- Béqueres de vidro de 40 e 80 mL;
- Luvas cirúrgicas;
- Tesoura e pinça para dissecação;
- Tubos de extração de 13 x 100 mm, com tampa esmerilhada;
- Tubos cônicos de 16 mL;

- Aparelho de dissolução - SOTAX AT 7;
- Viscosímetro RHECOTEST 2.1 (VEB-MLW-DDR, Lamedid);
- Banho termostatzado - circulação de água, VEB MLW-Prüfgerate - WERK Medingen Sitz Freital;
- Medidor de pH - DIGMED;
- Agitador magnético;
- Células de liberação *in vitro*;
- Bomba à vácuo;
- Membranas de diálise, acetato de celulose 33mm x 30m/12-14.000 P.M.;
- Tubos plásticos de 2 mL para coleta e armazenamento de amostras, SIGMA;
- Folhas de papel alumínio;
- Potes plásticos com capacidade para 100 g.

Observações: As vidrarias foram submetidas a lavagem com ácido clorídrico 6N, durante 12 horas e enxaguadas com água destilada antes do uso.

4.1.4. Animais de laboratório

Camundongos sem pêlo, machos com quatro a seis semanas de idade, linhagem HRS/J, Laboratórios Jackson, Bar Harbor, Me, gentilmente doados pelos Laboratórios Johnson & Johnson, Brasil.

4.1.5. Formulações desenvolvidas

As formulações dermatológicas descritas a seguir foram empregadas nos experimentos do presente trabalho.

4.1.5.1. Géis hidrófilos contendo uréia

As preparações contendo uréia encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Formulações de géis hidrófilos contendo uréia

Componentes	% p/v				
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅
Poloxamer 407	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Propilenoglicol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Uréia	2,0	4,0	8,0	12,0	15,0
Corticosteróide	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
Mistura de metil, propil e butil-parabeno e fenoxietanol	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
EDTA sódico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Água destilada - qsp	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Para cada uma das cinco formulações de géis hidrófilos foram adicionados os seguintes corticosteróides:

- Acetato de hidrocortisona (AHC), 1,0% ou
- Acetato de dexametasona (ADM), 0,1% ou
- Triamcinolona-acetonida (TA), 0,1% ou
- Desonida (D), 0,05%.

A preparações foram manipuladas com a seguinte técnica de preparo:

- Dissolveram-se a uréia, a mistura de conservantes, e o EDTA sódico em aproximadamente 80,0 mL de água destilada. Nesta solução dispersou-se o Poloxamer 407 em banho de gelo sob constante agitação. Após total hidratação e dispersão do polímero, transferiu-se o produto obtido para um balão volumétrico de 100 mL, o qual também foi mantido em banho de gelo. Dissolveu-se em separado a quantidade adequada de corticosteróide em 5,0 mL de propilenoglicol e verteu-se esta solução para o balão volumétrico. Completou-se o volume com água destilada, agitou-se e transferiu-se o produto obtido, ainda à baixa temperatura ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), para potes de 100 g. Após atingir a temperatura ambiente, obtiveram-se géis viscosos, transparentes e incolores.

4.1.5.2. Géis hidrófilos contendo lecitina

As preparações contendo lecitina encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Formulações de géis hidrófilos contendo lecitina.

Componentes	% p/v			
	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄
Poloxamer 407	18,0	18,0	18,0	18,0
Propilenoglicol	5,0	5,0	5,0	5,0
Lecitina	1,0	2,0	4,0	8,0
Vaselina líquida	5,0	5,0	5,0	5,0
Corticosteróide	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
Mistura de metil, etil, propil e butil-parabeno e fenoxietanol	0,75	0,75	0,75	0,75
EDTA sódico	0,1	0,1	0,1	0,1
Água destilada qsp	100,0	100,0	100,0	100,0

Da mesma forma que nas formulações de géis contendo uréia, foram adicionados os corticosteróides em concentrações adequadas nas formulações acima.

A técnica de manipulação dessas preparações foi realizada da seguinte maneira:

- Dispersou-se, em banho de gelo, o co-polímero em aproximadamente 70,0 mL de água destilada, sob constante agitação. Verteu-se este produto para um balão volumétrico de 100 mL o qual foi mantido sob banho de gelo. Adicionou-se a mistura de conservantes e o EDTA sódico. Em separado dispersou-se a lecitina em 5,0 mL de vaselina líquida em um béquer, sob leve aquecimento. Transferiu-se a dispersão obtida para o balão volumétrico, agitou-se e adicionou-se o corticosteróide previamente dissolvido em 5,0 mL de propilenoglicol. Completou-se o volume

com água, agitou-se e verteu-se o produto ainda à baixa temperatura, para potes plásticos de 100 g. Na temperatura ambiente obtiveram-se produtos viscosos, leitosos e de cor levemente amarelada.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Determinação das propriedades físico-químicas das formulações

4.2.1.1. Determinação do pH

A determinação do pH dos géis obtidos foi realizada em medidores de pH, após diluição dos produtos em água na proporção 1:10.

4.2.1.2. Determinação do comportamento reológico (6)

A reologia das formulações desenvolvidas foi determinada em o viscosímetro RHEOTEST 2.1.. Este equipamento é um viscosímetro de rotação e serve para a determinação das propriedades reológicas de líquidos newtonianos e não newtonianos. Permite avaliar os seguintes fenômenos de escoamento: viscosidade, dilatância, plasticidade, tixotropia e reopexia.

No presente trabalho, 25,0 g de cada uma das formulações foram colocadas na fenda anular de um sistema de cilindros coaxiais. O cilindro externo estacionário, forma o recipiente de medição e contém o produto a ser ensaiado. O cilindro interno rotatório gira sob uma velocidade angular constante. Esse cilindro fica unido pelo eixo de medição a uma mola helicoidal cilíndrica, cujo o desvio constitui uma medida do momento de torção (M). Através desse valor calculou-se a tensão de cisalhamento (τ) e o gradiente de cisalhamento (D), segundo as fórmulas:

- Tensão de cisalhamento (τ)

$$\tau = M / 2.\pi.l.r^2$$

onde: M = momento de torção;

r = raio do cilindro interno;

l = altura do cilindro interno;

Unidade de τ = dina/cm²

- Gradiente de cisalhamento

$$D = (\omega.R^2.2) / (R^2 - r^2)$$

onde: ω = velocidade angular;

R = raio do cilindro externo;

r = raio do cilindro interno;

Unidade de D = s⁻¹

- Viscosidade

$$\eta = \tau / D$$

Unidade de η = cPoise

As viscosidades foram medidas utilizando-se das combinações de cilindros bIIC/SI, que são adequadas para produtos de média viscosidade.

Uma vez obtidos os dados numéricos pelos testes reológicos, traçou-se a curva de histerese característica da amostra. O resultado é uma figura fechada e irregular (Reograma), cuja área traduz a tixotropia da amostra testada. Os gráficos obtidos relacionam os valores de tensão de cisalhamento no eixo das abscissas e os valores de gradiente de cisalhamento no eixo das ordenadas.

4.2.2. Padronização da metodologia *in vitro* para os estudos de liberação e penetração transcutânea dos corticosteróides contidos nas formulações desenvolvidas

4.2.2.1. Célula de difusão *in vitro*

Foram projetados três modelos diferentes de célula de difusão em sistema estático. As células nº 1 e nº 2 foram confeccionadas em vidro PIREX e acrílico. A célula nº 3 é feita em acrílico, e representa um modelo de dissolução da Farmacopéia Norte-Americana (89). Na Tabela 3 encontram-se descritas as dimensões, a capacidade e demais características das células de difusão projetadas. As figuras 8, 9 e 10 ilustram com detalhes estas células de difusão.

Tabela 3 - Características das células de difusão projetadas.

Características	Célula de Difusão		
	nº 1	nº 2	nº 3
Volume do compartimento receptor (mL)	300	30	300
Área disponível para a difusão (cm ²)	8,04	3,80	8,04
Sistema de agitação	Aagitador magnético (6mm x 20mm)	Aagitador magnético (3mm x 10mm)	Aagitador externo pá (15mm x 55mm)
Sistema de difusão	estático	estático	estático

Figura 8: Célula de difusão *in vitro* nº 1, baseada nos modelos de TURAKKA et al. (129) e BADRA et al. (4).

Figura 9: Célula de difusão *in vitro* nº 2, baseada no modelo da célula de FRANZ modificada (34).

Figura 10: Célula de difusão *in vitro* nº 3, baseada no modelo da Farmacopéia Norte-Americana (89).

Os parâmetros, descritos a seguir, foram avaliados quando da eleição do modelo de célula de difusão *in vitro* que mais se adequasse aos propósitos do trabalho, como:

a) Verificação do tempo e uniformidade de agitação no compartimento das células de difusão

Para esta avaliação foi empregado o método proposto por GUMMER et al. (42). Foram colocados 300,0 mL de água destilada nas células nº 1 e nº 3, e 30,0 mL na célula nº 2, juntamente com um cristal de permanganato de potássio. As células nº 1 e nº 2 eram providas de uma barra magnética para agitação, e a célula de nº 3 foi agitada por meio de um agitador externo em forma de pá, o qual girava em uma velocidade constante de 100 rpm. O agitador magnético, por sua vez não fornecia o número exato de rotações por minuto dados pela barra magnética.

A uniformidade da coloração violeta resultante da dissolução do cristal de permanganato de potássio foi empregado como parâmetro para verificar visual e qualitativamente o grau de agitação. Considerou-se uma homogeneização instantânea e adequada quando o cristal dissolveu-se e a coloração da fase receptora apresentou-se completamente uniforme dentro de 30 segundos.

b) Controle de Temperatura

Como pode ser verificado nas figuras 8, 9 e 10, as células de difusão projetadas estão submetidas a banhos termostatizados para manutenção do sistema à temperatura de 37 °C. O controle desta temperatura foi realizado através de medidas da temperatura da solução receptora durante um período de 10 horas de funcionamento do sistema.

4.2.2.2. Solução receptora

Utilizou-se como fase receptora tampão fosfato isotônico a pH = 7,4 . No sentido de otimizar esta fase receptora para os testes *in vitro*, ou seja, para garantir perfeitas condições de solubilização e difusão dos corticosteróides através das membranas, também foi testado o mesmo tampão acrescido de polietilenoglicol-20-cetil éter a 0,5% p/v (2,71). A contaminação foi evitada adicionando-se 0,01% p/v de timerosal (69).

4.2.2.2.1. Determinação do coeficiente de solubilidade dos acetatos dehidrocortisona e de dexametasona, da triamcinolona-acetonida e da desonida nas duas fases receptoras.

O método utilizado foi o proposto por MAITANI et al. (66). Um excesso de cada corticosteróide (500,0 mg) foi adicionado em 300,0 mL de cada solução receptora a ser testada, em um copo de dissolução descrita pela Farmacopéia Norte-Americana (89). O sistema foi agitado a 100 rpm e mantido a 37 °C por 24 hs. Após este período filtrou-se a dispersão em membrana filtrante de 0,5 mm, desprezando-se os primeiros 20,0 mL, para evitar o risco de adsorção dos corticosteróides na membrana. O filtrado obtido foi diluído 1:100 com a respectiva solução receptora no caso dos acetatos de hidrocortisona e de dexametasona, da triamcinolona-acetonida, e da desonida em solução receptora sem tensoativo. O filtrado com desonida em solução receptora com tensoativo foi diluído 1:1000 com a respectiva fase receptora. Após as diluições apropriadas, foram efetuadas as determinações das concentrações de saturação dos corticosteróides por CLAE.

4.2.2.3. Membranas

Foram empregadas uma membrana sintética acetato de celulose e uma natural (pele dissecada do abdômen de camundongo sem pêlo) nos estudos *in vitro* de liberação e penetração transcutânea, respectivamente.

A membrana de acetato de celulose sofreu prévio tratamento em água destilada a 100 °C por 5 minutos, para remoção de impurezas. Foi mantida em água destilada, a 4 °C até o momento do uso. Pedacos de aproximadamente 6 cm x 6 cm foram cortados e adaptados na célula de difusão *in vitro*.

A membrana natural foi obtida por dissecação da pele abdominal de camundongos machos sem pêlo, após sacrificá-los por asfixia com éter. A superfície da pele foi limpa com algodão embebido em etanol, e extraídas com auxílio de tesoura e pinça para dissecação. Retirou-se o tecido subcutâneo e gorduroso presente abaixo da derme, e certificou-se da integridade da pele, ou seja, se esta apresentava-se livre de qualquer tipo de lesão ou alterações. As amostras de pele dissecadas foram embrulhadas em folhas de papel alumínio e filme plástico, congeladas e utilizadas, no máximo, 24 horas depois. Quando do seu uso, essas amostras de pele foram descongeladas naturalmente a temperatura ambiente, e colocadas nas células de difusão *in vitro*.

4.2.3. Padronização da metodologia analítica para determinação de corticosteróides por CLAE

Foram padronizadas metodologias para análise por CLAE, dos seguintes corticosteróides: acetatos de hidrocortisona e de dexametasona, desonida, e triamcinolona-acetonida, baseando-se no método proposto por TOOTHAKER et al. (127).

4.2.3.1. Condições cromatográficas

Para a definição dos parâmetros cromatográficos, tais como comprimento de onda, composição da fase móvel e atenuação, procedeu-se a cromatografia de amostras de cada uma das soluções estoques descritas no item 4.1.1. As condições estabelecidas foram as seguintes:

Fase móvel: metanol: água (60:40);

Fluxo da fase móvel: 1,0 mL/min;

Comprimento de onda: 254 nm;

Atenuação: 0,02 AUFS;

Volume de injeção: 20,0 µL.

Uma vez que sempre analisaríamos os vários corticosteróides em separado, utilizamos um como padrão interno do outro da seguinte forma:

- Desonida (200 ng): padrão interno para o acetato de dexametasona;
- Acetato de dexametasona (400 ng): padrão interno para a desonida, acetato de hidrocortisona e triamcinolona-acetonida.

Para a obtenção da fase móvel utilizou-se água e metanol previamente filtrados em sistema "Millipore". Após a mistura das quantidades adequadas de metanol e água, a solução obtida foi deaerada sob sonicação por 10 minutos, seguido de agitação sob vácuo por igual período de tempo.

4.2.3.2. Procedimentos de extração

Amostras de 1,0 mL da solução receptora dos experimentos *in vitro* foram transferidas para um tubo de extração de 13 x 100 mm dotado de tampa esmerilada, e acrescidos de 100,0 µL de solução estoque de padrão interno. A extração foi realizada com 6,0 mL de clorofórmio sob agitação em "Mixer" durante 1 minuto. Após a extração, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos, para ocorrer a separação das fases. A fase aquosa foi retirada por meio de pipeta de polietileno e desprezada. A fase orgânica foi transferida para tubos cônicos, sendo então o solvente evaporado sob fluxo de ar. O resíduo seco, assim obtido, foi ressuspensão em 100,0 µL da fase móvel sob agitação durante 20 segundos em "Mixer". Após isto, procedia-se imediatamente à cromatografia da amostra. A figura 11 mostra esquematicamente o procedimento de extração para análise dos corticosteróides na solução receptora.

4.2.3.3. Curva padrão de calibração

Triplicatas de quantidades conhecidas de solução estoque dos acetatos de hidrocortisona e de dexametasona, desonida e triamcinolona-acetonida, variando de 5 ng a 800 ng foram adicionadas no branco da solução receptora (tampão fosfato isotônico acrescido de 0,5% p/v de polietilenoglicol-20 cetil éter), juntamente com os respectivos padrões internos. Após extração e cromatografia, mediram-se as alturas dos picos correspondentes a cada corticosteróide (h), e dividiram-se esses valores pelas alturas respectivas dos padrões internos (h_{pi}), obtendo-se assim os valores da relação $R = h/h_{pi}$. A curva de calibração foi obtida pela projeção, no eixo das abcissas (X), dos valores das concentrações de corticosteróides (ng/mL); e, no eixo das ordenadas (y), dos três valores de R referentes aos três cromatogramas obtidos para cada concentração.

4.2.3.4. Verificação da eficiência do processo de extração - Determinação da recuperação relativa

Para verificação da percentagem de recuperação relativa, quantidades das soluções estoques, referentes a quatro pontos da curva de calibração, foram pipetadas para tubos cónicos, acrescidos de padrão interno, e secas sob fluxo de ar. O resíduo obtido foi ressuspenso na fase móvel e cromatografado. A relação entre a altura do padrão e a altura do pico do padrão interno foi comparada com a mesma relação referente a curva extraída, e determinaram-se as percentagens de recuperação relativa para os quatro pontos da curva extraída.

- * Análise de triamcinolona-acetonida, desonida e acetato de hidrocortisona - Padrão interno - Solução acetato de dexametasona a 4,0 µg/mL.

Análise de acetato de dexametasona - Padrão interno - Solução de desonida a 2,0 µg/mL.

Figura 11 - Fluxograma referente ao processo de extração para a determinação dos corticosteróides na solução receptora.

4.2.3.5. Determinação por CLAE da quantidade de corticosteróides nas formulações desenvolvidas

A metodologia empregada foi a mesma para todos os corticosteróides, procedendo-se da seguinte maneira:

- Quantidades de géis contendo uréia ou lecitina referentes a 100,0 mg de corticosteróide foram pesadas em béquer de 25 mL, dissolvidas em 15,0 mL de metanol e transferidas para um balão volumétrico de 50 mL, onde completou-se o volume com metanol. Da solução obtida, pipetaram-se 200,0 µL para um tubo cônico, acrescentaram-se 100,0 µL da solução estoque do respectivo padrão interno, e secou-se sob fluxo de ar. O resíduo seco obtido foi ressuspenso em 100,0 µL da fase móvel e cromatografado.

4.2.3.6. Determinação por CLAE da quantidade de corticosteróide retida na pele de camundongos sem pêlo nos experimentos *in vitro*

A extração dos corticosteróides retidos na pele animal foi baseada no método proposto por SASAKI et al. (102) e TAUBER et al. (122). Decorridas 24 horas de experimento *in vitro*, a pele de camundongo sem pêlo foi retirada do aparelho de difusão. A superfície da pele sobre a qual foi depositada a preparação foi limpa por meio de algodão embebido em metanol, objetivando retirar o excesso de produto da pele. Após este procedimento recortou-se a área da pele exposta à difusão, picotou-se, e os fragmentos obtidos foram transferidos para um tubo de plástico contendo 25,0 mL de metanol. Os fragmentos de pele foram triturados em homogeneizador de tecidos até total dilaceração da pele. Após isto, a suspensão obtida foi submetida à sonicação em ultrassom de alta frequência durante 45 segundos, em intervalos de 15 segundos, para ocorrer o rompimento das células. O produto obtido foi filtrado em papel de filtro para um balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume e agitou-se. Aliquotas de 1,0 mL foram transferidas

para um tubo cônico acrescidas de 100,0 μ L da solução de padrão interno e secas sob fluxo de ar. O resíduo foi ressuspenso na fase móvel e cromatografado.

4.2.4. Determinação do coeficiente de partição óleo/água dos corticosteróides empregados nas formulações

Para a determinação do coeficiente de partição óleo/água da desonida, triamcinolona-acetonida e acetatos de hidrocortisona e de dexametasona foi empregado o método proposto por OSTRENGA et al. (85).

Em um funil de separação de 500 mL, adicionaram-se 150,0 mL de miristato de isopropila contendo 0,02 mg/mL de corticosteróide, e 150,0 mL de água. Vedou-se a tampa do funil com teflon e agitou-se em agitador mecânico horizontal, em 220 ciclos/min durante 24 horas na temperatura ambiente. Após este período, separaram-se as fases, e analisou-se, individualmente o conteúdo de corticosteróide. Os coeficientes de partição óleo/água foram calculados como sendo a relação da concentração de corticosteróide na fase oleosa (miristato de isopropila) e na água.

4.2.5. Condução dos experimentos de liberação e penetração transcutânea *in vitro*, utilizando a célula de difusão nº 3

As membranas foram esticadas em uma das extremidades do cilindro de vidro por meio de anel de borracha. Quando utilizou-se a pele de camundongo sem pêlo, tomou-se o cuidado para que o lado inferior da derme ficasse em contato com a solução receptora. Cerca de 1,5 mL das preparações, ainda a 4 °C, foram pipetadas sobre a epiderme. A preparação ainda fluida foi espalhada uniformemente sobre toda a área da membrana, evitando-se a formação de bolhas. Após atingir a temperatura ambiente (alguns segundos depois) o cilindro de vidro foi acoplado à célula de difusão, a qual previamente foi equilibrada a 37 °C, e ajustado de maneira que a extremidade

que contem a membrana ficasse mergulhada, cerca de 2 mm, na solução receptora. O sistema de agitação foi acionado (100 rpm/min) e amostras de 2,0 mL da fase receptora foram coletadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas para a determinação do conteúdo de corticosteróide liberado ou penetrado por CLAE. Para manter o volume constante, a cada coleta retornaram-se 2,0 mL de solução receptora nova.

Quando do emprego da membrana natural, após 24 horas de experimento, a área de pele exposta para a liberação foi limpa, com algodão embebido em metanol, recortada e analisada quanto ao conteúdo de corticosteróide retido, conforme descrito no item 4.2.3.6.

Com relação as formulações contendo lecitina, também foram realizados experimentos de penetração e retenção cutânea dos corticosteróides contidos nas formulações sem lecitina.

Os experimentos foram realizados em quadruplicatas para todas as formulações.

4.2.6. Análise dos resultados

Os dados de liberação e penetração transcutânea obtidos foram utilizados para calcular os parâmetros cinéticos tempo LAG e fluxo (J) dos corticosteróides através das membranas. Para tanto, dois modelos cinéticos foram utilizados. O modelo HIGUCHI (22, 45, 71, 96, 113) relaciona a quantidade de fármaco liberado ou penetrado versus a raiz quadrada do tempo. A interceptação no eixo das abcissas destas curvas, em regressão linear, representou o tempo LAG em horas^{1/2}. O fluxo (J) é dado pela inclinação da curva e foi expresso em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{horas}^{1/2}$. O segundo modelo empregado foi o de cinética de 1ª ordem, onde o Log das quantidades de fármaco liberado ou penetrado é plotado contra o tempo (100). Os parâmetros LAG e fluxo (J) foram expressos em horas e Log $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{horas}$, respectivamente.

5 - RESULTADOS

5.1. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES

5.1.1. Determinação do pH

Os valores de pH para as várias formulações estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de pH das formulações de géis hidrófilos contendo uréia e lecitina.

Formulações*		pH ^{***}
Géis com uréia (n = 3)	G ₁	5,7 (± 0,015)
	G ₂	5,4 (± 0,006)
	G ₃	6,3 (± 0,003)
	G ₄	6,3 (± 0,003)
	G ₅	6,3 (± 0,007)
Géis com lecitina (n = 3)	L ₁	5,9 (± 0,033)
	L ₂	6,1 (± 0,017)
	L ₃	6,1 (± 0,017)
	L ₄	6,2 (± 0,017)

* A presença dos corticosteróides não alterou os valores de pH; os valores em parênteses representam os desvios padrão.

5.1.2. Determinação do comportamento reológico

As figuras 12 e 13 ilustram os reogramas referentes às formulações desenvolvidas.

A Tabela 5 mostra os valores de viscosidade das formulações desenvolvidas, em uma mesma velocidade angular.

Tabela 5 - Valores de viscosidade das formulações desenvolvidas.

Formulações		Viscosidade (cPoise)*
Géis contendo uréia	G ₁	63.261,32
	G ₂	76.680,38
	G ₃	90.099,45
	G ₄	92.016,46
	G ₅	95.431,41
Géis contendo lecitina	L ₁	49.533,68
	L ₂	55.593,28
	L ₃	69.976,00
	L ₄	99.684,50

- * A presença dos corticosteróides não alterou os valores de viscosidade.

Área de Histerese:

$$G_1 = 0,86 \text{ cm}^2$$

$$G_2 = 0,62 \text{ cm}^2$$

$$G_3 = 0,58 \text{ cm}^2$$

$$G_4 = 0,29 \text{ cm}^2$$

$$G_5 = 0,00 \text{ cm}^2$$

Figura 12 - Reogramas referentes aos géis hidrófilos contendo uréia.

Área de Histerese:

$L_1 = 0,00 \text{ cm}^2$
$L_2 = 0,15 \text{ cm}^2$
$L_3 = 0,33 \text{ cm}^2$
$L_4 = 2,05 \text{ cm}^2$

Figura 13 - Reogramas referentes aos géis hidrófilos contendo lecitina.

5.2. PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA *IN VITRO* PARA OS ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO PERCUTÂNEA DOS CORTICOSTERÓIDES CONTIDOS NAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

5.2.1. Células de difusão *in vitro*

Os resultados dos parâmetros mencionados no item 4.2.2.1. estão relacionados na Tabela 6.

Tabela 6 - Avaliação das células de difusão projetadas.

Parâmetros	Célula de difusão		
	n° 1	n° 2	n° 3
Tempo de agitação	30 seg.	30 seg.	< 30 seg.
Manutenção da temperatura em 37°C/10 h	Variação	Variação	Constante
Uniformidade da agitação	Uniforme	Não uniforme no braço coletor	Uniforme
Controle de velocidade de agitação	sem controle	sem controle	com controle (100 rpm)

5.2.2. Determinação dos coeficientes de solubilidade

A Tabela 7 mostra os valores de coeficiente de solubilidade dos corticosteróides nas fases receptoras testadas.

Tabela 7 - Coeficiente de solubilidade dos corticosteróides nas soluções receptoras testadas.

Corticosteróides	Coeficiente de solubilidade (mg/L)	
	Solução receptora	
	Sem tensoativo	Com tensoativo
Acetato de Hidrocortisona	1,034 ($\pm$ 0,606)	81,22 ($\pm$ 2,349)
Acetato de Dexametasona	15,60 ($\pm$ 0,586)	74,76 ($\pm$ 2,126)
Desonida	56,52 ($\pm$ 1,485)	107,00 ($\pm$ 1,528)
Triamcinolona-acetonida	16,54 ($\pm$ 0,378)	45,76 ($\pm$ 1,141)

Os valores em parênteses representam os valores de desvio padrão referentes a três determinações.

5.3. PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CORTICOSTERÓIDES POR CLAE

5.3.1. Condições cromatográficas

A determinação dos acetatos de hidrocortisona e de dexametasona, desonida e triamcinolona-acetonida foi executada conforme método descrito em 4.2.3.1.

As figuras 14, 15, 16 e 17 mostram os cromatogramas referentes ao branco (solução receptora), branco adicionado de padrões e amostra, referentes aos corticosteróides empregados.

5.3.2. Curva padrão de calibração

Para a elaboração da curva padrão de calibração empregaram-se soluções padrões dos corticosteróides diluídas em solução receptora (branco), conforme descrito no item 4.2.3.3. As diluições foram realizadas em triplicatas. Os dados obtidos, mostrados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11, permitiram a elaboração das curvas de calibração representadas pelas figuras 18, 19, 20 e 21.

Figura 14 - Cromatogramas referentes ao branco (a), branco adicionado de padrões (b), e amostra (c) obtidos segundo as condições cromatográficas descritas no item 4.2.3.1.; Concentração em 1mL: 200,0 ng de acetato de hidrocortisona e 400,0 ng de acetato de dexametasona (padrão interno); Tempo de retenção: acetato de hidrocortisona = 3,92 min e acetato de dexametasona = 6,10 min.

Figura 15 - Cromatogramas referentes ao branco adicionado de padrões (a) e amostra (b) obtidos segundo as condições cromatográficas descritas no item 4.2.3.1.; Concentração em 1 mL: 400,0 ng de acetato de dexametasona e 200,0 ng de desonida (padrão interno); Tempo de retenção: acetato de dexametasona = 6,10 min e desonida 3,43 min.

Figura 16 - Cromatogramas referentes ao branco adicionado de padrões (a) e amostra (b) obtidos segundo as condições cromatográficas descritas no item 4.2.3.1.; Concentração em 1 mL: 200,0 ng de triamcinolona-acetonida e 400,0 ng de dexametasona acetato (padrão interno); Tempo de retenção: triamcinolona-acetonida = 3,85 min e dexametasona acetato=6,10min.

Figura 17 - Cromatogramas referentes ao branco adicionado de padrões (a) e amostra (b) obtidos segundo as condições cromatográficas descritas no item 4.2.3.1.; Concentração em 1 mL: 200,0 ng de desonida e 400 ng de dexametasona acetato (padrão interno); Tempo de retenção: desonida = 3,43 min e dexametasona acetato = 6,10 min.

Tabela 8 - Parâmetros analíticos obtidos para a elaboração da curva padrão de calibração para o acetato de hidrocortisona (AHC) utilizando o acetato de dexametasona (ADM) como padrão interno (P.I).

Concentração (ng/mL)	Altura do Pico (cm)		R*
	AHC	P.I	
100	3,30	6,40	0,5156
	3,20	6,30	0,5079
	3,40	6,20	0,5484
200	6,50	6,40	1,0317
	6,60	6,30	1,0476
	6,80	6,20	1,0625
300	9,60	6,20	1,5484
	9,90	6,30	1,5714
	10,00	6,20	1,6129
400	13,00	6,10	2,1311
	13,20	6,20	2,1290
	13,30	5,90	2,2542
500	16,30	6,20	2,6290
	15,90	6,30	2,5238
	16,50	5,90	2,7966

* - Relação entre as alturas do pico do AHC e do P.I

Tabela 9 - Parâmetros analíticos obtidos para a elaboração da curva padrão de calibração para o acetato de dexametasona (ADM) utilizando a desonida (D) como padrão interno (P.I.).

Concentração (ng/mL)	Altura do Pico (cm)		R*
	ADM	P.I.	
50	0,90	4,70	0,1915
	0,80	4,60	0,1739
	0,70	4,00	0,3830
100	1,80	4,70	0,7381
	1,60	4,50	0,3556
	1,70	4,60	0,3696
200	3,10	4,20	0,7381
	3,50	4,50	0,7778
	3,40	4,50	0,7556
400	5,90	4,10	1,4390
	6,10	4,30	1,4186
	5,90	4,20	1,4048
800	11,70	4,30	2,7093
	11,40	4,10	2,7805
	12,00	4,20	2,8571

* - Relação entre as alturas do pico do ADM e do P.I.

Tabela 10 - Parâmetros analíticos obtidos para a elaboração da curva padrão de calibração para a triamcinolona-acetonida (TA) utilizando o acetato de dexametasona (ADM) como padrão interno (P.I.).

Concentração (ng/mL)	Altura do Pico (cm)		R*
	TA	P.I.	
25	0,70	6,10	0,1148
	0,60	6,00	0,1000
	0,80	6,50	0,1231
50	1,30	6,50	0,2000
	1,50	6,70	0,2239
	1,40	6,60	0,2121
100	2,80	6,30	0,4444
	2,90	6,40	0,4531
	2,60	6,10	0,4262
200	5,10	6,50	0,7846
	5,50	6,20	0,8871
	5,20	6,10	0,8525
400	10,20	6,50	1,5692
	11,00	6,20	1,7742
	10,60	6,30	1,6825

* - Relação entre as alturas do pico da TA e do P.I.

Tabela 11 - Parâmetros analíticos obtidos para a elaboração da curva padrão de calibração para a desonida (D) utilizando o acetato de dexametasona (ADM) como padrão interno (P.I).

Concentração (ng/mL)	Altura do Pico (cm)		R [*]
	D	P.I	
25	0,60	6,10	0,0984
	0,50	5,80	0,0862
	0,60	6,00	0,1000
50	1,50	7,50	0,2000
	1,30	7,00	0,1857
	1,20	6,20	0,1935
100	3,00	7,70	0,3896
	2,60	7,00	0,3714
	2,50	6,70	0,3731
200	5,80	7,00	0,8286
	5,70	6,90	0,8261
	5,20	6,80	0,7647
400	12,30	7,00	1,7571
	11,60	6,70	1,7313
	10,8	6,50	1,6615

* - Relação entre as alturas do pico da D e do P.I

$$y = 0,005349 x - 0,008925$$

$$r = 0,9997$$

Figura 18 - Representação da curva de calibração do acetato de hidrocortisona extraído da solução receptora adicionada.

$$y = 0,003469 x + 0,2222$$

$$r = 0,9997$$

Figura 19 - Representação da curva de calibração do acetato de dexametasona extraído da solução receptora adicionada.

Figura 20 - Representação da curva de calibração da triamcinolona-acetonida extraída da solução receptora adicionada.

Figura 21 - Representação da curva de calibração da desonida extraída da solução receptora adicionada.

5.3.3. Verificação da eficiência do processo de extração - Determinação da Recuperação Relativa (Rr)

Os resultados constantes na Tabela 12 mostram a recuperação relativa (Rr) obtidas para os corticosteróides estudados conforme proposto no item 4.2.3.4.

Tabela 12 - Dados referentes a verificação da recuperação relativa (Rr) dos corticosteróides na solução receptora.

Corticosteróide (ng/ml)		Relação da Altura dos Picos do padrão e do padrão interno		Rr (%)
		Não extraído	Extraído	
AHC	50	0,2600 (± 0,010)	0,2530 (±0,012)	97,31
	100	0,5500 (±0,015)	0,5210 (±0,010)	94,73
	200	1,3500 (±0,076)	1,2113 (±0,046)	89,86
ADM	50	0,2014 (±0,015)	0,1830 (±0,017)	90,86
	100	0,3994 (±0,012)	0,3556 (±0,015)	89,03
	200	0,8017 (±0,015)	0,7701 (±0,060)	96,06
TA	50	0,2230 (±0,015)	0,2157 (±0,012)	96,73
	100	0,4960 (±0,015)	0,4590 (±0,012)	92,54
	200	1,1049 (±0,046)	0,9813 (±0,069)	88,81
D	50	0,2143(±0,013)	0,1990 (±0,012)	92,86
	100	0,4097 (±0,025)	0,3896 (±0,012)	94,22
	200	0,8513 (±0,030)	0,8137 (±0,056)	95,58

* - Os valores em parênteses representam os desvios padrão referentes a três determinações.

5.3.4. Determinação por CLAE da quantidade de corticosteróides nas formulações de gel hidrófilos desenvolvidas

A Tabela 13 mostra as quantidades de corticosteróides encontradas nas várias formulações manipuladas após execução do item 4.2.3.5., seguido de determinação por CLAE.

Tabela 13 - Quantidade de corticosteróide presentes nas formulações desenvolvidas, determinadas por CLAE.

		Concentração de corticosteróides encontrada			
		AHC	ADM	TA	D
Concentração técnica (% g/ml)		1,000	0,100	0,100	0,050
Formulações					
Gel contendo uréia					
G1	0,950	0,095	0,110	0,055	
	0,950 (±0,025)	(±0,003)	(±0,002)	(±0,002)	
G2	0,920	0,095	0,105	0,049	
	(±0,009)	(±0,003)	(±0,002)	(±0,002)	
G3	0,970	0,093	0,097	0,051	
	(±0,021)	(±0,001)	(±0,004)	(±0,002)	
G4	0,960	0,091	0,096	0,048	
	(±0,021)	(±0,001)	(±0,002)	(±0,003)	
G5	1,040	0,110	0,103	0,050	
	(±0,035)	(±0,003)	(±0,002)	(±0,002)	
Gel contendo lecitina					
L1	1,010	0,097	0,099	0,049	
	(±0,012)	(±0,002)	(±0,003)	(±0,002)	
L2	1,005	0,098	0,093	0,047	
	(±0,012)	(±0,003)	(±0,003)	(±0,002)	
L3	1,090	0,104	0,098	0,049	
	(±0,021)	(±0,003)	(±0,003)	(±0,002)	
L4	0,950	0,091	0,109	0,053	
	(±0,025)	(±0,001)	(±0,002)	(±0,001)	

Os valores em parênteses representam os desvios padrão referentes a três determinações.

5.4. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA DOS CORTICOSTERÓIDES EMPREGADOS NAS FORMULAÇÕES

Na Tabela 14 estão descritos os valores de coeficiente de partição óleo/água para os corticosteróides empregados, conforme metodologia descrita no item 4.2.4.

Tabela 14 - Coeficiente de partição óleo/água dos corticosteróides.

Corticosteróides	Coeficiente de partição O/A
Acetado de hidrocortisona	14,96 ($\pm$ 0,952)
Acetato de dexametasona	31,92 ($\pm$ 0,919)
Desonida	6,73 ($\pm$ 0,187)
Triamcinolona-acetonida	12,50 ($\pm$ 0,503)

Os valores em parênteses representam os desvios padrão referentes a três determinações.

5.5. EXPERIMENTOS DE LIBERAÇÃO E PENETRAÇÃO TRANCUTÂNEA *IN VITRO*, UTILIZANDO A CÉLULA DE DIFUSÃO Nº 3

Os experimentos de liberação e penetração transcutânea *in vitro* foram realizados conforme descrito no item 4.2.5. Os resultados obtidos referentes à cinética da liberação dos corticosteróides AHC, ADM, D e TA contidos nas formulações de géis contendo uréia (G₁, G₂, G₃, G₄ e G₅) e géis contendo lecitina (L₁, L₂, L₃ e L₄) encontram-se relacionados nas Tabelas 15, 16, 17 e 18.

As Tabelas 19, 20, 21 e 22 indicam os dados de penetração transcutânea referentes as mesmas formulações acima citadas.

Tabela 15 - Valores de liberação *in vitro* do AHC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) das formulações de gel hidrófilo contendo uréia ou lecitina.

Tempo (h)		AHC liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
		0	2	4	6	8	10	12	24
Gel contendo Ureia	G ₁	zero	15,163	17,234	20,143	27,437	40,147	51,420	61,143
			15,875	18,751	21,954	29,034	39,714	50,194	62,135
			16,075	16,131	22,035	26,181	36,162	50,935	59,995
			14,183	17,795	19,037	26,954	36,306	52,075	64,321
	G ₂	zero	10,134	13,453	17,475	21,298	32,142	45,492	50,104
			9,875	12,957	18,081	22,345	35,037	43,784	51,179
			9,304	12,034	16,995	21,182	33,401	43,179	53,471
			11,071	14,035	17,034	20,034	31,179	42,971	54,947
	G ₃	zero	7,594	11,342	15,071	18,304	27,140	37,410	40,574
			7,239	10,914	16,095	17,194	25,995	35,194	43,034
			6,995	10,031	16,412	17,371	27,003	36,034	38,771
			7,034	10,714	14,954	17,914	26,340	36,995	39,034
	G ₄	zero	4,341	7,147	11,331	15,713	20,171	31,471	35,183
			5,071	7,007	12,091	16,995	21,995	28,995	36,545
			4,788	6,814	11,557	16,003	18,714	58,781	38,441
			4,811	6,994	11,851	15,975	21,340	29,003	33,187
	G ₅	zero	2,772	5,318	8,571	13,171	15,557	22,552	25,154
			3,058	5,071	8,325	12,995	14,095	21,045	25,975
			2,995	4,953	7,831	11,345	14,339	20,665	23,715
			2,801	4,871	7,903	13,007	14,571	20,813	24,071
Gel contendo Lecitina	L ₁	zero	26,712	28,179	42,752	62,314	95,147	123,421	151,180
			26,143	28,331	43,412	59,172	93,475	120,137	142,300
			27,052	30,142	45,332	58,123	88,415	119,452	149,181
			24,031	31,475	41,997	57,995	89,180	122,109	147,275
	L ₂	zero	15,135	19,457	35,181	50,147	71,147	92,133	120,331
			16,095	18,331	37,339	46,991	72,714	89,132	109,945
			14,331	21,044	34,181	47,180	75,131	95,187	113,183
			14,742	19,003	32,991	48,339	75,007	93,301	110,525
	L ₃	zero	8,452	12,314	21,457	35,185	52,300	69,183	82,173
			8,331	11,995	22,331	33,147	48,355	75,092	80,431
			8,915	13,007	22,895	34,189	48,007	73,141	77,158
			7,995	12,971	20,997	35,071	49,175	70,813	78,031
	L ₄	zero	zero	zero	zero	2,375	5,972	16,314	25,172
						2,518	7,143	17,912	23,192
						2,197	7,213	17,031	23,938
						2,203	6,431	17,500	24,005

Tabela 16 - Valores de liberação *in vitro* do ADM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) das formulações de gel hidrófilo contendo uréia ou lecitina.

Tempo (h)		ADM liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
		0	2	4	6	8	10	12	24
Gel contendo Ureia	G ₁	zero	9,195	11,381	12,475	19,565	28,670	37,040	38,593
			9,772	11,256	12,746	20,138	29,291	35,485	38,075
			8,868	10,939	13,822	19,950	28,584	34,876	39,614
			9,358	10,609	13,458	19,318	29,558	36,727	37,239
	G ₂	zero	4,616	5,361	6,642	7,739	9,378	12,359	21,116
			5,025	5,251	6,492	8,122	9,606	13,706	21,580
			4,527	5,063	6,762	7,525	9,129	15,348	20,719
			4,882	5,086	6,368	7,935	9,315	14,654	21,206
	G ₃	zero	2,039	2,821	4,080	6,142	7,924	9,531	11,496
			2,480	2,898	3,821	6,517	7,822	9,688	11,570
			2,264	3,047	3,664	6,393	8,172	10,373	11,821
			2,152	2,577	4,180	6,318	7,612	9,241	12,208
	G ₄	zero	1,903	2,280	3,086	3,981	6,430	7,822	10,970
			2,027	2,393	2,892	4,362	6,256	8,173	10,765
			1,765	2,233	2,854	4,714	6,182	8,371	10,858
			1,635	2,260	2,989	4,317	6,567	7,301	10,687
	G ₅	zero	1,422	1,563	2,152	3,708	5,264	6,688	9,172
			1,292	1,494	2,055	3,571	5,012	6,556	8,940
			1,189	1,451	2,127	3,332	5,684	6,331	8,818
			1,128	1,366	1,976	3,616	4,954	6,754	9,420
Gel contendo Lecitina	L ₁	zero	11,281	16,082	18,732	23,723	30,298	34,486	44,700
			10,659	16,506	18,622	23,981	31,182	35,995	42,090
			11,492	15,780	19,502	23,284	30,810	35,552	42,600
			11,107	16,043	19,080	23,575	32,627	34,739	44,001
	L ₂	zero	4,456	4,950	5,937	8,904	18,383	25,510	40,448
			4,356	4,938	6,188	9,057	18,744	26,182	40,262
			4,154	4,780	6,091	9,449	18,269	26,048	41,132
			4,041	5,336	6,228	9,241	18,632	26,333	41,968
	L ₃	zero	3,211	3,659	4,567	7,065	9,4925	11,9042	17,4751
			2,979	3,553	4,604	7,178	9,4179	12,1766	17,8109
			2,711	3,740	4,580	7,438	9,2711	11,7699	17,3770
			3,073	3,844	4,616	7,310	9,4280	12,0286	
	L ₄	zero	zero	zero	zero	zero	0,710	1,290	3,471
							0,920	1,555	3,553
							0,833	1,735	3,321
							0,616	1,437	3,659

Tabela 17 - Valores de liberação *in vitro* da D ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) das formulações de gel hidrófilo contendo uréia ou lecitina.

Tempo (h)		D liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
		0	2	4	6	8	10	12	24
Gel contendo Ureia	G ₁	zero	12,274	35,507	33,775	34,981	61,634	83,289	94,565
			10,861	31,182	33,669	36,107	58,520	80,896	99,801
			11,095	30,833	31,169	37,624	60,560	79,005	93,321
			12,102	32,388	32,823	39,851	61,231	80,900	100,796
	G ₂	zero	6,480	12,203	25,761	27,117	27,117	30,062	51,820
			7,351	11,209	24,913	27,376	27,014	28,284	50,585
			7,143	12,193	23,730	25,685	26,883	28,675	51,704
			6,262	11,168	25,519	25,321	27,241	29,475	49,500
	G ₃	zero	13,882	15,642	19,847	26,721	39,354	47,127	58,302
			12,973	15,386	19,998	26,750	39,287	47,313	54,465
			12,736	14,923	18,654	25,757	39,810	46,928	56,294
			12,078	15,215	19,638	26,206	39,165	47,571	57,131
	G ₄	zero	7,287	14,949	19,565	18,948	20,405	23,562	34,167
			7,002	16,281	20,883	19,988	21,878	24,067	35,338
			7,359	15,409	19,863	18,321	22,475	23,918	33,601
			6,642	15,863	19,950	17,898	22,550	23,305	32,735
	G ₅	zero	6,532	7,403	8,739	13,109	14,975	15,025	19,988
			7,189	7,866	9,369	12,922	13,658	15,112	22,562
			6,704	7,571	9,129	12,140	13,902	17,090	22,086
			6,928	7,838	8,942	12,603	14,216	15,622	21,034
Gel contendo Lecitina	L ₁	zero	10,6629	14,9627	23,3085	33,8147	49,3905	63,5211	76,6343
			10,5659	14,8134	23,5485	34,8420	50,2069	56,0087	77,7587
			10,5808	15,2177	23,1990	34,2251	50,3943	55,3706	81,7301
			10,6356	15,0460	23,6381	34,5896	48,5162	51,0361	80,2463
	L ₂	zero	8,1020	9,8483	11,3358	21,4303	36,9577	53,5025	65,3184
			7,9254	10,0920	12,4664	18,9465	32,9823	56,0087	70,7923
			7,9913	10,4714	12,0784	22,4104	35,7376	55,3706	62,2264
			8,2102	9,8346	11,8448	20,5410	35,2201	51,0361	67,8065
	L ₃	zero	3,4104	4,3731	6,5199	11,9055	22,0647	31,1940	40,2326
			3,4826	4,1294	6,2587	12,8607	23,0286	32,2301	41,1915
			3,6107	4,6206	6,8644	12,0871	22,7786	32,5124	36,7139
			3,2711	4,5908	6,6107	12,3532	22,4254	31,9838	39,8184
	L ₄	zero	zero	zero	0,7226	1,6381	3,1318	4,8968	7,6244
					0,6741	1,7550	2,9963	5,0062	8,3458
					0,7550	1,6107	3,1132	4,7463	8,1045
					0,7587	1,7065	3,0871	4,8333	7,5958

Tabela 18 - Valores de liberação *in vitro* da TA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) das formulações de gel hidrófilo contendo uréia ou lecitina.

Tempo (h)		TA liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
		0	2	4	6	8	10	12	24
Gel contendo Ureia	G ₁	zero	8,959	10,863	11,863	13,718	26,920	28,881	36,990
			8,624	10,759	12,617	13,594	26,776	29,403	34,996
			8,572	10,883	13,684	14,357	24,805	27,796	33,507
			8,881	10,348	11,381	12,376	24,562	29,516	37,623
	G ₂	zero	10,647	11,759	15,364	24,388	26,754	31,118	44,739
			10,364	11,256	16,107	23,304	26,157	31,990	45,199
			9,879	11,978	14,862	23,546	26,001	30,286	43,480
			10,080	11,128	16,405	24,055	26,868	32,289	39,839
	G ₃	zero	21,519	37,009	46,094	49,221	41,481	50,065	56,061
			19,903	35,000	45,123	49,788	43,619	51,020	54,652
			19,565	34,764	44,826	47,438	45,958	51,654	55,659
			20,548	36,231	46,256	48,445	42,016	49,782	56,368
	G ₄	zero	4,801	5,621	7,164	9,914	10,631	12,415	26,206
			4,440	5,688	7,026	9,953	10,361	12,475	27,425
			4,627	5,373	7,102	9,418	10,872	13,594	27,152
			4,853	5,536	6,368	9,571	10,450	12,114	30,262
	G ₅	zero	3,043	4,461	6,046	8,098	9,430	13,132	18,075
			3,184	4,154	5,410	7,848	10,099	13,831	18,696
			2,973	4,481	5,249	8,6119	9,876	12,848	21,070
			2,655	3,694	5,282	7,754	10,970	12,551	19,092
Gel contendo Lecitina	L ₁	zero	7,1915	8,1343	10,3794	11,5796	23,1841	27,0274	38,2463
			7,0050	7,3756	10,1119	12,4490	24,1045	27,3881	40,4726
			7,0945	7,4279	10,6119	12,1144	23,4204	26,7662	43,8184
			7,2201	7,9353	9,8010	12,2015	23,5323	25,7960	41,9677
	L ₂	zero	4,1692	5,9577	8,1866	10,7587	17,8856	23,2960	31,4192
			4,0299	6,0075	8,2127	11,1716	18,6965	23,7338	32,9975
			3,8210	5,6978	7,7637	10,6120	17,3383	23,4950	31,0784
			3,5970	5,6741	7,8756	10,9080	17,0149	25,2985	32,4403
	L ₃	zero	2,7139	4,5896	6,5684	9,3806	12,7114	19,6167	26,1356
			2,4005	4,3905	7,1891	9,4776	13,5958	16,8408	28,7065
			2,5908	4,1567	6,6231	8,7624	12,1667	17,7612	23,5560
			2,3085	4,1692	6,9430	8,9330	12,3259	17,7990	24,5286
	L ₄	zero	zero	zero	zero	4,4552	5,0124	8,8085	11,2650
						4,1692	4,9527	8,3731	13,7450
						4,5784	4,6903	8,1368	13,3400
						4,2948	5,1244	8,9204	12,1045

Tabela 19 - Valores de penetração transcutânea *in vitro* do AHC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) das formulações de gel hidrófilo contendo uréia ou lecitina.

Tempo (h)		AHC penetrado (µg/cm²)								
		0	2	4	6	8	10	12	24	
Gel contendo Uréia	G ₁	zero	5,792	6,010	6,417	8,123	11,371	15,471	19,183	
			5,237	6,030	6,321	8,791	12,432	16,091	20,991	
			5,397	5,997	6,872	8,621	12,031	15,031	21,321	
			5,531	5,831	6,531	8,597	10,991	14,995	20,753	
	G ₂	zero	6,034	6,532	8,372	10,134	13,957	18,034	25,147	
			6,312	6,071	8,457	10,055	13,863	17,563	23,131	
			6,217	6,392	8,061	9,713	12,742	17,930	24,031	
			6,431	6,643	8,210	9,804	12,901	17,304	24,379	
	G ₃	zero	zero	3,071	4,397	6,133	9,337	13,156		
				3,142	4,703	6,271	9,005	132,121		
				3,297	4,681	5,831	9,582	12,991		
	G ₄	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	
	G ₅	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	5,42
										6,01
										4,97
									4,83	
Gel contendo Lecitina	L ₁	zero	6,304	7,954	9,1332	12,331	16,331	23,071	26,771	
			6,907	7,531	10,055	11,897	17,856	21,895	25,180	
			5,805	8,382	10,000	13,071	15,905	22,331	27,142	
			5,917	7,705	9,572	12,005	17,037	23,005	24,995	
	L ₂	zero	4,352	5,997	8,071	10,992	14,995	20,147	23,451	
			3,995	6,034	7,321	11,034	13,303	19,354	23,003	
			4,213	6,317	7,504	9,971	13,517	18,991	21,965	
			4,195	6,091	7,771	10,351	13,701	19,600	22,2901	
	L ₃	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	3,205	
									3,452	3,139
	L ₄	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	2,321	
									2,507	
									2,301	
										2,407

Tabela 20 - Valores de penetração transcutânea *in vitro* do ADM ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) das formulações de gel hidrófilo contendo uréia ou lecitina.

Tempo (h)		ADM penetrado (µg/cm²)								
		0	2	4	6	8	10	12	24	
Gel contendo Uréia	G ₁	zero	1,287	1,654	2,297	2,831	3,147	3,701	4,675	
			1,225	1,611	2,402	2,730	3,246	3,738	4,801	
			1,381	1,679	2,242	2,774	3,215	3,632	4,979	
			1,208	1,766	2,232	2,867	3,097	3,601	4,708	
	G ₂	zero	1,580	1,965	2,121	2,539	2,930	3,384	4,205	
			1,430	1,859	2,096	2,481	2,867	3,333	4,042	
			1,623	1,903	2,108	2,489	2,798	3,420	4,306	
			1,486	1,892	2,182	2,575	3,073	3,272	4,362	
	G ₃	zero	zero	0,946	1,439	2,007	2,593	3,553		
				0,979	1,470	1,980	2,476	3,695		
				0,995	1,357	1,903	2,531	3,806		
				1,001	1,405	1,805	2,313	3,918		
	G ₄	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	
	G ₅	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	4,975	
									7,726	
									7,665	
									4,592	
	Gel contendo Lecitina	L ₁	zero	1,9552	2,1405	2,6642	3,6480	4,9005	6,6443	7,7650
				1,8557	2,2400	2,9938	3,9080	5,2015	6,7562	7,8818
				1,8744	2,1517	2,9303	3,4577	4,7640	6,5672	7,4403
2,0299				2,3010	2,5871	3,3955	5,0622	6,3321	7,3035	
L ₂		zero	1,3470	1,7624	2,3160	3,1990	4,1555	5,9453	6,8632	
			1,1604	1,9552	2,4067	3,2711	4,0386	6,0162	7,1306	
			1,1157	2,0435	2,2674	3,0560	3,7960	5,6990	7,3881	
			1,4055	1,7351	2,2326	3,0250	3,7077	5,7873	6,3371	
L ₃		zero	zero	zero	0,8670	1,5945	1,9677	3,3930		
					0,8893	1,4055	2,0423	3,7836		
					0,9714	1,4701	1,9030	3,2562		
					0,8520	1,5299	1,9990	3,3500		
L ₄		zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	0,7687	
									0,6741	
									0,7836	
									0,8458	

Tabela 21 - Valores de penetração transcutânea *in vitro* da D ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) das formulações de gel hidrófilo contendo uréia ou lecitina.

Tempo (h)		D penetrado (µg/cm²)							
		0	2	4	6	8	10	12	24
Gel contendo Ureia	G ₁	zero	0,535	0,767	0,904	1,041	1,315	1,899	4,884
			0,734	0,775	0,913	1,051	1,414	1,839	5,410
			0,755	0,757	0,989	1,058	1,240	1,990	4,801
			0,552	0,805	0,923	1,014	1,285	1,638	4,652
	G ₂	zero	1,302	2,035	2,418	3,022	3,392	4,440	7,200
			1,163	2,146	2,491	2,924	3,545	4,701	7,376
			1,290	1,908	2,290	2,853	3,347	4,789	7,040
			1,55	1,862	2,235	2,988	3,359	4,491	6,754
	G ₃	zero	2,576	3,662	5,187	6,195	7,637	7,924	9,498
			2,180	3,772	5,261	6,505	7,521	7,802	9,368
			2,338	3,905	5,600	6,642	7,276	7,388	10,124
			2,728	3,351	5,353	6,332	7,688	8,814	9,994
	G ₄	zero	5,653	5,423	8,507	9,617	10,046	11,225	14,440
			5,394	5,261	8,734	9,739	10,078	11,480	15,311
			5,025	5,088	8,619	9,502	10,435	12,114	14,963
			4,923	5,647	9,179	9,104	10,659	11,805	14,701
	G ₅	zero	7,067	7,372	8,637	8,983	11,915	16,767	22,066
			6,629	6,878	8,757	9,415	11,980	15,149	21,480
			7,139	7,005	8,445	9,316	12,127	17,450	22,425
			6,342	7,190	8,246	9,478	11,729	15,616	22,687
Gel contendo Lecitina	L ₁	zero	0,7301	0,9403	1,5323	2,4030	4,0423	7,1903	10,62
			0,7861	0,9986	1,4863	2,2674	4,1567	7,0025	10,78
			0,6306	1,0211	1,5547	2,1542	4,0050	7,1517	10,61
			0,7750	0,9888	1,5050	2,3881	3,9764	7,1182	10,82
	L ₂	zero	0,4142	0,5162	1,2624	2,1368	3,4602	5,0236	8,4328
			0,4080	0,5062	1,3619	2,1430	3,3470	4,8159	8,1244
			0,3669	0,4913	1,4204	2,0833	3,2736	4,8756	8,2177
			0,4230	0,4813	1,5012	2,0087	3,4204	4,6704	8,2276
	L ₃	zero	zero	zero	zero	zero	1,2624	1,8831	3,2749
			1,2400	2,0187	3,4577				
			1,3868	1,9589	3,5211				
			1,3619	1,8595	3,3582				
	L ₄	zero	zero	zero	zero	zero	0,6405	0,9726	1,2400
			0,7475	0,9988	1,2575				
			0,8905	0,9079	1,5087				
			0,6169	1,0075	1,4838				

Tabela 22 - Valores de penetração transcutânea *in vitro* da TA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) das formulações de gel hidrófilo contendo uréia ou lecitina.

Tempo (hr)		TA penetrado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
		0	2	4	6	8	10	12	24
Gel contendo Ureia	Q ₁	zero	0,298	0,332	0,353	0,404	0,618	0,77	1,300
			0,321	0,337	0,349	0,407	1,623	0,746	1,270
			0,274	0,335	0,361	0,373	0,572	0,744	1,240
			0,292	0,339	0,354	0,448	0,587	0,784	1,430
	Q ₂	zero	0,302	0,311	0,363	0,417	0,746	0,995	1,654
			0,297	0,323	0,382	0,444	0,759	1,038	1,741
			0,282	0,315	0,349	0,448	0,780	0,984	1,704
			0,298	0,326	0,387	0,434	0,711	0,956	1,690
	Q ₃	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero
	Q ₄	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero
	Q ₅	zero	zero	zero	zero	zero	0,280	0,660	2,080
							0,261	0,622	1,903
							0,249	0,597	1,999
							0,230	0,585	1,984
Gel contendo Lecitina	L ₁	zero	0,4440	0,7239	1,1082	1,2102	1,8308	2,4291	3,5261
			0,4167	0,7488	1,1281	1,1480	1,8806	2,4913	3,6157
			0,4067	0,7127	1,0833	1,2575	1,8246	2,4478	3,3980
			0,4169	0,6654	1,0970	1,2040	1,8047	2,6206	3,3721
	L ₂	zero	0,3047	0,4627	0,7052	1,3321	1,7189	2,2201	2,8085
			0,2923	0,4739	0,6878	1,3719	1,6256	2,4913	2,7002
			0,3010	0,4764	0,6978	1,2264	1,5808	2,2301	2,5896
			0,2799	0,4689	0,6729	1,2077	1,6057	2,2674	2,8159
	L ₃	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero
	L ₄	zero	zero	zero	-	0,8085	1,7500	2,7985	3,8321
						0,8358	1,8905	2,9104	3,9888
						0,7550	1,8308	3,0498	3,9079
						0,7351	1,9316	2,7276	3,5710

Os dados constantes nas Tabelas anteriores foram representados graficamente, plotando-se no eixo das abscissas (x), os valores de tempo (horas); e nas ordenadas (y), os valores das quantidades de corticosteróide liberados ou penetrado transcutaneamente ao longo do tempo (mg/cm^2), para as várias formulações desenvolvidas. As Figuras 22 e 23 ilustram as curvas de liberação *in vitro* dos corticosteróides ao longo do tempo para as formulações de géis hidrófilos, contendo uréia e lecitina respectivamente. Os resultados de penetração transcutânea dos corticosteróides para estas mesmas formulações, estão mostrados nas Figuras 24 e 25.

Figura 22 - Liberação *in vitro* dos corticosteróides AHC, ADM, D e TA das formulações de gel hidrófilo contendo uréia: (■) G₁, 2,0%; (▲) G₂, 4,0%; (▼) G₃, 8,0%; (◆) G₄, 12,0%; e (★) G₅, 15,0%.

Figura 23 - Liberação *in vitro* dos corticosteróides AHC, ADM, D e TA das formulações de gel hidrófilo contendo lecitina: (■) L1, 1,0%; (▲) L2, 2,0 %; (▼) L3, 4,0%; (♦) L4, 8,0%.

Figura 24 - Penetração transcutânea *in vitro* na pele de camundongos sem pêlo, dos corticosteróides AHC, ADM, D e TA das formulações de gel hidrófilo contendo uréia: (■) G₁, 2,0%; (▲) G₂, 4,0%; (▼) G₃, 8,0%; (◆) G₄, 12,0%; e (☆) G₅, 15,0%.

Figura 25 - Penetração transcutânea *in vitro*, na pele de camundongos sem pêlo, dos corticosteroídeos AHC, ADM, D e TA das formulações de gel hidrófilo contendo lecitina: (■) L₁, 1,0%; (▲) L₂, 2,0%; (▼) L₃, 4,0%; (◆) L₄, 8,0%.

Os parâmetros cinéticos de liberação e penetração transcutânea *in vitro* dos corticosteróides AHC, ADM, D e TA das formulações objetos deste estudo, estão relacionados nas Tabelas 23, 24, 25 e 26.

Tabela 23 - Parâmetros cinéticos das curvas de liberação *in vitro* dos corticosteróides a partir das formulações de gel contendo uréia.

Formulação		Modelo HIGUCHI			Cinética de 1ª ordem		
		Tempo <i>LAG</i> (horas $\frac{1}{2}$)	Fluxo <i>J</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}^{\frac{1}{2}}$)	r	Tempo <i>LAG</i> (horas)	Fluxo <i>J</i> (log $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	r
AHC	G ₁	0,32	12,990	0,9313	1,29	0,054	0,9876
	G ₂	0,44	11,420	0,9134	1,13	0,064	0,9946
	G ₃	0,46	9,460	0,9218	1,04	0,068	0,9937
	G ₄	0,54	7,800	0,9153	0,84	0,079	0,9937
	G ₅	0,57	5,710	0,9158	0,63	0,084	0,9861
ADM	G ₁	0,42	9,560	0,9209	1,11	0,063	0,9881
	G ₂	0,20	3,430	0,9400	1,07	0,046	0,9902
	G ₃	0,44	2,700	0,9385	0,48	0,068	0,9921
	G ₄	0,46	2,120	0,9215	0,20	0,066	0,9953
	G ₅	0,57	1,780	0,8970	0,12	0,078	0,9897
D	G ₁	0,45	21,170	0,9515	1,16	0,073	0,9869
	G ₂	0,27	9,370	0,9708	1,14	0,061	0,9950
	G ₃	0,25	12,710	0,9893	1,21	0,059	0,9926
	G ₄	0,12	7,570	0,9873	1,27	0,047	0,9913
	G ₅	0,06	4,440	0,9530	1,28	0,039	0,9839
TA	G ₁	0,33	7,670	0,9143	1,17	0,054	0,9886
	G ₂	0,27	8,860	0,9678	1,23	0,052	0,9902
	G ₃	0,13	15,020	0,9651	1,63	0,032	0,9913
	G ₄	0,15	3,510	0,9828	1,11	0,045	0,9903
	G ₅	0,12	11,920	0,9440	0,74	0,064	0,9972

Tabela 24 - Parâmetros cinéticos das curvas de liberação *in vitro* dos corticosteróides a partir das formulações de gel contendo lecitina.

Formulação		Modelo HIGUCHI			Cinética de 1ª ordem		
		Tempo <i>LAG</i> (horas ^{1/2})	Fluxo <i>J</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}^{1/2}$)	r	Tempo <i>LAG</i> (horas)	Fluxo <i>J</i> (log $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	r
AHC	L ₁	0,51	31,583	0,9024	1,24	0,071	0,9923
	L ₂	0,58	25,260	0,9048	1,08	0,083	0,9935
	L ₃	0,67	18,7492	0,8912	0,89	0,095	0,9975
	L ₄	> 2,45	6,015	0,8500	> 6,00	0,217	0,9985
ADM	L ₁	0,22	9,885	0,9799	1,29	0,049	0,9911
	L ₂	0,65	6,422	0,8340	0,66	0,083	0,9732
	L ₃	0,42	3,215	0,9338	0,71	0,063	0,9936
	L ₄	> 2,83	0,714	0,9756	> 8,00	0,024	0,9901
D	L ₁	0,52	16,214	0,9277	1,07	0,077	0,9915
	L ₂	0,67	13,151	0,8368	0,89	0,086	0,9825
	L ₃	0,76	8,124	0,8290	0,41	0,103	0,9915
	L ₄	> 2,00	1,576	0,8963	> 4,00	0,137	0,9912
TA	L ₁	0,44	7,136	0,8954	1,02	0,063	0,9667
	L ₂	0,57	6,223	0,8907	0,74	0,079	0,9979
	L ₃	0,58	4,744	0,9075	8,53	0,083	0,9932
	L ₄	> 2,45	3,182	0,9661	> 6,00	0,073	0,9899

Tabela 25 - Parâmetros cinéticos das curvas de penetração transcutânea *in vitro* dos corticosteróides a partir das formulações de gel contendo uréia.

Formulação		Modelo HIGUCHI			Cinética de 1ª ordem		
		Tempo <i>LAG</i> (horas ^{1/2})	Fluxo <i>J</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}^{1/2}$)	<i>r</i>	Tempo <i>LAG</i> (horas)	Fluxo <i>J</i> (log $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	<i>r</i>
AHC	G ₁	0,21	3,874	0,9382	1,11	0,046	0,9914
	G ₂	0,22	4,492	0,9453	1,14	0,047	0,9873
	G ₃	> 2,00	0,843	0,9873	> 4,00	0,077	0,9959
	G ₄	-	-	-	-	-	-
	G ₅	-	-	-	-	-	-
ADM	G ₁	0,15	1,045	0,9922	0,01	0,046	0,9930
	G ₂	0,11	0,876	0,9947	0,66	0,031	0,9901
	G ₃	> 2,00	0,843	0,9873	> 4,00	0,067	0,9965
	G ₄	-	-	-	-	-	-
	G ₅	-	-	-	-	-	-
D	G ₁	0,17	0,459	0,9515	0,84	0,044	0,9971
	G ₂	0,24	1,219	0,9708	0,02	0,051	0,9903
	G ₃	0,19	2,386	0,9893	0,85	0,050	0,9914
	G ₄	0,01	3,326	0,9873	1,24	0,037	0,9907
	G ₅	0,05	4,002	0,9530	1,29	0,037	0,9897
TA	G ₁	0,125	0,191	0,9417	1,20	0,041	0,9817
	G ₂	0,351	0,246	0,8993	1,11	0,055	0,9901
	G ₃	-	-	-	-	-	-
	G ₄	-	-	-	-	-	-
	G ₅	> 2,83	0,284	0,9448	> 8,00	0,056	0,9905

Tabela 26 - Parâmetros cinéticos das curvas de liberação *in vitro* dos corticosteróides a partir das formulações de gel contendo lecitina.

Formulação		Modelo HIGUCHI			Cinética de 1ª ordem		
		Tempo <i>LAG</i> (horas ^{1/2})	Fluxo <i>J</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}^{1/2}$)	r	Tempo <i>LAG</i> (horas)	Fluxo <i>J</i> (log $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	r
AHC	L ₁	0,33	5,809	0,9398	1,08	0,055	0,9969
	L ₂	0,77	1,269	0,8504	0,89	0,065	0,9984
	L ₃	-	-	-	-	-	-
	L ₄	-	-	-	-	-	-
ADM	L ₁	0,33	1,694	0,9374	0,41	0,055	0,9930
	L ₂	0,42	1,485	0,9245	0,73	0,063	0,9958
	L ₃	> 2,45	0,793	0,9906	> 6,00	0,086	0,9971
	L ₄	-	-	-	-	-	-
D	L ₁	0,75	1,667	0,8062	0,59	0,099	0,9943
	L ₂	0,77	1,269	0,8504	0,75	0,115	0,9885
	L ₃	> 2,83	0,958	0,9996	> 8,00	0,084	0,9993
	L ₄	> 2,83	0,512	1,0000	> 8,00	0,064	0,9995
TA	L ₁	0,49	0,657	0,9204	1,11	0,046	0,9882
	L ₂	0,64	0,615	0,8910	1,14	0,047	0,9917
	L ₃	-	-	-	-	-	-
	L ₄	> 2,45	1,108	0,9437	> 6,00	0,141	0,9901

A Tabela 27 e 28 mostram os valores de retenção e penetração transcutânea dos corticosteróides (AHC, ADM, D e TA) de camundongos sem pêlo, após 24 h de experimento.

Tabela 27 - Retenção e penetração transcutânea, na pele de camundongos sem pêlo, dos corticosteróides AHC, ADM, D e TA das formulações de géis hidrófilos contendo uréia, após 24 h de experimento.

Formulação	Corticosteróide ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
	AHC		ADM		D		TA	
	Permeado	Retido	Permeado	Retido	Permeado	Retido	Permeado	Retido
G ₁ (2,0% uréia)	19,183	10,15	4,675	2,59	4,884	1,53	1,300	1,50
	20,991	11,03	4,801	2,65	5,410	1,63	1,270	1,70
	21,321	9,75	4,979	2,71	4,801	1,71	1,240	1,63
	20,379	10,95	4,708	2,53	4,652	1,57	1,430	1,57
G ₂ (4,0% uréia)	23,147	13,457	4,205	3,17	7,200	2,09	1,634	1,72
	23,131	12,034	4,042	3,42	7,376	2,29	1,741	1,82
	24,031	12,752	4,306	3,33	7,040	2,21	1,704	1,90
	24,379	13,057	4,362	3,25	6,734	2,00	1,690	1,93
G ₃ (8,0% uréia)	13,156	16,335	3,553	5,31	9,498	2,87	-	3,11
	13,121	15,995	3,695	5,29	9,468	2,97		2,85
	12,995	16,046	3,806	5,72	10,124	3,00		3,00
	14,071	16,195	3,918	6,03	9,994	2,78		2,79
G ₄ (12,0% uréia)	-	23,431	-	7,32	14,44	3,00	-	3,80
		22,991		8,17	15,311	3,23		3,71
		21,993		8,95	14,963	3,40		4,30
		24,163		9,07	14,701	3,30		3,98
G ₅ 15,0% uréia	5,42	25,132	4,975	11,05	22,066	3,60	2,080	4,95
	6,01	23,952	4,726	10,11	21,480	3,57	1,903	4,60
	4,97	24,571	4,665	9,72	22,425	3,42	1,999	5,00
	4,83	24,932	4,592	9,30	22,687	3,72	1,984	4,72

Tabela 28 - Retenção e penetração transcutânea, na pele de camundongos sem pêlo, dos corticosteróides AHC, ADM, D e TA das formulações de géis hidrófilos contendo lecitina, após 24 h de experimento.

Formulação	Corticosteróide ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
	AHC		ADM		D		TA	
	Permeado	Retido	Permeado	Retido	Permeado	Retido	Permeado	Retido
L ₁ (1,0% lecitina)	26,771	23,035	7,765	8,72	10,62	2,15	3,5261	2,91
	25,180	22,851	7,882	9,07	10,78	2,00	3,6157	2,69
	27,142	22,352	7,4403	9,50	10,61	2,32	3,398	2,83
	24,995	24,362	7,304	9,25	10,82	2,47	3,3721	2,73
L ₂ (2,0% lecitina)	23,451	35,661	6,8632	10,45	8,433	3,59	2,809	5,52
	23,003	36,721	7,1306	12,07	8,1244	3,60	2,700	5,30
	21,965	33,210	7,388	12,00	8,2177	3,72	2,5896	5,78
	22,301	34,521	6,337	11,42	8,2276	3,87	2,816	5,62
L ₃ (4,0% lecitina)	3,205	38,620	3,393	21,95	3,2749	7,71	-	12,20
	3,452	40,321	3,784	22,03	3,4577	7,52		11,15
	3,139	41,032	3,256	24,7	3,5211	7,69		12,73
	3,507	39,032	3,350	23,50	3,3582	7,05		10,93
L ₄ (8,0% lecitina)	2,321	42,033	0,7687	23,90	1,24	10,27	3,832	14,57
	2,507	43,071	0,6741	25,40	1,258	11,30	3,990	14,72
	2,301	40,382	0,784	26,32	1,509	11,07	3,908	14,20
	2,407	41,823	0,846	25,91	1,484	9,85	3,571	15,30

Tabela 29 - Retenção cutânea, na pele de camundongos sem pêlo, dos corticosteróides AHC, ADM, D e TA da formulação controle sem lecitina, após 24 h. de experimento.

Substâncias Corticosteróide	Corticosteróide retido ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
AHC	18,05 ($\pm$ 0,053)
ADM	5,73 ($\pm$ 0,030)
D	2,35 ($\pm$ 0,041)
TA	3,78 ($\pm$ 0,032)

Os valores em parênteses representam os desvios padrão referentes a quatro determinações.

6 - DISCUSSÃO

Ao longo da última década, inúmeros pesquisadores foram atraídos a realizarem criteriosos estudos, objetivando determinar e entender os fatores farmacocinéticos, físico-químicos e farmacotécnicos, os quais envolvem a ação de produtos dermatológicos e de ação transdérmica.

Uma vez que a administração de produtos medicamentosos pela via cutânea destina-se a obtenção, tanto de uma ação tópica (*produto de ação dermatológica*) como também sistêmica (*produto transdermal*), é primordial que se tenha uma concreta definição de qual destas ações é desejada, visto que, os critérios para avaliação destes produtos são conceitualmente diferentes. Um produto dermatológico é destinado a liberar o(s) princípio(s) ativo(s) na pele para o tratamento de patologias cutâneas, sendo assim, a pele é o órgão alvo. Deste produto exige-se uma 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 (112).

Desde 1952 os corticosteróides têm ocupado uma posição de destaque entre as medicações anti-inflamatórias usadas para o brotamento de várias patologias cutâneas, tais como, dermatites, eczemas, intertrigem, psoríase, pitiríase, pruridos etc (69). Entretanto, ao lado da atividade tópica, estes princípio-ativos podem apresentar efeitos colaterais decorrentes, principalmente, de sua absorção sistêmica através da pele, fato este que está relacionado com a composição do veículo (90, 107).

Na avaliação da ação de produtos de ação dermatológica e transdermais, testes clínicos podem ser precedidos, e em algumas vezes substituídos, por testes *in vitro*. Estes testes, devido as 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 (131).

As colocações feitas acima levou-nos ao estudo de bases dermatológicas para a incorporação de corticosteróides, as quais proporcionassem uma disponibilidade adequada a estes fármacos, uma máxima retenção, e mínimo fluxo dos mesmos através da pele. Assim, a obtenção de produtos com efeitos colaterais mínimos seria otimizada.

Para viabilizar nossos objetivos, a princípio, procurou-se fazer uso de bases inócuas, com propriedades organolépticas e físico-químicas adequadas e compatíveis com os corticosteróides. Estes requisitos levaram-nos a estudar géis hidrófilos formados por uma sequência de co-polímeros (POE/POP/POE), mais especificamente o Poloxamer 407. Este co-polímero, apresenta gelatinização térmica reversível em concentrações superiores a 20%, e por isso foram considerados veículos potenciais para a liberação de fármacos.

Associado a base que forma o produto dermatológico, foi desejável a presença de adjuvantes que promovam adequadas liberação e penetração cutâneas. Assim, o uso de substâncias "promotoras de absorção cutânea" se fez necessário. Várias substâncias químicas têm sido estudadas e empregadas com esse propósito, como por exemplo, o dimetilsulfóxido, a dimetilformamida, os agentes tensoativos, os dissolventes (propilenoglicol, álcoois etc), ácidos graxos etc (1, 8, 26, 29, 53, 54, 57, 80, 103). Entretanto, ao lado da função de aumentar a penetração cutânea dos fármacos, tem-se o inconveniente da irritação que estas substâncias causam à pele (43).

Nos estados patológicos da pele onde é indicado o uso de produtos contendo corticosteróides, o local doente, apresenta-se irritado, com pruridos e, até mesmo, com feridas expostas (69). O uso de produtos que sejam irritantes é totalmente inadequado. Este fato conduziu-nos a selecionar substâncias "promotoras de absorção cutânea", as quais fossem inócuas e compatíveis com o tecido cutâneo. Duas substâncias preencheram plenamente estes requisitos, a uréia e a lecitina. A incorporação desta última nos géis de Ploxamer 407 só foi possível mediante a adição de um componente oleoso (vaselina líquida). Assim, obtiveram-se, na verdade, produtos leitosos, decorrente da emulsificação da vaselina líquida na base de gel hidrófilo.

Quatro corticosteróides foram incorporados, separadamente e em concentrações adequadas, nas formulações de géis contendo uréia ou lecitina, sendo dois fluorados (ADM e TA) e dois não fluorados (AHC e D).

Obtidas as formulações, foram avaliados os parâmetros físico-químicos, pH e reologia. Os géis hidrófilos contendo uréia e lecitina apresentaram valores de pH variando de 5,7 a 6,3 e de 5,9 a 6,2, respectivamente. Estes valores são compatíveis com a pele e a presença dos

diferentes corticosteróides não alterou o pH das formulações. Tal fato pode ser atribuído à natureza neutra desses princípios ativos.

A verificação do comportamento reológico de produtos semi-sólidos é importante, por: (6, 92):

- * Ajudar a entender a natureza físico-química do veículo;
- * Controlar a qualidade das formulações teste e produto final quanto ao processo de fabricação;
- * Estudar os efeitos das alterações na formulações, da temperatura e do tempo de armazenagem em um produto;
- * Investigar a capacidade do veículo em suspender sólidos ou líquidos imiscíveis;
- * Ensaiar uma formulação tópica com respeito ao uso pelo paciente, isto é, remoção do produto do material de embalagem, aderência e espalhabilidade na pele, etc;
- * Verificar o efeito da consistência do produto na liberação e absorção percutânea de fármacos.

Conforme se pode observar na Tabela 6, o aumento da concentração de adjuvante acarretou num aumento da viscosidade das formulações de géis contendo uréia ou lecitina. Este comportamento pode ser explicado pela diminuição do conteúdo de água da preparação, decorrente do aumento da concentração de uréia ou lecitina. Além disto, tais adjuvantes não apresentaram incompatibilidade física com a estrutura do co-polímero.

Analisado os reogramas obtidos, pode-se, verificar que as preparações exibiram um comportamento de fluxo não Newtoniano, do tipo pseudoplástico com Valor de Rendimento. O Valor de Rendimento pode ser definido como sendo o mínimo valor de stress necessário para que um produto comece a fluir ou deformar (6). Como pode ser observado, as curvas não iniciaram da origem (valor nulo para a tensão de cisalhamento), bem como, não são lineares com o aumento da tensão de cisalhamento, caracterizando assim, um fluxo do tipo pseudoplástico com Valor de Rendimento.

O aumento da concentração de adjuvante (uréia ou lecitina) acarretou num aumento do Valor de Rendimento. Este fato pode ser atribuído a um aumento da resistência da estrutura do gel diante de uma força, comportamento este que pode ajudar a manter um produto semi-sólido sobre a pele, evitando seu escorrimento. Quando este produto é espalhado sobre a área doente, com uma força que exceda o Valor de Rendimento, a preparação flui.

A tixotropia das amostras foi determinada pela Área de Histerese que as curvas dos reogramas produziram. De maneira geral, o aumento da concentração de uréia diminuiu a tixotropia dos géis. Comportamento oposto foi observado nos géis contendo lecitina, fato este que pode ser atribuído a emulsificação da vaselina pela lecitina.

Sendo o principal objetivo de nosso trabalho a verificação da liberação e penetração transcutânea dos corticosteróides AHC, ADM, D e TA, presentes nos géis contendo uréia ou lecitina, foi de fundamental importância padronizar um método *in vitro* adequado, o qual pudéssemos obter dados efetivos e seguros.

O fato de não existir uma metodologia oficial para estudos de liberação *in vitro* de produtos tópicos dificultou nosso trabalho a princípio. A célula de difusão nº 1 (Figura 8) foi projetada baseando-se no modelo de TURAKKA et al. (129) e modificado por BADRA et al. (4). Tal aparelho não apresentou uniformidade de agitação, nem controle da temperatura interna e da velocidade do agitador magnético. A célula de difusão nº 2 (Figura 9) foi baseada no modelo de FRANZ (34), possui dimensões menores, o que traduz numa economia de solução receptora e produto a ser aplicado sobre a membrana. Entretanto, foram detectados os mesmos problemas da célula nº 1. Em virtude dos resultados obtidos, adaptou-se o modelo de dissolução da Farmacopéia Norte-Americana (89, 98, 114) para produtos transdermais obtendo a célula nº 3 (Figura 10). Esta célula de difusão apresentou temperatura constante (37 °C) e agitação controlada, estipulada em 100 rpm.

A qualidade de agitação é dependente do tipo de agitador empregado. Os agitadores magnéticos causam mistura de fluidos nas proximidades do agitador, mas não geram movimento lateral do fluido. Assim, os agitadores em forma de pá parecem mais adequados. A solução receptora de uma célula de difusão *in vitro* deve ser adequadamente agitada, evitando-se assim,

desenvolvimento de concentrações localizadas de fármacos. A agitação deve ser suficientemente vigorosa para minimizar as camadas de difusão na interface da membrana, fato este que promoveria uma resistência adicional à difusão do fármaco para a solução receptora (118).

Uma vez escolhida a célula de difusão para os nossos experimentos, partimos para a seleção da fase receptora e das membranas.

A eleição de uma solução receptora para os experimentos *in vitro* é crítica quando se trabalha com fármacos de baixa solubilidade em água. Pode-se obter falsos resultados devido a insolubilidade do fármaco na solução receptora. Trabalhar em "sink conditions" torna-se indubitavelmente necessário para se garantir a obtenção de resultados efetivos (131).

As soluções receptoras mais indicadas são tampões isotônicos com valores de pH em torno de 7,2, os quais podem ser acrescidos de co-solubilizadores dos fármacos em estudo (14, 96, 108, 120). Várias substâncias são utilizadas com este propósito, no entanto, o polietilenoglicol 20 cetil éter parece ser o mais adequado para uso em sistemas de permeação (2, 71)

Conforme pode ser verificado na Tabela 7, a presença do referido tensoativo na concentração de 0,5%, melhorou a solubilidade dos corticosteróides no tampão fosfato isotônico, pH = 7,2. Para o AHC e a D a solubilidade foi duplicada, triplicada para TA, e quadruplicada para o ADM. Assim, garantiram-se condições adequadas para a difusão e solubilização destes corticosteróides na solução receptora.

A membrana é outro fator crítico na condução dos experimentos de liberação e penetração *in vitro*. As membranas sintéticas, como as de acetato de celulose, são indicadas para a verificação das características de liberação que o veículo proporciona ao fármaco. No entanto, trata-se de uma membrana hidrófila que não possui as propriedades anatômicas e fisiológicas da pele. Assim, é também necessário realizar estudos com membranas naturais (pele humana ou de animais).

A pele humana decididamente é a mais adequada para estudos *in vitro*. Entretanto, a dificuldade na aquisição deste tecido e a variação biológica das amostras de pele, levaram os pesquisadores a empregarem peles de animais (14, 20, 27, 30, 64, 94, 132, 133).

A pele abdominal de camundongos sem pêlo tem sido muito utilizada nos experimentos *in vitro*, apesar de algumas diferenças anatômicas quando comparada com a pele humana (7, 13, 30). A viabilidade de aquisição, a melhor uniformidade das amostras, bem como a facilidade de dissecação e separação do tecido subcutâneo, levou-nos a eleger a pele de camundongos sem pêlo como modelo de membrana para os nossos propósitos (30).

Segundo SHAH et al. (112), nos estudos *in vitro*, a quantidade de produto a ser aplicado sobre a membrana deveria ser de 1,0 a 3,0 μL solução/ cm^2 ou 1,0 a 3,0 mg semi-sólido/ cm^2 . Entretanto, quando o material a ser empregado é semi-sólido, o espalhamento de uma quantidade finita deste produto dificilmente produziria uma camada uniforme sobre a membrana. Nesta situação, é aconselhável o uso de "dose infinita", ou seja, um excesso de produto (118).

AMERONGEN et al. (2) utilizaram dose infinita em seus estudos de liberação *in vitro* da budesonida contida em cremes, e verificaram que acima de 0,9 mm de espessura de produto sobre a membrana, o perfil de liberação do fármaco não apresentou diferença. Baseado nisto, trabalhamos com dose infinita de géis contendo uréia ou lecitina, utilizando um volume de 1,5 mL.

A base dos experimentos *in vitro* de liberação e penetração transcutânea é determinar as pequenas quantidades de fármaco que atravessam as membranas ou que ficam retidos nas mesmas. O desenvolvimento de um método analítico específico e sensível, o qual viabilizasse nossos experimentos, foi considerado extremamente importante.

Para estudo *in vitro*, dois métodos analíticos são indicados, o radioimunoensaio e a CLAE (112). Neste trabalho a CLAE apresentou-se mais adequada para nossos experimentos. A metodologia analítica padronizada foi baseada no método proposto por TOOTHAKER et al. (127). Uma vez que os quatro corticosteróides empregados seriam quantificados separadamente, procurou-se padronizar uma metodologia analítica comum para essas substâncias. Assim, fixamos uma única fase móvel, metanol: H_2O (60:40), e utilizamos um corticosteróide como padrão interno do outro.

As Figuras 14, 15, 16 e 17 ilustram os cromatogramas obtidos pela extração dos corticosteróides na solução receptora. Como se pode observar, obtiveram-se boas resolução e separação dos picos cromatográficos. A recuperação relativa (R_r) foi adequada, variando-se de

88,81 a 97,31%, resultados estes considerados adequados para um processo extrativo. A metodologia analítica desenvolvida apresentou linearidade na faixa de 50,0 a 600,0 ng ($r = 0,9998$) para o AHC; de 50,0 a 800,0 ng ($r = 0,9997$) para o ADM; de 10,0 a 500,0 ng ($r = 0,9949$) para a TA; e de 25,0 a 500,0 ng ($r = 0,9997$) para a D. Estes resultados mostram que o método por CLAE padronizado foi sensível e específico.

A determinação por CLAE dos corticosteróides retidos na pele de camundongos sem pêlo foi realizado após extração direta com metanol (102). Este procedimento apresentou-se adequado, uma vez que esses fármacos são solúveis em metanol, e os componentes da pele, que por ventura foram extraídos, não interferiram no método analítico. O mesmo ocorreu com a determinação dos corticosteróides contidos nas formulações. Sendo essas preparações de composição simples, totalmente solúveis em metanol, e com componentes que não interferiram no método, a simples diluição em metanol foi suficiente para uma efetiva extração (Tabela 4).

Definidas as metodologias *in vitro* e CLAE, os estudos de liberação e penetração transcutânea foram conduzidos. Os dados obtidos foram interpretados segundo dois modelos cinéticos de liberação de fármacos: o de HIGUCHI (22, 45, 71, 96, 111, 113) e o de 1ª ordem (100). Analisando as Tabelas 23, 24, 25 e 26 pode-se verificar que o modelo de cinética de 1ª ordem apresentou, em todos os casos, um maior coeficiente de correlação.

Isto sugere que as formulações testadas seguem cinética de 1ª ordem para a liberação e penetração transcutânea dos corticosteróides. Diante deste fato, consideramos os dados de tempo *LAG* e fluxo (*J*), referentes a este modelo, mais adequados para nossas conclusões.

Conforme pode ser verificado nas Tabelas 23 e 24, a concentração dos adjuvantes (uréia e lecitina) interferiram no processo de liberação dos corticosteróides.

Nos géis contendo uréia observou-se que o AHC, o ADM e a TA apresentaram uma diminuição do tempo *LAG* e aumento do fluxo com o aumento da concentração do adjuvante. Para a D, o comportamento foi inverso. A presença de lecitina proporcionou um aumento do tempo *LAG* e do fluxo (*J*) para o AHC, D e a TA. O ADM apresentou uma diminuição do fluxo (*J*) com o incremento da concentração de lecitina.

A cinética de penetração transcutânea das formulações desenvolvidas está demonstrada na Tabela 25 e 26. Para todos os corticosteróides estudados observou-se que o aumento da concentração de uréia acarretou no aumento tanto do tempo *LAG* como do fluxo (*J*).

Praticamente, em todas as formulações contendo lecitina, o aumento da concentração deste adjuvante proporcionou um aumento do tempo *LAG* e do fluxo (*J*), sendo este último parâmetro diminuído para a *D*.

Nos estudos *in vitro* de produtos dermatológicos, é importante considerar que as concentrações de fármaco na solução receptora não refletem, por si só, a influência da formulação na atividade do produto. Assim, a determinação da quantidade de fármaco retida na membrana natural leva a dados mais concretos, os quais podem elucidar o grau de atividade tópica do produto. Esta técnica tem sido empregado por muitos autores quando do estudo de penetração cutânea de fármacos (22, 71, 86, 95, 102).

As Tabelas 27 e 28 descrevem os valores das quantidades de cada corticosteróide permeadas e retidas na pele de camundongo sem pêlo, após 24 horas, para as diferentes formulações testadas. Esses resultados podem ser melhor visualizados quando plotamos tais quantidades em função da concentração de adjuvante (Figura 30 e 31). Analisando estes gráficos verificou-se que para todos os corticosteróides, o aumento da concentração de uréia ou lecitina, levou a um aumento da quantidade de fármaco retido, após 24 horas de experimento.

Figura 30 - Quantidade de corticosteróide retido (▲) e penetrado (■) versus a concentração de uréia nos géis hidrófilos.

Figura 31 - Quantidade de corticosteróide retido (▲) e penetrado (■) versus a concentração de lecitina nos géis hidrófilos.

A permeação ou penetração transcutânea, na maioria das vezes, diminuiu com o aumento da concentração de adjuvante, chegando até mesmo a uma ausência de permeação. Uma exceção foi observada para a D presente nos géis contendo uréia, onde o aumento da concentração do adjuvante aumentou a penetração transcutânea do fármaco.

Como foi exposto anteriormente o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver formulações de géis de co-polímero (POE/POP/POE) contendo uréia ou lecitina, os quais proporcionassem efeitos sistêmicos mínimos. Assim, foram selecionadas preparações que apresentaram uma máxima retenção cutânea associada a um mínimo ou inexistente fluxo dos corticosteróides. As figuras 30 e 31 foram extremamente práticas para este propósito, e o resultados estão demonstrados na Tabela 30.

Analizando a Tabela 30, quando se compara as formulações contendo uréia e as contendo lecitina, estas últimas apresentaram maior quantidade de corticosteróide retida. O AHC foi retido quase que duas vezes mais nas formulações contendo 8,0% de lecitina (L₄). Esta mesma formulação triplicou a retenção do ADM na pele de animal, e proporcionou uma retenção da D 3,6 vezes maior que o gel contendo uréia. A concentração de 4,0% de lecitina foi suficiente para triplicar a retenção da TA.

A presença da vaselina nas formulações de gel com lecitina não influenciou nestes resultados (Tabela 29). A retenção cutânea das formulações controle sem lecitina, apresentou valores inferiores quando comparadas com as preparações contendo lecitina.

Associar a melhor atuação das formulações contendo lecitina ao comportamento reológico poderia ser uma alternativa. A lecitina aumentou a tixotropia das formulações, conseqüentemente a difusão dos corticosteróides estaria facilitada. Entretanto, o aumento da viscosidade também foi observado, e isto é um fator que compromete a difusão de um fármaco através do veículo.

Correlaciona o comportamento reológico com os resultados de liberação, penetração transcutânea e retenção cutânea é um procedimento crítico. Isto porque, não se conhece e ainda não é possível determinar o real comportamento reológico do produto quando dos experimentos *in*

vitro. A literatura ainda não mostra uma relação matemática satisfatória para correlacionar disponibilidade do fármaco na pele com o comportamento reológico de semi-sólidos (6).

Uma explicação plausível para este comportamento poderia estar fundamentada nos mecanismos de ação que estes adjuvantes possuem como promotores de absorção cutânea.

Tabela 30 - Formulações selecionadas quanto aos critérios de retenção e penetração transcutânea dos corticosteróides.

Corticosteróide	ADJUVANTE			
	Uréia		Lecitina	
	Formulação selecionada	Quantidade retida* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Formulação selecionada	Quantidade retida* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
AHC	G ₄ (12,0% uréia)	23,14 ($\pm 0,454$)	L ₄ (8,0% lecitina)	41,83 ($\pm 0,554$)
ADM	G ₄ (12,0% uréia)	8,38 ($\pm 0,405$)	L ₄ (8,0% lecitina)	25,38 ($\pm 0,529$)
D	G ₃ (8,0% uréia)	2,91 ($\pm 0,117$)	L ₄ (8,0% lecitina)	10,62 ($\pm 0,339$)
TA	G ₄ (12,0% uréia)	3,95 ($\pm 0,130$)	L ₃ (4,0% lecitina)	11,75 ($\pm 0,428$)

Os valores em parênteses representam os desvios padrão referentes a quatro determinações.

A uréia, por ser uma substância hidrófila, atua pela rota polar, aumentando a hidratação do estrato córneo. Outro modo de ação da uréia é a sua suave ação queratolítica na pele, a qual poderia diminuir a barreira do estrato córneo a entrada de substâncias na pele. A uréia está presente na composição do Fator de Hidratação Natural (FHN) da pele, e não é irritante em altas concentrações (6).

A lecitina atua pela rota lipídica, interagindo com os fosfolípidos da pele, atuando, assim, como verdadeiro correador de princípios ativos lipófilos. Vários autores empregaram com sucesso este adjuvante como promotor de absorção em vias de administração tópicas (23, 31, 56, 76, 130).

Os coeficientes de partição óleo/água podem explicar o grau de interação destas substâncias com a pele e com o veículo empregado. Entretanto, considerações teóricas não são aconselháveis, uma vez que substâncias com altos valores de coeficiente de partição podem não traduzir uma alta interação das mesmas na pele. Nestes casos, o veículo e adjuvantes interferem significativamente na liberação e retenção cutânea, como foi observado no decorrer deste trabalho. Por exemplo, o fato do ADM ter o maior coeficiente de partição óleo/água, ou seja 31, 92, não evitou que sua retenção cutânea sofresse interferência dos adjuvantes.

Somente, a realização de testes de liberação *in vitro* com membranas sintéticas, não é aconselhável para estudos de produtos dermatológicos. É necessário, também, conduzir experimentos *in vitro* de penetração transcutânea e retenção com membranas naturais. Isto porque, as características de uma formulação podem não ter uma correlação direta com a disponibilidade do fármaco na pele e vice-versa. Assim, os dados de liberação, penetração transcutânea e retenção devem ser analisados em conjunto, no sentido de se evitar falsas conclusões.

A contribuição da metodologia *in vitro* para a Farmacotécnica é inquestionável, pois representa um procedimento prático, rápido e de baixo custo. Os estudos *in vitro*, mencionados ao longo deste trabalho, também possuem aplicação no controle de qualidade de uniformidade de lotes de produtos dermatológicos na Indústria Farmacêutica. Entretanto, deve-se ter cautela quando da extrapolação dos resultados obtidos para situações *in vivo*. Com a metodologia *in vitro* pode-se fazer um prévio selecionamento das formulações antes da aplicação de testes clínicos.

Assim, os estudos *in vitro* de liberação, penetração e retenção cutânea tornaram-se necessários para o desenvolvimento de formulações dermatológicas efetivas, seguras e com características físico-químicas bem definidas.

7 - CONCLUSÕES

A realização deste trabalho levou as seguintes conclusões:

- 1 - A metodologia analítica *in vitro* padronizada mostrou-se adequada para a verificação da liberação, penetração transcutânea e retenção cutânea de corticosteróides contidos em formulações tópicas.
- 2 - A uréia e a lecitina foram eficazes como promotores de absorção cutânea para os corticosteróides testados. A concentração desses adjuvantes no gel de Poloxamer 407 interferiu nos parâmetros avaliados.
As liberações e a penetração transcutânea dos corticosteróides contidos nas formulações desenvolvidas obedeceram cinética de 1ª. ordem.
- 3 - A concentração de 12,0% de uréia foi efetiva para a AHC, o ADM, e a TA, e de 8,0% para a D. Com relação a lecitina, a concentração de 8,0% foi adequada para o AHC, o ADM e a D, e de 4,0% para a TA.
- 4 - De maneira geral, as formulações selecionadas contendo lecitina apresentaram-se quantitativamente mais eficazes quanto à retenção cutânea dos corticosteróides testados, sendo que a presença da vaselina não influenciou neste parâmetro.
- 5 - Os géis de Poloxamer 407 associados com lecitina ou uréia podem ser considerados potenciais veículos dermatológicos para a incorporação de corticosteróides.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AKHTER, S.A., BARRY, B.W. Enhanced flurbiprofen permeation through human skin in: use of N-methyl-2-pyrrolidone (NP), 2-pyrrolidone (2P) and dimethylisosorbide (DS). **J. Pharm. Pharmacol., Suppl.**, London, v. 37, 83P, 1985.

- 2 - AMERONGEN, I.A., RONDE, H.A.G., KLOOSTER, N.T.M. Physical-chemical characterization of semisolid topical dosage form using a new dissolution system. **Int. J. Pharm., Amsterdam**, v. 86, p. 9-15, 1992.

- 3 - ATTWOOD, D., COLLETT, J.H., TAIT, C.J. The micellar properties of the poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) copolymer Pluronic F-127 in water and electrolyte solution. **Int. J. Pharm., Amsterdam**, v. 26, p. 25-33, 1985.

- 4 - BADRA, M.V.L., MAIA CAMPOS, P.M.B.G., RICCI, G. Estudo da influência de diferentes veículos cosméticos na liberação e absorção do D-Pantenol: Avaliação in vitro e in vivo. In: **CONGRESO LATINO AMERICANO Y IBÉRICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS**, 11, 1993. Montevideo, Anais, p. 215-20.

- 5 - BAE, Y.H., KIM, S.W. Hydrogel delivery systems based on polymer blends, block copolymers on interpenetrating networks. **Adv. Drug. Del. Rev.**, Amsterdam, v. 11, n. 1-2, p. 109-35, 1993.

- 6 - BARRY, B.W. **Dermatological Formulations. Percutaneous absorption**. New York: Marcel Dekker, 1983, p. 1-233, 351- 407.

- 7 - BARRY, B.W. Transdermal drugs delivery. In: JOHNSON, P., LLOYD-JONES, J.G. **Drug Delivery Systems (Fundamentals and Techniques)**. Chichester, Ellis Horwood, 1987, p. 200-23.

- 8 - BARRY, B.W., BENNETT, S.L. Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 39, p. 535-46, 1987.
- 9 - BENITA, S., HOFFMAN, A., DONBROW, M. Microencapsulation of paracetamol using polyacrylate resins (Eudragit Retard), kinetics of drug release and evaluation of kinetic model. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 37, p. 391-5, 1985.
- 10 - BENNETT, S.L., BARRY, B.W. Effectiveness of skin penetration enhancers propylene glycol, azone, decylmethylsulphoxide and oleic acid with model polar (mannitol) and nonpolar (hydrocortisone) penetrants. **J. Pharm. Pharmacol., Suppl.**, London, v. 37, 84P, 1985.
- 11 - BOND, J.R., BARRY, B.W. Long term hydration effects on permeability of hairless mouse skin. **J. Pharm. Pharmacol., Suppl.**, London, v. 37, 77P, 1985.
- 12 - BOTTARI, F., DI COLO, G., NANNIPIERI, E., SAETTONI, M.F., SERAFINI, M.F. Release of drugs from ointment bases II: *In vitro* release of benzocaine from suspension - type aqueous gels. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 66, n. 7, p. 926-31, 1977.
- 13 - BRONAUGH, R.L., CONGDON, E.R., SCHEUPLEIN, R.J. The effect of cosmetic vehicles on the penetration of N. nitrosodiethanolamine through excised human skin. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 76, n. 2, p. 94-6, 1981.
- 14 - BRONAUGH, R.L., STEWART, R.F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies III: Hydrophobic compounds. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 73, n. 9, p. 1255-8, 1984.

- 15 - BROUNAUGH, R.L., STEWART, R.F., CONGDON, E.R. Methods for in vitro percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v. 62, p. 481-8, 1982.
- 16 - BRONAUGH, R.L., STEWART, R.F. Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 74, n. 1, p.64-7, 1985.
- 17 - BRONAUGH, R.L., STEWART, R.F. Methods for in vitro percutaneous absorption studies VI: preparation of the barrier layer. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 75, n. 5, p. 487-091, 1986.
- 18 - BUSSE, M.J., HUNT, P., LEES, K.A., MAGGS, P.N.D., MCCARTHY, T.M. Release of betamethasone derivatives from ointments - in vivo and in vitro studies. **Br. J. Dermatol.**, Suppl., Oxford, v. 81, p. 103-12, 1969. (Supplement. 4).
- 19 - CAPPEL, M.J., KREUTER, J. Effect of nonionic surfactantes on transdermal drug delivery: I Polysorbates. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 69, p. 143-53, 1991.
- 20 - CHIANG, C.M., FLYNN, G.L., WEINER, N.D., SZPUNAR, G.J. Bioavailability assessment of topical delivery systems: effect of inter-subject variability on relative in vitro deliveries of minoxidil and hydrocortisone from solution and ointment formulations. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 50, p. 21-6, 1989.
- 21 - CHIEN, Y.W. Developmental concepts and practice in transdermal therapeutics systems. In: CHIEN, Y.W. **Transdermal Controlled Systemic Medications**. New York: Marcel Dekker, 1987, p. 25-81.

- 22 - CHOW, D.S.L., KAKA, I., WANG, T.I. Concentration-dependent enhancement of 1-dodecylazacycloheptan-2-one, on the percutaneous penetration kinetics of triamcinolone acetonide. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 73, n. 12, p. 1794-9, 1984.
- 23 - CHOWHAN, Z.T., PRITCHARD, R. Release of corticoids from oleaginous ointment bases containing drugs in suspension. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 64, n. 5, p. 754-9, 1975.
- 24 - COLDMAN, M.F., POULSEN, B.J., HIGUCHI, T. Enhancement of percutaneous absorption by the use of volatile: nonvolatile systems as vehicles. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 58, n. 9, p. 1098-102, 1969.
- 25 - COLLETT, J.H., TOBIN, E.A. Relationships between poloxamer structure and the solubilization of some para-substituted acetanilides. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 1, p. 174- 7, 1979.
- 26 - DELATTRE, L. Excipients et nouvelles formes topiques en dermatologie. **J. Pharm. Belg.**, Bruxelles, v. 48, n. 4, p. 261-9, 1993.
- 27 - DE VOS, F., DE MUYNCK, C., GEERTS, M., REMON, J.P. Percutaneous absorption of indomethacin from transparent oil/water gels in rabbits. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 43, p. 237-41, 1991.
- 28 - DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas, 22ª ed., Rio de Janeiro, Editora de Publicações Médicas, 1993/1994.

- 29 - DI COLO, G., GIANNESI C., NANNIPIERI, E., SERAFINI, M.F., VITALE, D. Influence of drug-surfactant and skin-surfactant interaction on percutaneous absorption of two model compounds from ointment bases in vitro. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 50, p. 27-34, 1989.
- 30 - DÜRRHEIM, H., FLYNN, G.L., HIGUCHI, W.I., BEHL, C.R. Permeation of hairless mouse skin I: Experimental methods and comparison with human epidermal permeation by alkanols. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 69, n. 7, p. 781- 6, 1980.
- 31 - ELIAS, P.M. The importance of epidermal lipids for the stratum corneum barrier. In: OSBORNE, D.W., AMANN, A.H. **Topical drug delivery formulations**. New York, Marcel Dekker, 1990, p. 13-28.
- 32 - FLYNN, G.L. Mechanism of percutaneous absorption from physicochemical evidence. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I. **Percutaneous Absorption (Mechanisms, Methodology, Drug Delivery)**, 2 ed., New York, Marcel Dekker, 1989, p. 37.
- 33 - FLYNN, G.L., DÜRRHEIM, H., HIGUCHI, W.I. Permeation of hairless mouse skin II: Membrane sectioning techniques and influence on alkanol permeabilities. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 70, n. 1, p. 52-6, 1981.
- 34 - FRANZ, T.J. Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 64, n. 3, p. 190-5, 1975.
- 35 - FULLERTON, D.S. Steroids and therapeutically related compounds. In: DOERGE, R.F. **Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, 2 ed., New York, J.B. Lippincott Company, 1982, p. 657-732.

- 36 - GAGNE', D., LODGE, B.A. Analysis of dexamethasone sodium phosphate formulation by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 193, p. 160-2, 1980.
- 37 - GASCO, M.R., GALLARTE, M., PAPTARINO, F. *In vitro* permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 69, p. 193-6, 1991.
- 38 - GASCO, M.R., GALLARATE, M., PATTARINO, F. On the release of prednisone from oil water microemulsions. **Il Farmaco**, Pavia, v. 43, n. 10, p. 325-30, 1988.
- 39 - GASCO, M.R., TROTTA, M., CARLOTTI, M.E. Effect of carboxylic acids on permeation of chlorpromazine through dimethyl polysiloxane membrane. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 71, n. 2, 239-41, 1982.
- 40 - GHOSH, T.K., CHIAO, C.S., GOKHALE, R.D. *In vitro* permeation of some β -blockers across the hairless mouse skin. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 45, p. 218-9, 1993.
- 41 - GOODMAN, M., BARRY, B.W. Differential scanning calorimetry (DSC) of human stratum corneum: effect of azone. **J. Pharm. Pharmacol., Suppl.**, London, v. 37, 80P, 1985.
- 42 - GUMMER, C.L., HINZ, R.S., MAIBACH, H.I. The skin penetration cell: a design update, **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 40, p. 101-4, 1987.
- 43 - GUPTE, V.V., MATHESON, L.E. Permeation of small organic molecules through hairless mouse skin: correlation with flux through polydimethylsiloxane (PDMS) membrane. **Pharm. Res., Suppl.**, New York, v. 10, n. 10, PDD 7255, 1993.

- 44 - GUY, R.H., HADGRAFT, J. Mathematical models of percutaneous absorption. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I. **Percutaneous Absorption (Mechanisms, Methodology, Drug Delivery)**, 2 ed., New York, Marcel Dekker, 1989, p. 13-26.
- 45 - GUY, R.H., HADGRAFT, J. On the determination of drug release rates from topical dosage forms. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 60, R1-R3, 1990.
- 46 - HADGRAFT, J., ASHTON, P. The effect of sodium lauryl sulphate on topical drug availability. **J. Pharm., Pharmacol., Suppl.**, London, v. 37, 85P, 1985.
- 47 - HADGRAFT, J., BEUTNER, D., WOLFF, H.M. *In vivo-in vitro* comparisons in the transdermal delivery of nitroglycerin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 89, R1-R4, 1993.
- 48 - HADGRAFT, J., RIDOUT, G. Comparison between two *in vitro* methods for determining percutaneous absorption. **J. Pharm. Pharmacol., Suppl.**, London, v. 37, 75P, 1985.
- 49 - HATANAKA, T., INUMA, M., SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y. Prediction of skin permeability of drugs. II. Development of composite membrane as a skin alternative. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 79, p. 21-8, 1992.
- 50 - HOLLAND, J.M., KAO, J.Y., WHITAKER, M.J. A multisample apparatus for kinetic evaluation of skin penetration *in vitro*: the influence of viability and metabolic status of the skin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v. 72, p. 272-80, 1984.
- 51 - HORI, M., SATOH, S., MAIBACH, H.I. Classification of percutaneous penetration enhancers: a conceptional diagram. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 42, p. 71-2, 1990.

- 52 - HORI, M., SATOH, S., MAIBACH, H.I., GUY, R.H. Enhancement of propranolol hydrochloride and diazepam skin absorption *in vitro*: effect of enhancer lipophilicity. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 80, n. 1, p. 32-5, 1991.
- 53 - HWANG, C.C., DANTI, A.G. Percutaneous absorption of flufenamic acid in rabbits: effect of dimethyl sulfoxide and various nonionic surface-active agents. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 72, n. 8, p. 857-60, 1983.
- 54 - IDSON, B. Percutaneous absorption. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 64, n. 6, p. 901-24, 1975.
- 55 - INFORMACION DE MEDICAMENTOS. USP. Di Edicion en Español. Madrid, Ministerio de Sanidad y Consumo, 1989. p. 809-23.
- 56 - ISHII, F., SASAKI, I., OGATA, H. Effect of phospholipid emulsifiers on physicochemical properties of intravenous fat emulsions and/or drug carrier emulsions. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 42, p. 513-5, 1990.
- 57 - KADIR, R., BARRY, B.W. a-Bisabolol, a possible safe penetration enhancer for dermal and transdermal therapeutics. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 70, p. 87-94, 1991.
- 58 - KADIR, R., BARRY, B.W., FAIRBROTHER, J.E., HOLLINGSBEE, D.A. Delivery of triamcinolone acetonide through human epidermis: effect of Actiderm, a new hydrocolloid dermatological patch. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 60, p. 139-45, 1990.
- 59 - KNECZKE, M., LANDERSJÖ, L., LUNDGREN, P., FÜHRER, C. *In vitro* release of salicylic acid from two different qualities of white petrolatum. **Acta Pharm. Suec.**, Stockholm, v. 23, n. 4, p. 193-204, 1986.

- 60 - KONTTURI, K., MURTOMÄKI, K., HIRVONEN, J., PARONEN, P., URTTI, A.
Electrochemical characterization of human skin by impedance spectroscopy: the effect of penetration enhancers. **Pharm. Res.**, New York, v. 10, n. 3, p. 381-5, 1993.
- 61 - KUBOTA, K., KOYAMA, E., TWIZELL, E.H. Dual sorption model for the nonlinear percutaneous permeation kinetics of timolol. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 82, n. 12, p. 1205-8, 1993.
- 62 - KUBOTA, K., MAIBACH, H.I. *In vitro* percutaneous permeation of betamethasone and betamethasone 17-valerate. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 82, n. 10, p. 1039-45, 1993.
- 63 - KUBOTA, K., SZNITOWSKA, M., MAIBACH, H.I. Percutaneous absorption: a single-layer model. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 82 n. 5, p. 450-6, 1993.
- 64 - KUROSAKI, Y., NAGAHARA, N., TANIZAWA, T., NISHIMURA, H. NAKAYAMA, R., KIMURA, T. Use of lipid disperse systems in transdermal drugs delivery: comparative study of flufenamic acid permeation among rat abdominal skin, silicon rubber membrane and stratum corneum sheet isolated from hamster cheek pouch. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 67, p. 1-9, 1991.
- 65 - MAIA CAMPOS, G. "G.M.C. software versão 6.6. Desenvolvido no Departamento de Estomatologia, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.
- 66 - MAITANI, Y., COUTEL-EGROS, A., OBATA, Y., NAGAI, T. Prediction of skin permeabilities of diclofenac and propranolol from theoretical partition coefficients determined from cohesion parameters. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 82, n. 4, p. 416-20, 1993.

- 67 - MARON, N., CRISTI, E.A., RAMOS, A.A. Determination of betamethasone 17-benzoate in lipophylic vehicles by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 77, n. 7, p. 638-9, 1988.
- 68 - MARTIN, A., BUSTAMANTE, P., CHUN, A.H.C. *Physical Pharmacy. Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993, p. 324-61, p. 556-94.
- 69 - MARTINDALE *The extra Pharmacopoeia*. 30^a ed. London: The Pharmaceutical Press, 1993, p. 712-40.
- 70 - MASINI, V., BONTE, F., MEYBECK, A., WEPIERRE, J. Cutaneous bioavailability on hairless rats of tretinoin in liposomes or gel. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 82, n. 1, p. 17-21, 1993.
- 71 - MICHNIAK, B.B., CHAPMAN, J.M., SEYDA, K.L. Facilitated transport of two model steroids by esters and amides of clofibric acid. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 82, n. 2, p. 214-19, 1993.
- 72 - MICHNIAK-MIKOLAJCZAK, B.B., BARRY, B.W. Water vapour sorption and desorption in human stratum corneum *in vitro*: effect of sodium chloride and urea. *J. Pharm. Pharmacol., Suppl.*, London, v. 37, 79P, 1985.
- 73 - MIREJOVSKY, D., TAKRURI, H. Dermal penetration enhancement profile of hexamethylenelauramide and its homologues: *in vitro* versus *in vivo* behavior of enhancers in the penetration of hydrocortisone. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 75, n. 11, p. 1089-93, 1986.

- 74 - MOES, A.J. La pénétration percutanée des médicaments. *J. Pharm. Belg.*, Bruxelles, v. 48, n. 4, p. 252-60, 1993.
- 75 - MOLLGAARD, B., HOELGAARD, A. Vehicle effect on topical drug delivery II. Concurrent skin transport of drugs and vehicle components. *Acta Pharm. Suec.*, Stockholm, v. 20, p. 443-50, 1983.
- 76 - MORIMOTO, K., FUKANOKI, S., HTAKEYAMA, Y., NAGAYASU, A., MORISAKA, K., HYON, S.H., IKADA, Y. Desing of a polyvinyl alcohol hydrogel containing phospholipid as controlled-release vehicle for rectal administration of ($\pm$)-propanolol HCl. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 42, p. 720-2, 1990.
- 77 - MUNRO, D.D. The relationship between percutaneous absorption and statrum corneum retention. *Br. J. Dermatol.*, Suppl., Oxford, v. 81, p. 92-7, 1969. (Supplement 4).
- 78 - NEUBERT, R., BENDAS, C., WOHLRAB, W., GIENAU, B., FÜRST, W. A multilayer membrane system for modelling drug penetration into skin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 75, p. 89-94, 1991.
- 79 - NEUBERT, R., WINTER, K., BENDAS, B. Bestimmung der Arzneistoffverfügbarkeit aus kommerziellen topischen Zubereitungen mit dem Mehrschichtmembranmodell. *Pharmazie*, Frankfurt/Main, v. 48, n. 1, p. 54-6, 1993.
- 80 - NIAZY, E.M. Influence of oleic acid and other permeation promoters on transdermal delivery of dihydroergotamine through rabbit skin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 67, p. 97-100, 1991.

- 81 - NIEMI, L., KAHELA, P., TURAKKA, L. Effect of water content and type of emulgator on the release of hydrocortisone from O/W creams. *Acta Pharm. Nordica*, Stockholm, v. 1, n. 1, p. 23-30, 1989.
- 82 - OKAMOTO, H. HASHIDA, M., SEZAKE, H. Effect of 1-alkyl- or 1-alkenylazacycloalkanone derivatives on the penetration of drugs with different lipophilicities through guinea pig skin. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 80, n. 1, p. 39-45, 1991.
- 83 - OLSZEWSKI, Z., KUBIS, A. Examination on the liberation process of active substances from ointment bases by means of the authors' construction apparatus. *Acta Polon. Pharm.*, Warszawa, v. 26, n. 5, p. 440-9, 1969.
- 84 - ORR, N.A., HILL, E.A., SMITH, J.F. Dosage uniformity in hydrocortisone ointment B.P. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 32, p. 166-72, 1980.
- 85 - OSTRENGA, J., STEINMETZ, C., POULSEN, B. Significance of vehicle composition I: Relationship between topical vehicle composition, skin penetrability, and clinical efficacy. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 60, n. 8, p. 1175-9, 1971.
- 86 - PANCHAGNULA, R., RITSCHER, W.A. Development and evaluation of an intracutaneous depot formulation of corticosteroids using Transcutol as a cosolvent: *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* rat studies. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 43, p. 609-14, 1991.
- 87 - PEPPAS, N.A., KHARE, A.R. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Adv. Drug. Del. Rev.*, Amsterdam, v. 11, n. 1-2, p. 1-35, 1993.

- 88 - PETERSEN, M.C., NATION, R.L., ASHLEY, J.J. Simultaneous determination of betamethasone, betamethasone acetate and hydrocortisone in biological fluids using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 183, p. 131-9, 1980.
- 89 - PHARMACOPOEIA of The United States of America 22nd ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 1990, p. 1578-83.
- 90 - POLANO, M.K., PONEC, M. Dependence of corticosteroid penetration on the vehicle. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v. 112, n. 5, p. 675-80, 1976.
- 91 - PRÍBORSKÝ, J., MÜHLBACHOVÁ, E. Evaluation of *in vitro* percutaneous absorption across human skin and in animal models. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 42, p. 468- 72, 1990.
- 92 - RAYNAL, S., GROSSIORD, J.L., SEILLER, M., CLAUSSE, D. A topical W/O/W multiple emulsion containing several active substances: formulation, characterization and study of release. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 129-40, 1993.
- 93 - REGNIER, M., CARON, D., REICHERT, U., SCHAEFER, H. Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 82, n. 4, p. 404-7, 1993.
- 94 - REIFENRATH, W.G., CHELLQUIST, E.M., SHIPWASH, E.A., JEDERBERG, W.W., KRUEGER, G.G. Percutaneous penetration in the hairless dog, weanling pig and grafted athymic nude mouse: evaluation of models for predicting skin penetration in man. *Br. J. Dermatol.*, Oxford, v. 27, p. 123-35, 1984.

- 95 - REIFENRATH, W.G., HAWKINS, G.S., KURTZ, M.S. Percutaneous penetration and skin retention of topically applied compounds: an *in vitro-in vivo* study. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 80, n. 6, p. 526-31, 1991.
- 96 - ROLLAND, A., DEMICHELIPS, G., JAMDULLE, J.C., SHROOT, B. Influence of formulation, receptor fluid, and occlusion, on *in vitro* drug release from topical dosage forms, using an automated flow-through diffusion cell. **Pharm. Res.**, New York, v. 9, n. 1, p. 82-93, 1992.
- 97 - ROSE, J.P., JUSKO, W.J. Corticosteroid analysis in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 162, p. 273-80, 1979.
- 98 - ROSSI, A.F., DASH, A.K. Development and evaluation of a sustained release topical benzocaine formulations. **Pharm. Res.**, Suppl., New York, v. 10, n. 10, PDD 7385, 1993.
- 99 - ROUGIER, A., DUPUIS, D., LOTTE, C., ROUGUET, R., SCHAEFER, H. *In vivo* correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 81, n. 3, p. 275-8, 1983.
- 100 - ROY, S.D., ROOS, E., SHARMA, K. Transdermal delivery of buprenorphine through cadaver skin. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 83, n. 2, p. 126-30, 1994.
- 101 - SARPOTDAR, P.P., ZATZ, J.L. Evaluation of penetration enhancement of lidocaine by anionic surfactants through hairless mouse skin *in vitro*. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 75, n. 2, p. 176-81, 1986.

- 102 - SASAKI, H., KOJIMA, M., MORI, Y., NAKAMURA, J., SHIBASAKI, J. Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal penetration of 5-fluorouracil, triamcinolone acetonide, indomethacin, and flurbiprofen. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 80, n. 6, p. 533-8, 1991.
- 103 - SASAKI, H., KOJIMA, M., NAKAMURA, J., SHIBASAKI, J. Enhancing effect of combining two pyrrolidone vehicles on transdermal drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 42, p. 196-9, 1990.
- 104 - SATO, K., SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicoradil. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 80, n. 2, p. 104-7, 1991.
- 105 - SCHEUPLEIN, R.J., BLANK, I.H., BRAUNER, G.J., MacFARLANE, D.J. Percutaneous absorption of steroids. *J. Invest. Dermatol.*, New York, v. 52, n. 1, p. 63-70, 1969.
- 106 - SCHUMANN, R. *In vitro* absorption of butylated hydroxyanisole through human skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 42, n. 5, p. 335-40, 1991.
- 107 - SCOGGINS, R.B., KLIMAN, B. Percutaneous absorption of corticosteroids. *New Engl. J. Med.*, Boston, v. 273, n. 16, p. 831-40, 1965.
- 108 - SCOTT, R.C., RAMSEY, J.D. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* percutaneous absorption of a lipophilic molecule (Cypermethrin, a pyrethroid insecticide). *J. Invest. Dermatol.*, New York, v. 89, n. 2, p. 412-6, 1987.
- 109 - SCOTT, R.C., WALKER, M., DUGARD, P.H. *In vitro* percutaneous absorption experiments: a technique for the production of intact epidermal membranes from rat skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 37, n. 1, p. 35-41, 1986.

- 110 - SETHI, P.K., AGHA, B.J. *In vitro* human cadaver skin retention and penetration of a lipophilic compound. **Pharm. Res., Suppl.**, New York, v. 10, n. 10, PDD 7309, 1993.
- 111 - SHAH, J.C. Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 90, p. 161-9, 1993.
- 112 - SHAH, V.P., BEHL, C.R., FLYNN, G.L., HIGUCHI, W.I., SCHAEFER, H., Principles and criteria in the development and optimization of topical therapeutic products. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 82, p. 21-8, 1992.
- 113 - SHAH, V.P., ELKINS, J., SKELLY, J.P. Relationship between *in vivo* skin blanching and *in vitro* release rate for betamethasone valerate creams. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 81, n. 1, p. 104-6, 1992.
- 114 - SHAH, V.P., SKELLY, J.P. Regulatory considerations in transdermal drug delivery systems in the United States. In: CHIEN, Y.W. **Transdermal Controlled Systemic Medications**. New York: Marcel Dekker, 1987, p. 399-417.
- 115 - SHAH, V., ZATZ, J.L. Effect of formulation factors on penetration of hydrocortisone through mouse skin. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 67, n. 6, p. 789-92, 1978.
- 116 - SHAW, M.C., VANDERWIELEN, A.J. Liquid chromatographic assay for diflorasone diacetate in cream and ointment formulations. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 73, n. 11, p. 1606-8, 1984.
- 117 - SMID-KORBAR, J., KRISTL, J., SRCIC, S. Wirkstoff-Freisetzung aus Dermatica. **Pharmazie**, Berlin, v. 37, n. 5, p. 363-5, 1982.

- 118 - SMITH, E.W., HAIGH, J.M. *In vitro* systems for assessment of drug release from topical formulations and transmembrane permeation. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I. **Percutaneous Absorption (Mechanisms, Methodology, Drug Delivery)**, 2 ed., New York, Marcel Dekker, 1989, p. 465-508.
- 119 - STUPAR, M., VULETA, G., PRIMORAC, M. Comparative examination of the release of the salicylic acid from microemulsive gel and excipients lanacoli aquosum. **Pharmazie**, Berlin, v. 41, n. 7, p. 514, 1986.
- 120 - SURBER, C., WILHELM, K.P., MAIBACH, H.I. *In vitro* skin pharmacokinetics of acitretin: percutaneous absorption studies in intact and modified skin from three different species using different receptor solutions. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 43, p. 836-40, 1991.
- 121 - TANAKA, S., TAKASHIMA, Y., MURAYAMA, H., TSUCHIYA, S. Solubility and distribution of dexamethasone acetate in oil-in-water creams and its release from the creams. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokio, v. 33, n. 9, p. 3929-34, 1985.
- 122 - TAUBER, U., TODA, T. Biotransformation von Diflucortolon-valerianat in der Haut von Ratte, Meerschweinchen und Mensch. **Arzneim-Forsch. (Drug. Res.)**, Aulendorf, v. 26, n. 7b, p. 1484-7, 1976.
- 123 - TENJARLA, S.N., HOLBROOK, J.H. Irritation potential of various skin penetration enhancers. **Pharm. Res.**, Suppl., New York, v. 10, n. 10, PDD 7264, 1993.
- 124 - TOJO, K. Design and calibration of *in vitro* permeation apparatus. In: CHIEN, Y.W. **Transdermal Controlled Systemic Medications**. New York: Marcel Dekker, 1987, p. 127-58.

- 125 - TOKUNAGA, H., KIMURA, T., KAWAMURA, J. Determination of glucocorticoids by liquid chromatography. III. Application to ointments and a cream containing cortisone acetate, dexametasone acetate, fluorometholone, and betamethasone valerate. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokio, v. 32, n. 10, p. 4012-6, 1984.
- 126 - TOMIDA, H., SHINOHARA, M., KUWADA, N., KIRYU, S. *In vitro* release characteristics of diclofenac and hydrocortisone from Pluronic F-127 gels. **Acta Pharm. Suec.**, Stockhlom, v. 24, p. 263-72, 1987.
- 127 - TOOTHAKER, R.D., SUNDARESAN, G.M., HUNT, J.P., GOEHL, T.J., ROTENBERG, K.S., PRASAD, V.K., GRAIG, W.A., WELLING, P.G. Oral hydrocortisone pharmacokinetics: a comparison of fluorescence and ultraviolet high-pressure liquid chromatographic assays for hydrocortisone in plasma. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 71, n. 5, p. 573-6, 1992.
- 128 - TORUAN-PURBA, A.V., TABIBI, E., MENDES, R. Isotretinoin liposomes with soluble collagen as a penetration enhancer through shed snake skin. **Pharm. Res.**, Suppl., New York, v. 10, n. 10, PDD 7277, 1993.
- 129 - TURAKKA, L., KONTRA, K., KYLLÖNEN, A.M. Release of hydroxybenzoic acids from a triglyceride vehicle containing surfactantes. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v. 58, n. 5-6, p. 153-9, 1983.
- 130 - UJI, K., TAKAHASHI, K., HEMKER, W. The properties of lecithin and lecithin-liposome containing emulsions, emulsified with cross linked acrylic acid-alkil acrylate crosspolymer. In: INTERNATIONAL CONGRESS YOKOHAMA, 17, 1992. Yokohama, **Annals. Koyohama: International Federation. Societies Cosmetic Chemists**, 1992, v. 1, p. 69-86.

- 131 - WESTER, R.C., MAIBACH, H.I. *In vitro* testing of topical pharmaceutical formulations. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I. **Percutaneous absorption (Mechanisms, Methodology, Drug Delivery)**, 2 ed., New York, Marcel Dekker, 1989, p. 653-9.
- 132 - WESTER, R.C., MAIBACH, H.I. Relationship of topical dose and percutaneous absorption in Rhesus monkey and man. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 67, n. 4, p. 518-20, 1976.
- 133 - WILLIAMS, A.C., BARRY, B.W. Snake skin as a model for human skin in permeation studies; molecular evaluation by raman spectroscopy. **Pharm. Res., Suppl.**, New York, v. 10, n. 10, PDD 7259, 1993.
- 134 - YAMASHITA, F., BANDO, H., KOYAMA, Y., KITAGAWA, S., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M., *In Vivo and in vitro* analysis of skin penetration enhancement based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. **Pharm. Res.**, New York, v. 11, n. 2, p. 185-91, 1994.

De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviações dos títulos de periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 1990.

9 - RESUMO

Os corticosteróides são substância largamente empregadas em dermatologia devido ao seu potente efeito anti-inflamatório na pele. Entretanto, associado a este efeito benéfico tem-se o risco da ocorrência de efeitos colaterais, decorrentes principalmente da absorção sistêmica dos corticosteróides pela via cutânea.

A penetração transcutânea e retenção cutânea dos corticosteróides é influenciada pelo veículo no qual estes princípios ativos são incorporados. Assim sendo, os objetivos desta pesquisa foram investigar, *in vitro*, formulações que proporcionassem uma alta retenção cutânea dos corticosteróides na pele e também mínima penetração transcutânea.

O estudo foi realizado com géis de Poloxamer 407 contendo diferentes concentrações dos promotores de absorção cutânea, uréia ou lecitina. Os parâmetros liberação, penetração transcutânea e retenção cutânea dos acetatos de hidrocortisona e dexametasona, desonida e triamcinolona acetonida foram avaliados por metodologia *in vitro*, utilizando-se de célula de difusão e membranas.

A quantificação dos corticosteróides nas diferentes fases do experimento foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os resultados obtidos mostraram a influência do veículo nos parâmetros avaliados. As formulações obedeceram cinética de 1.ª ordem para a liberação e penetração transcutânea.

As preparações contendo lecitina promoveram uma maior retenção cutânea dos corticosteróides, sugerindo, assim, que géis de Poloxamer 407, associados com lecitina, formam veículos adequados para a incorporação de corticosteróides.

10 - SUMMARY

Corticoids are drugs often used in dermatology due to its anti-inflammatory effect in the skin. Meanwhile, together with this beneficial effect it can have side effects, due to the systemic absorption of the corticoids by cutaneous way.

Transcutaneous penetration and cutaneous retention of the corticoids is influenciaded by the vehicle in which this drugs are incorporated. In this way, the objective of this research was to investigate, *in vitro*, formulations that would provide both, high cutaneous retention of the corticoids in the skin and minimum transcutaneous penetration.

For this work was used Poloxamer 407 gels containing different concentrations of the absorptions enhancers, urea and lecithin. The release transcutaneous penetration and cutaneous retention of hydrocortisone and dexamethasone acetate, desonide and triamcinolone acetonide was evaluated by *in vitro* methodology using diffusion cells and membranes. The corticoids was analysed by HPLC.

The results obtained showed the influence of the vehicle in the evaluated parameters.

The corticoid release and transcutaneous penetration appeared to fit first order kinetic.

The formulations containing lecithin promoted higher cutaneous retention of the corticoids than the containing urea, suggesting, in this way, that Poloxamer 407 gels in the presence of lecithin are adequate preparations to the corticoids.