UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a
adição de vitamina D₃

Gabriela Maria D'Angelo Costa

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof.^a Assoc.^a Maria Valeria Robles Velasco

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a
adição de vitamina D₃

Gabriela Maria D'Angelo Costa

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof.^a Assoc.^a Maria Valeria Robles Velasco

São Paulo

2017

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

Costa, Gabriela Maria D'Angelo
C837d Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos
com a adição de vitamina D₃ / Gabriela Maria D'Angelo. --
São Paulo, 2017.
132p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia
Orientador: Velasco, Maria Valeria Robles

1. Vitamina : cosméticos : tecnologia I. T. II. Velasco,
Maria Valeria Robles, orientador.

668.55 CDD

Gabriela Maria D'Angelo Costa

Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a
adição de vitamina D₃

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof.^a Assoc.^a Maria Valeria Robles Velasco
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

DEDICATÓRIA

À **Deus**.

À **Nossa Senhora de Guadalupe**, minha protetora.

Aos meus pais, **Geraldo e Mara**.

Aos meus irmãos, **Vivian, Giovana e Daniel**.

Aos meus avós presentes, **Geraldo e Zilda**.

Aos meus avós ausentes, **Marco e Irene**.

A minha tia **Julia**.

Aos meus tios, **Cecília, Marcelo e Denise**.

Aos meus primos, **Mário, Lilian, Mirian, Isabela e Sandra**.

À minha orientadora,

Prof.^a Assoc.^a Maria Valeria Robles Velasco.

AGRADECIMENTOS

À minha tia e **Prof.^a Dr.^a Julia Maria Costa Cruz**, por ser meu grande exemplo de carreira científica.

À minha orientadora, **Prof.^a Assoc.^a Maria Valeria Robles Velasco**, por todos os valiosos ensinamentos.

À **Dr.^a Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto**, por acreditar em mim desde o começo.

Ao **Prof.^o Dr. André Rolim Baby**, pela parceria de laboratório e ensinamentos.

À **Prof.^a Dr.^a Vânia Rodrigues Leite e Silva**, pela fundamental parceria com o experimento de retenção e permeação cutânea.

À **Prof.^a Dr.^a Eunice Kazue Kano**, pela excelente ajuda sobre a validação analítica.

À **Prof.^a Dr.^a Vladi Olga Consiglieri**, pela parceria e colaboração de materiais.

As alunas de iniciação científica, **Victoria Hasan Piccirillo** e **Chin Yi**, pela ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos antigos e atuais alunos do laboratório de Cosmetologia, **Camila Areias, Michelli Dario, Daniela Peres, Maíra Ariede, Thalita Candido, Thayane Araújo, Thamires Freire, André Danelutti, Tércio Martins, Rafael Sauce, Paulo Gonçalves, Nadia Ruscinc, Mirela Garcia e Alessandra Goshiyama** pelos ensinamentos e amizade.

Aos alunos de outros laboratórios, **Rafael Paraíso, Alberto Vetore, Yasmin Rosa e Caroline Cianga**, pela ajuda e suporte.

Ao **Edgar** e a **Doralice**, pelo apoio e carinho.

A todos os funcionários da *Faculdade de Ciências Farmacêuticas*, em especial ao **David, Irineu, Sueli, Kelma, Alexandre, Jorge e Marinalva**.

A todos do Programa de Pós-Graduação de Fármaco e Medicamentos, pela valiosa oportunidade de desenvolvimento da minha carreira científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo importante auxílio financeiro.

A todos que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Para ser insubstituível, você precisa ser diferente.”
Coco Chanel.

RESUMO

COSTA, G. M. D. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a adição de vitamina D₃**. 2017.132f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A hipovitaminose de vitamina D é um problema global de saúde e a sua deficiência compromete funções importantes ao corpo humano. A suplementação oral, políticas de fortificação em alimentos e mudanças dos hábitos de vida são medidas efetivas para solucionar este problema. Porém, pessoas com doença de Crohn, celíaca, fibrose cística, *bypass* gástrico e que fazem uso de medicamentos sequestradores de ácido biliares possuem a absorção intestinal de vitamina D comprometida. A via transdérmica pode ser uma alternativa de administração de vitamina D₃, porém poucas referências bibliográficas abordam sobre o assunto. A proposta do presente estudo é o desenvolvimento de sistemas transdérmicos com a combinação de promotores de permeação químicos: lecitina de soja, palmitato de isopropila, etoxidiglicol (Transcutol[®] CG), propilenoglicol e etanol, acrescidos do ingrediente ativo vitamina D₃, a validação analítica para quantificação do ativo em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a avaliação da estabilidade, segurança, retenção e permeação cutânea. A validação do método analítico de quantificação da vitamina D₃ em CLAE foi considerada específica, linear, precisa e exata. O limite de detecção foi 20 ng/mL e de quantificação 40 ng/mL. Os testes de estabilidade foram realizados (preliminar, acelerado e normal) e a melhor condição de armazenamento foi a geladeira (5,0 ± 2,0 °C) durante 90 dias. A condição de radiação luminosa foi a menos adequada, o que indica que o armazenamento deve ser realizado em frascos protegidos da luz (âmbar). No teste de segurança de irritação (HET-CAM) as formulações testadas foram consideradas não irritantes. No teste de retenção e permeação cutânea a solubilidade da vitamina D₃ foi avaliada para garantir a *sink condition* do líquido receptor escolhido: *Phosphate Buffer Saline* (PBS) com etanol a 50% e a integridade da pele foi garantida com o teste de perda de água transepidérmica (TEWL). A formulação desenvolvida com a presença de todos os promotores de permeação avaliados (F1) e o controle, apenas com a presença do etanol e o propilenoglicol, foram avaliados. A F1 permaneceu na superfície da pele, por possuir maior afinidade com a fase oleosa da formulação e houve tendência de hidratação desta formulação. O controle demonstrou uma retenção cutânea em 4 h no estrato córneo e em 24 h na epiderme e derme. Concluiu-se que a formulação desenvolvida é estável, segura e a vitamina D₃ ficou retida na pele, o que indica o uso tópico da mesma. A alta lipofilicidade foi a justificativa dos resultados apresentados e futuros estudos podem ser realizados com derivados menos lipofílicos da vitamina D para avaliar a via transdérmica.

Palavras chaves: vitamina D₃, retenção cutânea, permeação cutânea, sistemas transdérmicos, promotores de permeação químicos.

ABSTRACT

COSTA, G. M. D. **Development and evaluation of transdermal delivery system of vitamin D₃**. 2017. 132f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Hypovitaminosis D is a global health issue and vitamin D deficiency compromises important functions to the human body. Oral supplementation, fortification food and changes in live style are effective measures to solve this problem. However, people with Crohn's disease, celiac disease, cystic fibrosis, gastric bypass and who use bile acid-binding medications have compromised intestinal vitamin D absorption. The transdermal route may be an alternative for vitamin D₃ administration, but few references refer to the subject. The purpose of the present study is the development of transdermal systems with the combination of penetrations enhancers (soybean lecithin, isopropyl palmitate, ethoxydiglycol (Transcutol® CG), propylene glycol and ethanol) with vitamin D₃, the analytical validation for quantification of the active in High Performance Liquid Chromatography (HPLC), stability assessment, safety, skin retention and permeation. The validation of the analytical method for quantification of vitamin D₃ in HPLC was considered specific, linear, precise and accurate. The limit of detection was 20 ng/mL and 40 ng/mL. Stability assessment was performed and the appropriate storage condition was the refrigerator (5.0 ± 2.0 ° C) for 90 days. The indirect solar radiation condition was not adequate, which indicates that the storage should be performed in light-protected bottles (amber). In the irritation safety test (HET-CAM) the formulations tested were considered non-irritant. In the skin permeation and retention test the solubility of vitamin D₃ was evaluated to guarantee the sink condition of the receptor fluid: *Phosphate Buffer Saline* (PBS) with 50% ethanol and skin integrity was guaranteed with Transepidermal Water Loss (TEWL). The developed formulation with the presence of all penetrations enhancers evaluated (F1) and the control formulation with the presence of ethanol and propylene glycol were assessed. F1 remained on the surface of the skin, because it had greater affinity with the oily phase of the formulation and there was tendency of hydration to this formulation. The control formulation demonstrated skin retention in 4 hours in the stratum corneum and in 24 hours in the epidermis and dermis. The study concluded that the formulation developed is stable, safe and vitamin D₃ was retained in the skin, which indicates the topical use. High lipophilicity was the explanation of the presented results and future studies can be carried out with less lipophilic derivatives of vitamin D to evaluate the transdermal route.

Keywords: vitamin D₃, skin retention, skin permeation, transdermal systems, penetrations enhancers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da pele composta por epiderme, derme e hipoderme	22
Figura 2- Camadas da epiderme e seus componentes	23
Figura 3- Representação da bicamada lipídica e dos fatores de hidratação naturais (FHN) nos corneócitos	25
Figura 4- Diferentes tipos de caminhos que uma substância pode percorrer durante a permeação cutânea.....	26
Figura 5- Fórmula estrutural da lecitina	30
Figura 6- Fórmula estrutural do palmitato de isopropila	30
Figura 7- Fórmula estrutural do etoxidiglicol (Transcutol [®] CG) e do propilenoglicol..	31
Figura 8- Fórmula estrutural do etanol	31
Figura 9- Fórmula estrutural da vitamina D e suas ramificações para formar a vitamina D ₂ e D ₃	32
Figura 10- Eventos fotoquímicos da vitamina D	33
Figura 11- Reação de ativação da vitamina D	34
Figura 12- Esquema da chocadeira automática utilizada no HET-CAM.....	48
Figura 13- Visualização do teste HET-CAM durante o experimento	49
Figura 14- Célula de difusão vertical utilizada no experimento.....	51
Figura 15- Sistema adaptado de permeação cutânea.....	55
Figura 16- Cromatograma do solvente etanol P.A (branco) realizado por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)	59

Figura 17- Cromatograma do solvente etanol P.A. acrescido do padrão secundário da vitamina D₃ (indicado pela seta) realizado por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)59

Figura 18- Cromatograma da Formulação 1 (F1), com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol sem a vitamina D₃ (branco) por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min).....60

Figura 19- Cromatograma da Formulação 1 (F1), com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol com a vitamina D₃ (indicado pela seta) por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)60

Figura 20- Cromatograma da Formulação 2 (F2), com 20% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol sem a vitamina D₃ (branco) por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)61

Figura 21- Cromatograma da Formulação 2 (F2), com 20% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol com a vitamina D₃ (indicado pela seta) por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)61

Figura 22- Linearidade do método para quantificação de vitamina D₃ extraída da formulação por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)62

Figura 23- Formulação (F1) com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol, após centrifugação (A) e estresse térmico (B) (n=3)65

Figura 24- Formulação (F2) com 20% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol, após centrifugação (A) e estresse térmico (B) (n=3)65

Figura 25- Formulação (F3) com 40% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol, após centrifugação (A) e estresse térmico (B) (n=3)	66
Figura 26- Formulação (F4) com 40% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol, após centrifugação (A) e estresse térmico (B) (n=3)	66
Figura 27- Aspecto e cor das formulações testadas no tempo inicial (t ₀)	69
Figura 28- Comparação das Formulações 1 e 2 frente ao valor de pH, avaliado durante o Teste de Estabilidade Acelerada (n=3)	70
Figura 29- Comparação das Formulações 1 e 2 frente a concentração da vitamina D ₃ , avaliado durante o Teste de Estabilidade Acelerada (n=3)	71
Figura 30- Formação da pré-vitamina D ₃ e vitamina D ₃ através do precursor 7-deidrocolesterol	71
Figura 31- Comparação das condições de armazenamento da Formulação 1, frente a concentração da vitamina D ₃ , durante o Teste de Estabilidade Normal (t ₀ = 48h do preparo) (n=3)	76
Figura 32- Comparação das condições de armazenamento da Formulação 1, frente ao valor de pH, durante o Teste de Estabilidade Normal (t ₀ = 48h do preparo) (n=3)	77
Figura 33– Controle positivo no teste HET-CAM com NaOH 1M: a) tempo zero: antes de colocar a amostra, b) 0,5 min, c) 2 min, d) 5 min.....	79
Figura 34– Controle positivo no teste HET-CAM com o LSS: a) tempo zero: antes de colocar a amostra, b) 0,5 min, c) 2 min, d) 5 min	79
Figura 35– Controle negativo no teste HET-CAM com o NaCl: a) tempo zero: antes de colocar a amostra, b) 0,5 min, c) 2 min, d) 5 min	80
Figura 36– Formulação 1 (F1), com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol no teste HET-CAM: a) tempo zero: antes de colocar a amostra, b) 0,5 min, c) 2 min, d) 5 min.....	81

Figura 37– Formulação 2 (F2), com 20% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol no teste HET-CAM: a) tempo zero: antes de colocar a amostra, b) 0,5 min, c) 2 min, d) 5 min.....	81
Figura 38– Solubilidade da vitamina D ₃ nos líquidos receptores, com a variação da concentração de etanol (40% e 50%) ao longo de 24 horas com exposição à luz (n=3).....	82
Figura 39– Solubilidade da vitamina D ₃ nos líquidos receptores, com a variação da concentração de etanol (40% e 50%) ao longo de 24 horas ao abrigo de luz (n=3) .	83
Figura 40– Valor inicial (0h) e final (24h) de perda de água transepidérmica (TEWL) da pele proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea (n=15)....	84
Figura 41– Cromatograma do líquido receptor PBS com 50% de etanol, realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea.....	85
Figura 42– Cromatograma do líquido receptor PBS com 50% de etanol e com adição da vitamina D ₃ (indicada na seta), realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea.....	85
Figura 43– Cromatograma do etanol na presença de cotonetes, realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea	86
Figura 44– Cromatograma do etanol na presença de cotonetes e adição de vitamina D ₃ (indicada na seta), realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea	86

Figura 45– Cromatograma do etanol na presença de fitas adesivas extraídas da pele, realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea.....87

Figura 46– Cromatograma do etanol na presença de fitas adesivas extraídas da pele e adição da vitamina D₃ (indicada pela seta), realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea.....87

Figura 47– Cromatograma do etanol na presença da epiderme e derme, realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea.....88

Figura 48– Cromatograma do etanol na presença da epiderme, derme e adição da vitamina D₃ (indicada na seta), realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea.....88

Figura 49– Valores de perda de água transepidérmica (TEWL) durante o experimento para a Formulação (F1) com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol, nos tempos iniciais (t₀) e finais (1, 4 e 24h) (n=9)92

Figura 50– Valores de perda de água transepidérmica (TEWL) durante o experimento para o controle sem os promotores de permeação primários, nos tempos iniciais (t₀) e finais (1, 4 e 24h) (n=9)92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Equipamentos, dispositivos e acessórios	37
Quadro 2- Matérias-primas.....	39
Quadro 3- Padrão de referência secundário	39
Quadro 4- Solventes.....	40
Quadro 5- Ovos fecundados utilizados no experimento HET-CAM	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Delineamento experimental do tipo fatorial ($DoE\ 2^2$) aplicado no desenvolvimento das formulações	41
Tabela 2- Fórmula qualitativa e quantitativa da formulação com vitamina D_3	41
Tabela 3– Pontuação atribuída ao efeito observado no teste HET-CAM.....	49
Tabela 4 - Classificação do grau de irritação ocular conforme a pontuação adquirida no teste HET-CAM	50
Tabela 5– Formulações avaliadas no teste de retenção e permeação cutânea com suas proporções.....	51
Tabela 6- Precisão e exatidão intra-corrida (mesmo dia de análise) e inter-corrida (dias diferentes de análise), com as concentrações médias de vitamina D_3 calculadas pela equação de reta obtida por meio da curva de calibração realizada no dia da análise (n=6).....	63
Tabela 7- Precisão e exatidão de concentrações baixas de vitamina D_3 para calcular o limite de quantificação	64
Tabela 8- Avaliação visual das formulações submetidas ao Teste de Estabilidade Preliminar	65
Tabela 9- Teste de Estabilidade Acelerada para a Formulação 1 (F1), com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol	67
Tabela 10- Teste de Estabilidade Acelerada para a Formulação 2 (F2), com 20% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol	68
Tabela 11- Características organolépticas da Formulação 1 (F1) com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol, durante o Teste de Estabilidade Normal.....	73
Tabela 12- Valor de pH e concentração da vitamina D_3 durante o Teste de Estabilidade Normal para a Formulação 1 (F1), com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol.....	74

Tabela 13- Recuperação do padrão de vitamina D₃ adicionado em etanol com cotonetes, fitas adesivas e epiderme e derme, provenientes do ensaio branco de retenção e permeação cutânea (n=3)89

Tabela 14- Retenção e permeação cutânea da vitamina D₃, nos tempos de 1, 4 e 24 horas para o controle e a Formulação 1 (F1) (n=3).....90

Tabela 15- Recuperação da vitamina D₃, nos tempos de 1, 4 e 24 horas para a Formulação 1 (F1), provenientes do ensaio de retenção e permeação cutânea (n=3)90

Tabela 16- Recuperação da vitamina D₃, nos tempos de 1, 4 e 24 horas para o controle, provenientes do ensaio de retenção e permeação cutânea (n=3).....91

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Equação utilizada para calcular a precisão .	44
Equação 2 - Equação utilizada para calcular a exatidão .	45
Equação 3 - Equação utilizada para calcular a recuperação do padrão .	53
Equação 4 - Equação de reta obtida por meio da curva média de três curvas realizadas na faixa de 0,1 a 2 µg/mL.....	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. ESTRUTURA DA PELE	22
2.2. PERMEAÇÃO CUTÂNEA	25
2.3. SISTEMAS TRANSDÉRMICOS	27
2.3.1. PROMOTORES DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA	28
2.4. VITAMINA D	31
3. OBJETIVOS	36
3.1. OBJETIVO GERAL	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. MATERIAIS	37
4.2. MÉTODOS	40
4.2.1. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA TRANSDÉRMICO	40
4.2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO FATORIAL (DOE 2 ²)	40
4.2.3. FORMULAÇÃO	41
4.2.3.1. CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DA VITAMINA D ₃	42
4.2.4. QUANTIFICAÇÃO DA VITAMINA D ₃ EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	43
4.2.4.1. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO EM CLAE	43
4.2.4.1.1. ESPECIFICIDADE	43
4.2.4.1.2. LINEARIDADE	44
4.2.4.1.3. PRECISÃO	44
4.2.4.1.4. EXATIDÃO	45
4.2.4.1.5. LIMITE DE DETECÇÃO	45
4.2.4.1.6. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	46
4.2.5. TESTES DE ESTABILIDADE	46
4.2.5.1. TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR	46
4.2.5.2. TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA	46
4.2.5.3. TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL	47
4.2.6. TESTE DE SEGURANÇA	48

4.2.6.1.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO (HET-CAM)	48
4.2.7.	TESTE DE EFICÁCIA.....	50
4.2.7.1.	RETENÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA	50
4.2.7.1.1.	SOLUBILIDADE DA VITAMINA D ₃	52
4.2.7.1.2.	VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARCIAL.....	52
4.2.7.1.2.1.	ESPECIFICIDADE	53
4.2.7.1.2.2.	RECUPERAÇÃO DO PADRÃO	53
4.2.7.1.3.	PELE	53
4.2.7.1.4.	PROCEDIMENTO.....	54
4.2.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1.	DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA TRANSDÉRMICO	57
5.2.	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE	58
5.2.1.	ESPECIFICIDADE.....	58
5.2.2.	LINEARIDADE.....	62
5.2.3.	PRECISÃO E EXATIDÃO.....	63
5.2.4.	LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO	64
5.3.	TESTE DE ESTABILIDADE	64
5.3.1.	TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR.....	64
5.3.2.	TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	67
5.3.3.	TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL	73
5.4.	TESTE DE SEGURANÇA.....	78
5.4.1.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO (HET-CAM).....	78
5.5.	TESTE DE EFICÁCIA	82
5.5.1.	SOLUBILIDADE DA VITAMINA D ₃	82
5.5.2.	VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARCIAL	84
5.5.2.1.	ESPECIFICIDADE	84
5.5.2.2.	RECUPERAÇÃO DO PADRÃO	89
5.5.3.	RETENÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA	90
6.	CONCLUSÕES	97
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹	99
ANEXOS		110
ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIFESP		110

ANEXO B- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA USP.....	114
ANEXO C- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIFESP– EMENDA.....	117
ANEXO D- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA USP - EMENDA	121
ANEXO E- CURRÍCULO LATTES	125
ANEXO F- FICHA DO ALUNO	130

1. INTRODUÇÃO

Desde 1919, o efeito da vitamina D no tratamento de raquitismo era conhecido, pelo estudo de Edward Mellanby com óleo de fígado de peixe. Porém, apenas no início da década de 1930, surgiu o programa do governo dos Estados Unidos da América de fortificação de leites com vitamina D, para evitar o raquitismo em crianças, muito comum naquela época (BISHAI; NALUBOLA, 2002; HOLICK; CHEN, 2008).

A partir desse período, os estudos desta vitamina se intensificaram e novas funções, essenciais ao corpo humano, foram descobertas. Existe uma crescente preocupação da deficiência de vitamina D na população mundial, apesar da política de fortificação em alimentos, a suplementação oral, a síntese ocorrer por meio da incidência da radiação ultravioleta B (UVB) na pele e algumas fontes alimentares conterem esta vitamina. A justificativa pode ser pelo uso excessivo de fotoprotetores; a não exposição solar pelo estilo de vida ou religião; lugares com baixa latitude; a presença de muita melanina na pele, entre outros (GILABERTE et al., 2011; MOSTAFA; HEGAZY, 2014; PARISH, 2002).

Uma alternativa que vem sendo explorada para diminuir esta deficiência é a pesquisa da via transdérmica para absorção da vitamina D, uma vez que a via oral está bem estabelecida. A vantagem desta via em relação a oral seria, para pessoas com problemas de absorção de lipídeos devido a doença de Crohn, celíaca, fibrose cística, possuir *bypass* gástrico e uso de medicamentos sequestradores de ácido biliares. Porém, poucos estudos científicos foram realizados até o momento e por isso o interesse em avaliar a efetividade desta via pela adição do ingrediente ativo em formulações com promotores de permeação químicos (ALSAQR; RASOULLY; MUSTEATA, 2015; SADAT-ALI et al., 2014; TSIARAS; WEINSTOC, 2011)

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ESTRUTURA DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, com aproximadamente 2 metros quadrados de comprimento e possui estrutura bem complexa, composta pelas camadas: hipoderme, derme e epiderme (**Figura 1**) (BAREL; PAYE; MAIBACH, 2009).

Figura 1- Estrutura da pele composta por epiderme, derme e hipoderme

Fonte: adaptado de Baumann, Saghari e Weisberg (2009).

A hipoderme ou tecido subcutâneo é um dos tecidos mais extensos do corpo humano, é constituída por tecido conjuntivo frouxo, contém adipócitos e vasos sanguíneos. Apresenta proteção ao calor e frio excessivo (termorregulação), preenche os espaços entre os órgãos; propicia o formato ao corpo; apresenta função

secretora, por liberar citocinas; participa da regulação dos níveis de andrógeno e estrógeno e armazena vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) (BAUMANN; SAGHAR; WEISBERG, 2009).

A camada intermediária da pele é a derme, que é constituída por tecido conjuntivo frouxo (camada papilar) e denso (camada reticular). A derme garante a elasticidade da pele, possui nervos, vasos sanguíneos, folículo piloso, fibroblasto que produz colágeno, elastina, proteínas, enzimas, glândulas sebáceas e sudoríparas. Possui, também, células do sistema imune, tais como: mastócitos, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos (BAUMANN; SAGHARI; WEISBERG, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A epiderme é a camada mais superficial da pele, sendo a barreira do organismo com o meio ambiente. É constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e subdividida em camadas (basal, espinhosa, granulosa, lúcida e estrato córneo) onde ocorre o processo de queratização. A principal célula é o queratinócito, mas possui outras como: melanócitos (produtora de melanina), células de Langerhans (responsável pela proteção imunológica) e as de Merkel (mecanorreceptoras – sensorial tátil) (**Figura 2**) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Figura 2- Camadas da epiderme e seus componentes

Fonte: adaptado de Fore-Pfliger (2004).

Na camada basal se encontram as células-tronco ou germinativa, que são responsáveis pela renovação celular da pele por volta de 15 a 30 dias, dependendo da idade e do local. Possui atividade mitótica intensa. Os filamentos de queratina são encontrados em pouca quantidade na camada basal e em maior número nas camadas seguintes. Eles garantem coesão, resistência ao atrito e são expansões do citoplasma dos queratinócitos, que são unidos entre si pelos desmossomos. A camada espinhosa é composta por células cuboides ligeiramente achatadas, com núcleo central e possuem projeções citoplasmáticas dos queratinócitos (tornofilamentos), que deixam essas células com o aspecto espinhoso. É nesta camada que aparecem os primeiros grânulos no citoplasma dos queratinócitos, ou seja, o primeiro sinal de queratinização (BAUMANN; SAGHARI; WEISBERG, 2009; DRAELOS, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; McGRATH; UITTO, 2007).

Na camada granulosa, é maior a presença dos grânulos lamelares e de querato-hialina. Os grânulos lamelares possuem lipídeos envoltos por uma membrana que se fundem com a membrana plasmática liberando seu conteúdo lipídico (ceramidas, colesterol, ácidos graxos e ácidos graxos livres) para fora da célula, durante o processo de queratinização. Com isso ocorre a impermeabilização da pele e a desidratação é evitada (bicamada lipídica). Os grânulos de querato-hialina contêm pró-filagrina que é o precursor da filagrina, uma proteína que faz ligação-cruzada com filamentos de queratina, dando força e estrutura a pele. É uma proteína responsável pelo Fator de Hidratação Natural (FHN), que ao ser desfosforilada e digerida origina todos os componentes do FHN, tais como: aminoácidos livres e derivados, ácido urucânico, lactatos, uréia e eletrólitos (**Figura 3**). Na camada lúcida, os núcleos e organelas são digeridos por enzimas dos lisossomos e desaparecem, ficando visíveis somente os desmossomos. Por fim, no estrato córneo, as células “maduras” (corneócitos) estão repletas de queratina, produtos de degradação e com a presença de envelopes proteicos, composto por: involucrina, loricrina, filagrina, entre outras (BAUMANN; SAGHARI; WEISBERG, 2009; DRAELOS, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; McGRATH; UITTO, 2007).

Figura 3- Representação da bicamada lipídica e dos fatores de hidratação naturais (FHN) nos corneócitos

Fonte: adaptado de Baumann, Saghari e Weisberg (2009).

2.2. PERMEAÇÃO CUTÂNEA

A função barreira que é realizada pelo estrato córneo, controla o que irá permear ou não para dentro do organismo. O estrato córneo geralmente barra substâncias hidrofílicas, de alta massa molar, micro-organismos, entre outros, pela sua propriedade lipofílica (bicamada lipídica) que funciona como se fosse um “cimento” entre as células, impedindo que ocorra a perda de água transepidérmica (TEWL – *Transepidermal Water Loss*) (**Figura 3**). Além deste fator, os queratinócitos possuem filagrina e os FHN, são rodeados por envelopes proteicos e caminhos tortuosos de difusão, que auxiliam na prevenção do TEWL e dificulta a permeação de substâncias (PRAUSNITZ et al., 2012).

Existem três caminhos que uma substância aplicada na pele pode percorrer: intercelular, intracelular e transfolicular. Substâncias mais lipofílicas realizam geralmente o caminho intercelular, que passam pela bicamada lipídica, sendo este caminho o mais tortuoso e mais comum. O caminho intracelular é realizado por substâncias mais hidrofílicas com tamanho reduzido que passam pelos poros

existentes nos corneócitos. Por fim, o caminho transfolicular é realizado através dos folículos pilosos, em que a substância passa direto para a derme, sem passar pela epiderme, como acontece com as outras vias citadas anteriormente (**Figura 4**) (CHILCOTT; PRICE, 2008; RANADE, 1991).

Figura 4- Diferentes tipos de caminhos que uma substância pode percorrer durante a permeação cutânea

Fonte: adaptado de Chilcott e Price (2008).

Segundo Brisson (1974), a permeação cutânea pode variar de acordo com os fatores listados a seguir:

1. Hidratação da pele: quando a pele está desidratada, seu estrato córneo sofre danos, o que facilita a permeação cutânea de substâncias. O oposto também é válido, pois uma pele hidratada facilita a permeação cutânea por aumentar os caminhos de difusão de moléculas polares e não polares.
2. Solubilidade: substâncias lipofílicas ($\log P > 1,5$) tendem a serem mais facilmente permeadas do que as hidrofílicas, devido a uma grande presença de lipídeos no estrato córneo.
3. Massa Molar da molécula: substâncias pequenas, com menos de 500 Da, tem maior facilidade de permeação.
4. Concentração aplicada: existe um limite de concentração que é proporcional a permeação. O ideal é menos que 10 mg por dia.

5. Veículo: se for de natureza oclusiva irá aumentar a hidratação e a temperatura do local, aumentando a permeação.
6. Viscosidade: é inversamente proporcional a permeação.
7. Tensoativos: podem levar a ruptura do estrato córneo com uso prolongado.
8. Substâncias queratolíticas: aumentam a permeação, por danificar o estrato córneo. O exemplo mais comum é o ácido salicílico.
9. Solventes polares e lipídeos: alteram o estrato córneo quimicamente. O dimetilsulfóxido (DMSO), por exemplo, é um solvente polar que possui solubilidade em água e óleo e promove uma intensa hidratação na pele, com consequente aumento da permeação.
10. Grupos polares: a presença de cargas elétricas na molécula prejudica a passagem pelo estrato córneo, por interagir com as vias de permeação.
11. Impedância elétrica: uma redução da impedância, que existe no estrato córneo, ocasiona ao aumento da permeação.
12. Hiperemia: aumento do fluxo sanguíneo local e da difusão, o que promove um transporte rápido para a derme.
13. Temperatura: aumenta o movimento molecular com a elevação da temperatura, levando a maior permeação.
14. Dermatoses: geralmente o estrato córneo fica prejudicado, o que facilita a permeação dos medicamentos na fase inicial.
15. Local: áreas da pele têm diferentes perfis de permeação.

2.3. SISTEMAS TRANSDÉRMICOS

A via de administração transdérmica é uma alternativa a via oral (clássica) e a intravenosa. É uma boa opção para ingredientes ativos com degradação enzimática no sistema gastrointestinal, com faixa terapêutica estreita (liberação sustentada); evita o metabolismo de primeira passagem no fígado; possibilita a utilização de componentes ativos com meia vida reduzida e baixa biodisponibilidade oral; grande superfície de contato para a aplicação, boa aceitação e aderência dos pacientes (não invasivo e fácil administração) para pessoas com medo de agulha; com problemas de absorção gastrointestinal, de deglutição, que estão inconscientes ou com ânsia; e em casos de intoxicação, ao retirar o ingrediente ativo da pele, a

permeação é interrompida (FINNIN; MORGAN, 1999; KARANDE; MITRAGOTRI, 2009; NAIK; KALIA; GUY, 2000; PRAUSNITZ; LANGER, 2008; RANADE, 1991).

Segundo Prausnitz e Langer (2008), os sistemas de liberação transdérmicos podem ser divididos em três gerações:

- Primeira geração: são os adesivos transdérmicos, com a presença de pouco ou nenhum promotor de permeação e, geralmente, são moléculas que atendem todos os requisitos necessários para permear a barreira cutânea (<500 Da, $\log P > 1,5$, $PF < 200$ °C, dose < 10 mg). Podem ter outras formas de apresentação, como: *spray*, gel ou emulsão.
- Segunda geração: mesmas características que a geração anterior, porém com a presença mais intensa dos promotores de permeação, tais como: promotores químicos e físicos (iontoforese e ultrassom não cavitacional).
- Terceira geração: foco em permear macromoléculas (proteínas, DNA, vírus/vacinas) com novos promotores de permeação químicos e físicos (microagulamento, ultrassom cavitacional, eletroporação, ablação térmica, microdermoabrasão).

2.3.1. PROMOTORES DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Existem três tipos de promotores de permeação cutânea que são utilizados: físicos, bioquímicos e químicos.

Os promotores físicos são: *tape stripping* – retirada do estrato córneo; iontoforese (eletroforese – fluxo de íons que permite a permeação); eletroporação (micro choques que reorganizam o estrato córneo formando poros); ultrassom térmico (o calor e as ondas facilitam a permeação), ultrassom cavitacional (bolhas movimentam o estrato córneo causando pequenos defeitos na estrutura); ablação térmica (feixes de calor que abrem pequenos poros); microagulhamento (pequenos poros criados por ação mecânica) (PRAUSNITZ et al., 2012).

Os promotores bioquímicos são peptídeos que interagem com os lipídeos e podem penetrar ou romper o estrato córneo, como a poliarginina e a magainina, respectivamente. Existem também os inibidores metabólicos que retardam a recuperação da pele por alterarem a proporção molar crítica dos lipídeos principais do estrato córneo ou induzirem descontinuidades na bicamada lipídica, tais como:

brefeldina A, monensina, cloroquina, níveis elevados de $\text{Ca}^{2+} / \text{K}^{+}$ e tampões de pH neutros (PRAUSNITZ et al., 2012).

Os mais utilizados e comuns são os promotores químicos, pois possuem baixo custo e podem ser facilmente incorporados na formulação. O mecanismo de ação se baseia na interação com a matriz lipídica, na desestruturação da barreira lipídica e no aumento da permeabilidade. O exemplo mais comum é a água, que ao hidratar o local de aplicação, ocorre um aumento da permeação cutânea. Solventes orgânicos como o etanol, metanol, acetona e clorofórmio, extraem os lipídios do estrato córneo e desfaz a organização da bicamada lipídica, facilitando a permeação (PRAUSNITZ et al., 2012; PRAUSNITZ; LANGER, 2008).

As características necessárias ao promotor de permeação químico para ser adequado são: ser farmacologicamente inativo; não ser irritante, alergênico ou não tóxico; possuir início de ação rápido e perdurar por toda a ação do ingrediente ativo; remover o estrato córneo de uma maneira temporária, sem prejudicar a sua recuperação; permitir o processo de permeação em uma única direção e sem ocorrer fluxo de material endógeno (FINNIN; MORGAN, 1999).

Os promotores de permeação químicos, que podem ser utilizados são: lecitina de soja, palmitato de isopropila, etoxidiglicol (Transcutol[®]CG), propilenoglicol e etanol.

A lecitina ou fosfatidilcolina é um fosfolípido extraído da soja ou da gema do ovo que possui propriedade tensoativa por ser anfifílica (**Figura 5**). Sua função primária é como emulsificante de emulsões e é muito usada na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Pode formar filmes moleculares, vesículas, cristais líquidos, emulsões e organogéis. Este último é a forma mais utilizada para promover a permeação por ser: biocompatível, biodegradável, característica anfifílica, solubilizante da maioria dos componentes ativos, possui estrutura termodinamicamente estável e ocasiona baixa irritabilidade na pele. Quando associado com um óleo (palmitato de isopropila), potencializa o poder de permeação, por desestruturar a barreira da pele devido à interação com os lipídeos do estrato córneo e aumenta a hidratação local (BENTLEY et al., 1997; DREHER et al., 1996; MAHJOUR et al., 1990; VINTILOIU; LEROUX, 2008; WILLIMANN et al., 1992)

Figura 5-Fórmula estrutural da lecitina

Fonte: Rauta et al. (2012).

A formação do organogel de lecitina é realizada com a adição de solvente apolar (éteres, ésteres, amina ou ácidos graxos) e um polar (água), podendo ser acrescentadas outras substâncias, como tensoativos secundários ou polímeros. Uma estrutura micelar tridimensional cilíndrica é formada pela mistura de todos os componentes, o que confere ao organogel aspecto viscoso (KUMAR; KATARE, 2005).

Existem outros dois tipos de géis que podem ser formados, os hidrogéis e os bigéis. Os primeiros são formados por um polímero disperso em uma fase aquosa e os bigéis, pela união de um organogel e um hidrogel. O bigel é uma nova alternativa para as formulações transdérmicas que vem sendo utilizado, por melhorar a liberação do componente ativo e a estabilidade da formulação. Esta nova forma une as qualidades do sistema hidrogel (não oleoso, lavável com água e efeito refrescante) com as qualidades do organogel (promotor de permeação) (ALMEIDA et al., 2008; IBRAHIM; HAFEL; MAHDY, 2013; SAGIRI et al., 2015; SINGH et al., 2014).

O palmitato de isopropila é um éster de ácido graxo não irritante, que é muito utilizado como emoliente em formulações farmacêuticas e cosméticas. Além disso, é um promotor de permeação que afeta a organização dos lipídeos da pele e é muito utilizado em associação com a lecitina de soja (organogel) e pode ser utilizado em associação com etanol (**Figura 6**) (GUO et al., 2006; KOGAN; GARTI, 2006).

Figura 6-Fórmula estrutural do palmitato de isopropila

Fonte: Chemical Book (2016).

O etoxidiglicol (Transcutol[®]CG) é um éter monoetílico de dietilenoglicol que vem sendo utilizado como um potencializador da permeação cutânea. Não apresenta toxicidade, é biocompatível com a pele, miscível em solventes polares e apolares e um potente solubilizante. Possui propriedades semelhantes ao propilenoglicol, que é da família dos glicóis, que é muito utilizado em formulações transdérmicas como co-solvente e para aumentar a permeação cutânea. Ao combinar estas duas substâncias em um gel, é aumentado o efeito da permeação (**Figura 7**) (GODWIN; KIM; FELTON, 2002; LANE, 2013; MURAA et al., 2000).

Figura 7- Fórmula estrutural do etoxidiglicol (Transcutol[®]CG) e do propilenoglicol

Fonte: adaptado de Lane (2013).

O etanol é o mais comum do grupo dos alcoóis a ser usado em formulações dérmicas e transdérmicas. Possui características de co-solvente e também, de promover a permeação cutânea por interagir com os lipídeos e queratina do estrato córneo. Porém, só exerce sua função até ser evaporado (**Figura 8**) (LANE, 2013).

Figura 8- Fórmula estrutural do etanol

Fonte: adaptado de Lane (2013).

2.4. VITAMINA D

O componente ativo de escolha neste estudo foi a vitamina D, pois atende aos requisitos de permeação cutânea, tais como: lipofílico ($\log P$ 10,24), massa molar < 500 Da (384,6 Da), ponto de fusão < 200 °C (83 °C), dose menor que 10 mg (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR, 2006).

Desde o século passado a deficiência de vitamina D é considerada um problema de saúde pública mundial (“epidemia de hipovitaminose”). As causas

podem ser pelo estilo de vida: aumento do uso de fotoprotetores, trabalhar em lugares fechados, com vidros, uso de roupas que cobrem todo o corpo (muçulmanas), que causam um bloqueio da radiação UV prejudicando a síntese da vitamina D₃ na pele. Existem outras fontes de obtenção naturais, como em alguns alimentos. A vitamina D pode ser de dois tipos: a vitamina D₂ (ergocalciferol), proveniente de alguns fungos e a vitamina D₃ (colecalfiferol) oriunda da pele e alguns alimentos (óleo de fígado, salmão, cavala, sardinha, atum e ovos) (**Figura 9**) (GILABERTE et al.,2011; PARISH, 2002; WECK; BUNDGAARD, 1983).

Figura 9- Fórmula estrutural da vitamina D e suas ramificações para formar a vitamina D₂ e D₃

Fonte: Weck e Bundgaard (1983).

Na pele, a síntese da vitamina D₃ ocorre por meio da luz solar. A radiação ultravioleta (UV), mais especificamente a UVB (280-320 nm) realiza uma fotólise no 7-deidrocolesterol (7-DHC) contido na epiderme (plasma, membrana de células da pele), dando origem a uma nova molécula denominada de pré-vitamina D₃ que é termoinstável e se isomeriza na molécula ativa (vitamina D₃) ou em duas moléculas inativas (lumisterol e taquisterol), quando a radiação é excessiva. Após a formação da vitamina D₃, ocorre a liberação da mesma para o meio extracelular, onde será atraída pela proteína de ligação da vitamina D (*Vitamin D Binding Protein* -DBP), que se encontra na circulação sanguínea e então será absorvida pelos capilares dérmicos. Porém, outro caminho pode ser seguido com a vitamina D₃. Quando não ocorre absorção, o excesso de luz solar a transforma em três fotoprodutos: supraesterol I, supraesterol II e 5,6-transvitamina D (**Figura 10**). Não são conhecidos casos de intoxicação desta vitamina por meio da síntese na pele, devido ao fato que o excesso da radiação UV, resulta na fotodegradação das moléculas pré-vitamina D₃ e vitamina D₃. O tempo de formação da vitamina D₃ varia de acordo com vários

fatores, por exemplo: quantidade de melanina, latitude, estação do ano, tempo de exposição e período do dia (FELDMAN; PIKE; GLORIEUX, 2005).

Figura 10- Eventos fotoquímicos da vitamina D

Fonte: adaptado de Feldman, Pike e Glorieux (2005).

A ativação ocorre no fígado, rins e queratinócitos. O fígado contém a enzima CYP2R1 e CYP27A1 que hidroxila a vitamina D₃, proveniente da produção na pele e da dieta de alguns peixes de água fria profunda, e a vitamina D₂, oriunda da dieta de alguns fungos. Estas vitaminas são transportadas na circulação por uma proteína que se liga a vitamina D (DBP) e, após passarem pela primeira hidroxilação (1,25(OH) D – calcidiol) no fígado, vão para os rins onde ocorre a segunda hidroxilação (1,25(OH)₂ D- calcitriol) pela enzima CYP27B1 (1-Hidroxilase) e CYP24A1 (24-Hidroxilase – primeiro passo para ficar inativa) e se tornam finalmente ativas (**Figura 11**). Os queratinócitos contêm as mesmas enzimas presentes no fígado e nos rins (CYP27B1 e CYP27A1) que, também, hidroxilam a vitamina D₃ e a torna ativa. A segunda hidroxilação ocorre somente quando existe a necessidade de ter mais vitamina D ativada no sangue para realizar as suas funções e, enquanto aguardam isto, ficam armazenadas nos adipócitos na forma de calcidiol (BIKLE, 2011; CASTRO, 2011; FELDMAN, PIKE; GLORIEUX, 2005; MOSTAFA; HEGAZY, 2014; SCHUESSLER et al., 2001).

Figura 11- Reação de ativação da vitamina D

Fonte: adaptado de Feldman, Pike e Glorieux (2005).

Muitas são as funções da vitamina D no organismo porque ela age em locais que contem o receptor denominado VDR (*Vitamin D Receptor*) e somente algumas células altamente diferenciadas do sistema nervoso central, as hemácias e as células musculares estriadas maduras não contêm este receptor (CASTRO, 2011).

A função mais conhecida da vitamina D é na homeostase do cálcio que proporciona a mineralização normal dos ossos e sua deficiência leva ao raquismo em crianças e a osteomalácia ou até osteoporose em adultos. Outra função importante é no sistema imune, pois estimula a função de macrófagos, células T e dendríticas, além de sintetizar peptídeos antimicrobianos. No caso de hipovitaminose, as doenças infecciosas (tuberculose) e autoimunes (lúpus, psoríase, esclerose múltipla) podem se desenvolver mais facilmente. Atua nas células β do pâncreas que facilita a secreção de insulina e no caso de falta desta vitamina ocorre maior risco de diabetes. Possui ação no sistema cardiovascular e no coração, por regular a coagulação, fibrinólise, função do coração e o equilíbrio entre a renina e a angiotensina. Doenças cardiovasculares, trombozes, hipertensão e miopatia (devido ação nos músculos) são possíveis consequências, quando os níveis de vitamina D estão baixos no organismo. No cérebro, estão presentes os receptores de vitamina D (VDR), mas não se sabe ao certo a sua exata função neste local, porém sua reposição pode ser uma alternativa em doenças mentais como Alzheimer ou Parkinson. Na pele, ela regula a proliferação e a diferenciação celular dos queratinócitos e fibroblastos. Por fim, a vitamina D atua na regulação do ciclo celular e inibe a proliferação celular da maioria das células do organismo, prevenindo o risco de vários tipos de câncer (NORMAN; BOUILLON, 2010; SCRAGG, 2011).

O uso tópico da vitamina D foi aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), em 1994, para o tratamento tópico de psoríase tipo “placa”, devido a sua função de modulação e de diferenciação dos queratinócitos. Estes efeitos associados a modulação dos mediadores da inflamação são, também, utilizados para os tratamentos *off-label* de outros tipos de doenças de pele, que possuem estudos de casos mostrando melhora, sendo necessário mais pesquisas comprobatórias. Por exemplo, outros tipos de psoríases, a pustulosa, ungueal, intertriginosa ou invertida, do couro cabeludo e doenças cutâneas como: pitíriase rubra pilar; nevo epidérmico verrucoso inflamatório linear (Nevil); ictiose e outras disordens de queratinização; doença de Grover; acantose nigricans; papilomatose confluyente e reticulada de Gougerot e Carteaud; prurigo nodular; queratose liquenóide crônica; vitiligo e morfea (PARISH, 2002; UNITED STATES, 1978; WOLVERTON, 2015).

A vitamina D é utilizada em suplementos alimentares na dose diária de 200 a 400 unidades internacionais (UI) na forma de cápsula de gelatina mole, podendo atingir doses de até 10.000 UI. Sua dose varia de 5.000 a 100.000 UI %p/p em formulações tópicas (cremes e loções) para celulite, quelóides, melhorar a cicatrização, pós-sol, flacidez, eczemas, fissuras e hidratante para as mãos e para o rosto. A função tópica da vitamina D favorece a cicatrização em queimaduras e escoriações, e na pele normal sua ação é pouco conhecida, mas a associação com a vitamina A é comum, pelo fato destas duas vitaminas estarem sempre associadas na natureza (BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2011).

Existem poucos estudos científicos sobre a administração de vitamina D₃ por via transdérmica, porém, mesmo assim, alguns *sítes* e farmácias de manipulação comercializam os produtos transdérmicos de vitamina D₃. Por isso o interesse em avaliar esta via alternativa, para verificar a sua efetividade (ALSAQR; RASOULLY; MUSTEATA, 2015; SADAT-ALI et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é o desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a combinação de promotores de permeação químicos: lecitina de soja, palmitato de isopropila, etoxidiglicol (Transcutol[®]CG), propilenoglicol e etanol, acrescidos do componente ativo vitamina D₃.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos estão descritos a seguir:

- Desenvolvimento dos sistemas transdérmicos com a vitamina D₃, seguindo o delineamento experimental;
- Validação do método analítico de quantificação da vitamina D₃ em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliação da Estabilidade Preliminar, Acelerada e Normal dos sistemas transdérmicos com a vitamina D₃;
- Avaliação da Segurança das formulações desenvolvidas, por meio do teste de irritação ocular (HET-CAM);
- Avaliação da retenção e permeação cutânea em célula de Franz, do sistema transdérmico com a vitamina D₃.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Os equipamentos, dispositivos e acessórios utilizados neste estudo estão descritos no **Quadro 1**.

Quadro 1 - Equipamentos, dispositivos e acessórios

Equipamentos	Marcas e modelos
Balança analítica	Shimadzu® AU7 220
Balanças semi-analíticas	Gehaka® BG 4000 e Ohaus® ARD 110
Banho termostatzado	Nova Ética® 500/3D
Centrífuga	Hitachi® CF16RXII
Micropipetas monocal	Eppendorf® Research 10,0-100,0 µL; 100,0-1000,0 µL e 1,0-10,0 mL Thermo Fischer Scientific® Finnpiquette F1 Pipettes 1,0 – 10 µL
Sistemas purificadores de água	Gehaka® OS20 LX e Merck Millipore® Simplicity UV
pHmetro	Quimis® Q400 AS
Refrigerador	Bosch® Ecoplus 370
Estufa	Nova Ética® 420/CDL300
Freezer (-20 °C)	Consul® Slim 200 e GE® Double Integration
Filtro de seringa (0,45 µm)	Analítica® 2204513 500C
Cromatografia líquida de alta eficiência	Shimadzu® LC-20AD/T; DGU 20A5R; CBM 20A; SIL-20AHT; CTO-20A; SPD-M20A; RF-20A
Coluna fase reversa C18	Shimadzu® Shim-pack VP-ODS 250L x 4,6
Banho de ultrassom	Unique® UniqueCleaner 1600 A e Alt® Altsonic Clean 9IA
Vials de vidro de 2 mL	Allcrom® KTVS21
Seringas de 20 mL e 60 mL	BD Plastipack® LuerSlip e 2oz
Frasco de vidro de 17 mL	Vitrium® 900-017
Chocadeira automática	Chocmaster® Bela48
Pinça histológica (anatômica ponta fina delicada)	Golgran® 139-92 – Tamanho: 16 cm
Microscópio digital	Dino-Lite® AM-2111
Aagitador magnético com aquecimento	IKA® HS 7

(continua)

Quadro 1 (continuação) - Equipamentos, dispositivos e acessórios

Agitador magnético sem aquecimento	Marte® MAG-MULTI - 15 pontos
Agitador de orbital de tubos e frascos	IKA® Vortex Genius 3
Bomba de vácuo	Fischer Scientific® Maximadry
Filtro de membrana hidrofílico (PTFE)	Merck Millipore® FHLC04700 – LCR - 0,45 µm
Aquário	F.G. Aquarios e Artefatos de Vidro® (45cmX30 cm)
Células de difusão vertical	F.G. Aquarios e Artefatos de Vidro® Área de difusão do compartimento doador (1,17 cm ²) e compartimento receptor de 3,6 mL
Seringas de 3 mL e 5 mL	BD Plastipack® Luer-Lok
Paquímetro	Kingtools-Vernier Caliper® 150x0,005mm/6"
Tewameter	Courage Kazako® TM300
Termostatosubmerso para aquários	VigoAr® T100 -50 W
Fita adesiva invisível	Scotch® Fita Mágica 3M (19 mm X 33 m)
Bastão de pressão específica	Cuderm® D500 - D-Squame Pressure Instrument
Pinça angular	Cuderm® D510 - D-Squame Angular Tweezers (4")
Pinça cushioning reta 1x2 Dentes	Golgran® 139-47 – Tamanho: 18 cm
Tesoura cirúrgica F/R reta	Golgran® 182-8 – Tamanho: 15 cm
Cabo de bisturi e lâminas	Golgran® Cabo nº 3 – Lâmina nº 10
Frasco de vidro âmbar de 60 mL	Agace Embalagens® GPP24mm
Tubos de <i>ependorf</i> (1,5 mL)	Eppendorf Tubes® 3810X

As matérias-primas utilizadas nas formulações estão descritas no **Quadro 2** e apresentaram grau de pureza farmacêutico.

Quadro 2- Matérias-primas

Matérias-primas (nome químico)	Nomenclatura INCI	Fornecedor
Lecitina de soja	<i>Lecithin</i>	AllChemistry®
Palmitato de isopropila ¹	<i>Isopropyl Palmitate</i>	AllChemistry®
Etoxidiglicol ²	<i>Ethoxydiglycol</i>	Brasquim®
Propilenoglicol	<i>Propileneglycol</i>	AllChemistry®
EDTA dissódico	<i>Disodium EDTA</i>	PharmaSpecial®
Butil Hidroxi Tolueno	<i>BHT</i>	Biovital®
Fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno ³	<i>Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) ethylparaben (and) propylparaben (and) butylparaben</i>	AllChemistry®
Co-Polímero de Acriloidimetiltaurato de Amônio/VP ⁴	<i>Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer</i>	Pharmaspecial®
Álcool etílico de cereais	<i>Alcohol</i>	AllChemistry®
Vitamina D ₃	<i>Cholecalciferol</i>	Fagron®
Lauril Sulfato de Sódio	<i>Sodium Lauryl Sulfate</i>	Sarfam®
Hidróxido de Sódio	<i>Sodium Hydroxide</i>	Merck®
Cloreto de Sódio	<i>Sodium Chloride</i>	Pharmaespecial®
Fosfato de Sódio Dibásico Dodecahidratado	<i>Disodium phosphate</i>	Quirios®
Fosfato de Potássio Monobásico	<i>Potassium phosphate</i>	Química Moderna®
Cloreto de Potássio	<i>Potassium Chloride</i>	Galena®

Legenda: **INCI** =International Nomenclature of Cosmetic Ingredients; **1** = Crodamol® IPP; **2**=Transcutol®CG; **3**= Phenonip®; **4** = Aristoflex® AVC.

Fonte: European Commission (2016a).

O padrão de referência secundário utilizado está descrito no **Quadro 3**.

Quadro 3- Padrão de referência secundário

Padrão de referência secundário	Nomenclatura INCI	Fornecedor
Vitamina D ₃ (grau de pureza HPLC ≥ 98%)	<i>Cholecalciferol</i>	Sigma-Aldrich®

Legenda: **INCI** =International Nomenclature of Cosmetic Ingredients.

Fonte: European Commission (2016a).

Os solventes utilizados durante as análises no trabalho estão descritos no **Quadro 4**.

Quadro 4-Solventes

Matérias-primas (nome químico)	Nomenclatura INCI	Fornecedor
Etanol P.A.	<i>Alcohol</i>	Synth®
Metanol grau HPLC	<i>Methyl alcohol</i>	Merck®

Legenda: **INCI** = *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*; **P. A.** = Pró Análise; **grau HPLC** = cromatográfico.

Fonte: European Commission (2016a).

Quadro 5- Ovos fecundados utilizados no experimento HET-CAM

Produto	Fornecedor	Raça da galinha
Ovos fecundados	Profº Drº Ricardo José Garcia Pereira - Departamento de Reprodução Animal -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP	Legorne branca

4.2. MÉTODOS

4.2.1. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA TRANSDÉRMICO

O desenvolvimento do sistema transdérmico, foi baseado na literatura científica e nas formulações prescritas em farmácias de manipulação. Utilizou-se como base a formulação de gel transdérmico do Batistuzzo, Itaya e Eto (2011), que continha a fase oleosa de lecitina de soja com o palmitato de isopropila e polaxâmero 407. Houve substituição do polaxâmero 407 pelo co-polímero de acriloidimetiltaurato de amônio/ VP, um polímero com boa estabilidade em formulações contendo álcool, que solubiliza o ativo (vitamina D₃). A adição do etoxidiglicol e do propilenoglicol teve por objetivo potencializar a permeação cutânea. Um antioxidante (butil hidroxitolueno) e um agente quelante/antioxidante (EDTA dissódico) foram adicionados a formulação, para garantir maior estabilidade (BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2011; MURAA et al.,2000; PHARMAESPECIAL, 2016).

4.2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO FATORIAL (DOE 2²)

A fim de obter a melhor combinação dos promotores de permeação, utilizou-se o delineamento experimental do tipo fatorial 2², nas concentrações mínimas e máximas, conforme exposto na **Tabela 1**. As formulações foram avaliadas em triplicatas (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

Tabela 1- Delineamento experimental do tipo fatorial ($DoE 2^2$) aplicado no desenvolvimento das formulações

Formulação	Proporção (%p/p)	
	Fase oleosa	Etoxidiglicol
F1	20,0	20,0
F2	20,0	10,0
F3	40,0	20,0
F4	40,0	10,0

4.2.3. FORMULAÇÃO

A fórmula qualitativa e quantitativa da formulação está descrita na **Tabela 2**.

Tabela 2- Fórmula qualitativa e quantitativa da formulação com vitamina D₃

	Composição (nome químico)	Proporção (%p/p)	Função
FASE OLEOSA	Lecitina de soja	9,948 ou 19,896	Promotor de permeação cutânea / emulsificante secundário
	Palmitato de isopropila	9,948 ou 19,896	Promotor de permeação cutânea
	Butil hidroxi tolueno	0,004 ou 0,008	Antioxidante
	Fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno	0,1 ou 0,2	Conservante
FASE AQUOSA	Co-polímero de acriloldimetiltaurato de amônio/ VP	1,5	Emulsificante polimérico
	Propilenoglicol	10,0	Umectante/ Promotor de permeação cutânea secundário
	Etoxidiglicol	10,0 ou 20,0	Promotor de permeação cutânea
	EDTAdissódico	0,1	Quelante
	Água destilada	q.s.p.100,0	Veículo
INGREDIENTE ATIVO	Vitamina D ₃	100.000 UI	Componente ativo
	Álcool etílico de cereais	8,0	Solubilizante/ Promotor de permeação cutânea secundário/ Volatilizador/ Conservante

Fonte: Batistuzzo, Itaya e Eto (2011); Brandão (2009); Lane (2013); Wenninger, Canterbury e Mcewen (2000).

O método de preparo da formulação está descrito a seguir (BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2011; GHEBRE-SELLASSIE; MARTIN, 2007):

- A. **Fase oleosa:** foram pesados os componentes da fase oleosa, na sequência, em um béquer;
- B. **Fase aquosa:** foram pesados os componentes da fase aquosa em béquer, seguindo a ordem de: propilenoglicol, etoxidiglicol, água destilada, EDTA e por último o co-polímero de acriloldimetiltaurato de amônio/ VP. Homogeneizou-se manualmente até a formação do gel;
- C. **Solubilização do ingrediente ativo:** foram pesados exatos 15,5 mg de vitamina D₃ e transferiu-se para balão volumétrico 50 mL (concentração 0,31 mg/mL), completando-se com álcool de cereais para solubilizar a vitamina D₃. Pipetou-se (8%p/p) do álcool de cereais com a vitamina D₃ solubilizada, para o béquer contendo a fase aquosa e agitou-se manualmente até ficar homogêneo;
- D. **Método de extrusão:** transferiu-se a fase oleosa para uma seringa de 20 mL e a fase aquosa para outra seringa de 60 mL. Conectou-se uma seringa na outra e empurraram-se os êmbolos de ambas para frente e para trás consecutivamente aproximadamente 20 vezes, até verificar a formação de uma emulsão.

A quantidade de formulação estava limitada pelo volume da seringa, sendo ideal preparar formulações de no máximo 30 g cada.

4.2.3.1. CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DA VITAMINA D₃

A concentração máxima de uso tópico segundo Batistuzzo, Itaya e Eto (2011), para 100.000 UI por 100 g de formulação. Com este valor selecionado, em 1g de formulação obteve-se 1.000 UI e esta dose foi equivalente a 0,025 mg de vitamina D₃ (1 mg =40.000 UI). Como a quantidade final da formulação foi de 30 g, obteve-se o valor de 0,75 mg de vitamina D₃. Para ser possível pesar este valor na balança analítica, precisou-se definir uma concentração com o volume utilizado para solubilizar o componente ativo (álcool de cereais) definido na fórmula (8%p/p), correspondendo a 2,4 mL de álcool de cereais em 30 g de formulação. Realizou-se um cálculo de concentração, massa (0,75 mg) sobre volume (2,4 mL) e obteve-se a concentração final de 0,31 mg/mL.

4.2.4. QUANTIFICAÇÃO DA VITAMINA D₃ EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A quantificação da vitamina D₃ em CLAE durante o Teste de Estabilidade foi realizada após o desenvolvimento e validação do método analítico.

O método de referência utilizado para realizar a quantificação da vitamina D₃ foi baseado em Bilodeau e colaboradores (2011) e alterações foram realizadas com finalidade de otimizar o tempo de corrida e a resolução do gráfico. Condições cromatográficas finais:

- **Coluna:** C18
- **Fase móvel:** Metanol (98%) e água deionizada (2%)
- **Fluxo:** 1,2 mL/min
- **Volume de injeção:** 40 µL
- **Temperatura do forno:** 40 °C
- **Absorção:** detector de UV a 265 nm
- **Tempo de corrida:** 16 min
- **Tempo de retenção da vitamina D₃:** aproximadamente 11 min

4.2.4.1. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO EM CLAE

Os parâmetros que foram avaliados na validação, seguiram a RE 899/2003 da ANVISA que são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

4.2.4.1.1. ESPECIFICIDADE

A especificidade é um teste de análise visual do cromatograma em que se avalia a presença de algum sinal no tempo de retenção do analito em questão (vitamina D₃), para isto é necessária a avaliação do solvente utilizado e da formulação sem o ativo (branca) e acrescida do ativo (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

Formulou-se o gel-creme com e sem a vitamina D₃, conforme descrito no item 4.2.3. Pesaram-se cerca de 0,5 g da formulação em um béquer, adicionaram-se 25 mL de etanol P. A. e utilizou-se banho de ultrassom durante 10 min, com a finalidade de melhorar a dispersão da formulação. Após este procedimento, foi retirado 1,0 mL

do líquido, que foi filtrado e transferido para um vial e submetido a análise em CLAE. Pela a extração da vitamina D₃ da formulação, de acordo com este procedimento, foi obtida uma concentração de 0,48 µg/mL de vitamina D₃ para a quantificação.

4.2.4.1.2. LINEARIDADE

Por meio da linearidade pode se avaliar se os resultados são diretamente proporcionais a concentração do ativo na amostra. Para um método ser linear, a curva média precisa apresentar um valor do coeficiente de correlação linear (R²) igual ou superior a 0,99 (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

Seis réplicas foram realizadas com a concentração entre 80 a 120% do valor teórico (0,48 µg/mL) e foi constituída uma curva com a média dos resultados de três curvas realizadas em três dias consecutivos. Os valores selecionados para a construção da curva foram: 0,1; 0,25; 0,48; 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

Pesaram-se cerca de 25,0 mg do padrão secundário da vitamina D₃ que foi diluído em um balão volumétrico de 50,0 mL com etanol P.A. (solução mãe). Retirou-se a alíquota de 10,0 mL e transferiu-se para um balão volumétrico de 25,0 mL (solução intermediária 1), e desta foram retiradas alíquotas de 2,5; 6,25; 12; 25; 37,5 e 50 µL, transferindo-se para balão volumétrico de 5,0 mL e obtendo-se as concentrações de: 0,1; 0,25; 0,48; 1,0; 1,5 e 2,0 µg/mL, respectivamente. Num vial de 2,0 mL, foi transferido e filtrado 1,0 mL de solução de cada balão referente a uma concentração da curva, consecutivamente, até se obter os 18 vials, que foram quantificados em CLAE.

4.2.4.1.3. PRECISÃO

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos após análises consecutivas realizadas no mesmo dia (precisão intra-corrida) e em dias diferentes (precisão inter-corridas). O desvio padrão relativo é representado pela precisão que foi calculado, conforme a **Equação 1**, sendo considerado com boa precisão valores até 5% (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Equação 1 – Equação utilizada para calcular a precisão

Onde: **DPR** = desvio padrão relativo; **DP** = desvio padrão; **CMD** = concentração média determinada.
Fonte: Brasil (2003).

As concentrações definidas para avaliar a precisão foram divididas em valores de concentração baixa (0,48 µg/mL), média (1,0 µg/mL) e alta (1,5 µg/mL), em triplicata e a partir da solução mãe, descrita no item 4.2.4.1.2 retirou-se 10,0 mL de alíquota, transferiu-se para um balão volumétrico de 25,0 mL (solução intermediária 2) e completou-se o volume com etanol P.A. Foram retiradas alíquotas de 24; 25 e 37,5 µL da solução intermediária 2 e transferidas para balões volumétricos de 10,0; 5,0 e 5,0 mL, respectivamente, para alcançar as concentrações definidas de análise. Foram transferidos e filtrados 1,0 mL das soluções de concentrações definidas para os vials, que posteriormente foram quantificados por CLAE. Este procedimento foi repetido por três dias consecutivos (precisão inter-corrida).

4.2.4.1.4. EXATIDÃO

A exatidão avalia a proximidade dos resultados ao valor teórico, e foi calculada conforme a **Equação 2**. Há a necessidade de estar no intervalo de 95 a 105% para ser considerado com boa exatidão (BRASIL,2003; ICH,2005; INMETRO, 2010).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{CME}}{\text{CT}} \times 100$$

Equação 2- Equação utilizada para calcular a exatidão

Onde: **CME** = concentração média experimental; **CT** = concentração teórica.

Fonte: adaptado de Brasil (2003).

O procedimento de análise foi realizado conforme descrito no item 4.2.4.1.3.

4.2.4.1.5. LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção é o menor valor que é detectado pelo método de análise escolhido. Foi determinado experimentalmente e não por meio de equações. As concentrações abaixo do menor ponto da curva analítica foram testadas, tais como: 80,0; 60,0; 40,0; 20,0; 10,0 ng. Para chegar nestas concentrações foram transferidas alíquotas de 10,00; 7,50; 5,00; 2,50 e 2,50 µL para balões volumétricos de 25,0 mL correspondentes as primeiras alíquotas e balão de 50,0 mL somente para a última alíquota mencionada. Estas alíquotas foram retiradas da solução intermediária 2 (item 4.2.4.1.3.). Por fim, retirou-se 1,0 mL de cada balão volumétrico, filtrou-se e acondicionou em vials para ser possível a análise em CLAE (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

4.2.4.1.6. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação é o menor valor em que se obtém precisão e exatidão adequadas e foi realizado conforme descrito no item 4.2.4.1.3. (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

4.2.5. TESTES DE ESTABILIDADE

4.2.5.1. TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

As formulações desenvolvidas foram deixadas em repouso durante 48 horas e então submetidas ao Teste de Estabilidade Preliminar com o objetivo de selecionar as formulações mais estáveis (triagem). Os testes foram realizados em triplicata. O teste de centrifugação consistiu em centrifugar cerca de 5,0 g de formulação em temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) e na velocidade de rotação de 3.000 rpm por 30 minutos. O teste de estresse térmico submeteu cerca de 5,0 g de formulação em banho-maria termostatizado numa faixa de temperatura de 40,0 °C a 80,0 °C aumentando gradualmente 10,0 °C a cada 30 minutos (BABY, 2005, 2007; BRASIL, 2004; PINTO, 2014).

Um critério de avaliação visual das formulações foi definido ao final dos testes:

- **M** = formulação modificada com separação de fase (reprovada);
- **LM** = formulação levemente modificada com discreta separação de fase (reprovada);
- **N** = formulação normal sem separação de fase (aprovada).

4.2.5.2. TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA

Após o Teste de Estabilidade Preliminar ser realizado, as formulações aprovadas foram refeitas e, após o período de repouso de 48 h, foram avaliadas no Teste de Estabilidade Acelerada, que consiste em aplicar condições extremas de temperatura, sendo considerada uma triagem no desenvolvimento das formulações e não garante o prazo de validade. O teste durou 15 dias e as formulações em triplicata foram acondicionadas em frascos de polietileno com capacidade para 30 g

e armazenadas em quatro condições de temperatura (BABY, 2005, 2007; BRASIL, 2004; PINTO, 2014):

- **Temperatura ambiente:** $25,0 \pm 2,0$ °C;
- **Geladeira:** $5,0 \pm 2,0$ °C;
- **Estufa:** $45,0 \pm 2,0$ °C;
- **Ciclos:** 24 h a $45,0 \pm 2,0$ °C e 24 h a $-5,0 \pm 2,0$ °C, durante 12 dias (6 ciclos).

No tempo inicial (t_0) depois de 48 horas do preparo, após 15 dias nas condições de temperatura ambiente, estufa e geladeira (t_{15}) e após 12 dias de ciclo (t_{12}) as amostras foram avaliadas quanto a suas características organolépticas (cor, odor, aspecto), característica físico-química (pH) e quantificação da vitamina D₃ por CLAE (BABY, 2005, 2007; BRASIL, 2004; PINTO, 2014).

4.2.5.3. TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL

Uma formulação do Teste de Estabilidade Acelerada foi escolhida para ser testada no Teste de Estabilidade Normal. Este teste prevê a estabilidade da formulação, tempo de vida útil e a sua compatibilidade com o material de acondicionamento. O prazo de validade pode ser estimado neste estudo. As variáveis de temperatura e o tempo de armazenamento foram avaliados no período de 90 dias. As triplicatas das formulações foram colocadas em frascos de vidro de 17 mL transparentes. As condições de temperatura são menos extremas que a do teste anterior (BABY, 2005, 2007; BRASIL, 2004; PINTO, 2014):

- **Temperatura ambiente (ao abrigo de luz):** $25,0 \pm 2,0$ °C
- **Radiação Luminosa (exposição à luz solar):** $25,0 \pm 2,0$ °C;
- **Estufa:** $40,0 \pm 2,0$ °C;
- **Geladeira:** $5,0 \pm 2,0$ °C.

As características organolépticas (cor, odor, aspecto), característica físico-química (pH) e quantificação da vitamina D₃ por CLAE, foram avaliadas nos seguintes tempos de análise: após 48 horas do preparo (t_0), após 7 (t_7), 15 (t_{15}), 60 (t_{60}), e 90 dias (t_{90}) (BABY, 2005, 2007; BRASIL, 2004; PINTO, 2014).

4.2.6. TESTE DE SEGURANÇA

4.2.6.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO (HET-CAM)

O teste para avaliar a irritação aguda e corrosão de medicamentos ou cosméticos, aprovado pela *Organisation for Economic Co-Operation and Development* (2012), consiste em estudos *in vivo* realizados em olhos de coelhos, desenvolvido por Draize, Woodard e Calvery (1944). Porém, a partir de 2013, a recomendação da Comissão Europeia foi para que houvesse a substituição dos testes *in vivo* para os métodos alternativos *in vitro*, com o intuito de diminuir o custo, tempo e o uso de animais. O teste denominado “*Hen’s Egg Test Chorionallantoic Membrane*” (HET-CAM), é um ensaio que utiliza a membrana cório-alantoide de um ovo embrionado de galinha da raça Legorne branca, para avaliar o potencial de irritação de substâncias ou formulações e foi proposto para esta finalidade por Luepke (1985) e Luepke e Kemper (1986) (EUROPEAN COMMISSION, 2016b; UNITED STATES, 2006).

O ovo fecundado foi colocado em uma chocadeira com rolagem de ovos, controle de temperatura e umidade automáticas (**Figura 12**), num período de 10 dias à 37 °C e umidade relativa (UR) de aproximadamente 65%, a fim de possibilitar a formação da membrana cório-alantoide. Neste período, o tecido nervoso do embrião e a sensação de dor ainda não estão desenvolvidos (EUROPEAN COMMISSION, 2004a; OLIVEIRA et al., 2012; UNITED STATES, 2010).

Figura 12- Esquema da chocadeira automática utilizada no HET-CAM

Fonte: Chocmaster (2017).

Após o período de incubação, a parte do ovo que possui a câmara de ar, foi quebrada delicadamente com pinça, tornando exposta a membrana cório-alantoide. A mesma foi hidratada com 300 μ L de solução de cloreto de sódio 0,9%p/v para facilitar a retirada da membrana interna sem danificar os vasos sanguíneos (OLIVEIRA et al., 2012; UNITED STATES, 2010).

Os controles positivos (dispersão de lauril sulfato de sódio 1%p/v e hidróxido de sódio 1 mol/L) e negativo (solução de cloreto de sódio 0,9%p/v) foram aplicados em cima de vasos sanguíneos, na quantidade de 300 μ L, para verificar a indução de resposta (coagulação, lise, hemorragia ou sem efeito). Em seguida, as amostras em triplicata das formulações contendo vitamina D₃ diluídas em água destilada na proporção de 1:100, foram adicionadas na quantidade de 300 μ L sob os vasos sanguíneos e deixadas em contato por 5 minutos. Todo o teste foi filmado a fim de analisar posteriormente os efeitos das formulações e dos controles nos vasos sanguíneos (**Figura 13**) (UNITED STATES, 2010).

Figura 13- Visualização do teste HET-CAM durante o experimento

Fonte: Costa (2017).

O parâmetro de avaliação do teste envolve uma pontuação tempo dependente que é atribuída ao tipo de efeito observado, conforme a **Tabela 3** (LUEPKE, 1985; UNITED STATES, 2010).

Tabela 3– Pontuação atribuída ao efeito observado no teste HET-CAM

Efeito observado	Pontuação		
	0,5 min	2 min	5 min
Lise	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: Luepke (1985).

A classificação das amostras analisadas ocorre pela somatória da pontuação ao longo do tempo e dos efeitos observados, denominada como *Irritation Score* (IS) (**Tabela 4**) (LUEPKE, 1985; UNITED STATES, 2010).

Tabela 4 - Classificação do grau de irritação ocular conforme a pontuação adquirida no teste HET-CAM

Pontuação Final (IS)	Classificação
0,0 – 0,9	Não Irritante
1,0 – 4,9	Levemente Irritante
5,0 – 8,9	Moderadamente Irritante
9,0 – 21,0	Fortemente Irritante

Legenda: **IS**: *Irritation Score*.

Fonte: Luepke (1985).

4.2.7. TESTE DE EFICÁCIA

4.2.7.1. RETENÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Testes clínicos são indicados para avaliar a eficácia e segurança de produtos para a pele, porém são onerosos e demandam tempo. Uma alternativa utilizada durante o desenvolvimento de produtos são os testes *in vitro*, que garantem uma seleção e comparação entre as formulações. Por exemplo, o teste de retenção e permeação cutânea de ingrediente ativo, auxilia no desenvolvimento de produtos e sugere uma efetividade, caso o ingrediente ativo esteja presente em quantidades suficientes no local em que se deseja ter a ação. Além disso, estes testes podem definir a segurança de uma formulação ou substância tóxica, por meio do perfil de permeação da mesma (ZATZ, 1993).

O ensaio de retenção e permeação cutânea se baseia em células de difusão vertical com dois compartimentos (doador e receptor), seguindo o modelo C da Farmacopéia Americana. Estas células são popularmente conhecidas como células de Franz, que foi o pioneiro na implementação do ensaio *in vitro* de permeação. A **Figura 14** mostra a adaptação da célula que foi utilizada no experimento (FRANZ, 1975; U. S. PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2016).

Figura 14– Célula de difusão vertical utilizada no experimento

Fonte: Costa (2017).

Com a finalidade de avaliar a efetividade e segurança das formulações, foi realizado o experimento de retenção e permeação cutânea para verificar o perfil de permeação da vitamina D₃ frente à combinação de promotores de permeação cutânea.

As formulações utilizadas estão descritas na **Tabela 5**. As mesmas foram avaliadas em triplicata.

Tabela 5– Formulações avaliadas no teste de retenção e permeação cutânea com suas proporções

Composição (nome químico)	Proporção (%p/p)	
	Controle	Formulação (F1)
Vitamina D ₃	100000 UI	100000 UI
Álcool etílico de cereais	8,0	8,0
Lecitina de soja	-	9,948
Palmitato de isopropila	-	9,948
Butil hidroxi tolueno	0,004	0,004
Fenoxietanol, e Parabenos	0,1	0,1
Co-Polímero de Acriloldimetiltaurato de Amônio/ VP	1,5	1,5
Propilenoglicol	10,0	10,0
Etoxidiglicol	-	20,0
EDTA dissódico	0,1	0,1
Água destilada	q.s.p.100,0	q.s.p.100,0

4.2.7.1.1. SOLUBILIDADE DA VITAMINA D₃

A solubilidade da vitamina D₃ foi avaliada para determinar o líquido receptor mais apropriado ao teste de permeação cutânea, que favoreça a difusão do ativo em questão, evitando a saturação do meio e garantindo a *sink condition* (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014).

O líquido receptor de escolha precisa mimetizar as condições fisiológicas e o mais utilizado é o tampão fosfato alcalino (pH 7,4), conhecido por seu nome em inglês: *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Porém, o PBS é apropriado para substâncias hidrossolúveis. Como a vitamina D₃ é lipossolúvel, se faz necessária à adição de substâncias que auxiliam na solubilidade da mesma, tais como: tensoativos (tween 80), proteínas (soro fetal bovino) ou solventes orgânicos (etanol). Este último foi o escolhido para a realização do experimento, pois o tween 80 não foi seletivo e o soro fetal bovino possui um custo elevado. (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Um excesso de vitamina D₃, na concentração de aproximadamente 25 mg/mL, foi adicionado no líquido receptor (PBS) com as proporções de 40 e 50% de etanol e deixou-se em agitação (100 rpm) a 35 °C. Nos tempos 0; 0,5; 1; 3; 4; 5; 22 e 24 h, foram coletados 3 mL das dispersões e centrifugadas por 15 minutos a 7000 rpm. Os sobrenadantes foram filtrados, transferidos para os vials e quantificados por CLAE, conforme o método descrito no item 4.2.4. (ALSAQR; RASOULLY; MUSTEATA, 2015).

O PBS utilizado foi o de acordo com a Farmacopeia Brasileira e o mesmo foi filtrado a vácuo antes do início dos experimentos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

4.2.7.1.2. VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARCIAL

Não foi preciso realizar uma completa validação, visto que a validação analítica já havia sido feita, conforme descrita no item 4.2.4.1. A validação analítica parcial foi realizada, com o intuito de comprovar a especificidade e a recuperação do padrão do experimento de retenção e permeação cutânea, pois houve mudanças apenas na matriz e no processo de extração (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

4.2.7.1.2.1. ESPECIFICIDADE

A especificidade ou pesquisa de interferentes foi realizada para verificar se alguma substância foi absorvida no mesmo tempo de retenção da vitamina D₃. O líquido receptor e o líquido extrator (etanol) na presença de cotonetes, fitas adesivas utilizadas no processo de *tape stripping* e epiderme e derme, foram testados frente à adição da vitamina D₃.

4.2.7.1.2.2. RECUPERAÇÃO DO PADRÃO

A recuperação do padrão possibilita avaliar a capacidade do método de extração utilizado. Os valores tem que ser próximos a 100% ou podem ser menores quando possuem precisão e exatidão adequadas. O cálculo da recuperação do padrão é realizado por meio da **Equação 3** (BRASIL,2003; INMETRO, 2010).

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100$$

Equação 3- Equação utilizada para calcular a recuperação do padrão

Onde: **C1** = concentração que foi recuperada; **C2** = concentração da amostra branca; **C3** = concentração adicionada.

Fonte: adaptado de Imetro (2010).

Foram adicionadas três concentrações distintas de padrão de vitamina D₃ (baixa: 0,48 µg/mL, média: 1,0 µg/mL e alta: 1,5 µg/mL) nos meios de etanol com os cotonetes, as fitas adesivas e a epiderme e derme. Os meios foram extraídos do experimento realizado por 24 h, com a pele sem a adição da formulação (branca). As análises foram realizadas em triplicata e foram submetidas ao processo de extração: agitação por 5 minutos no vórtex e 15 minutos no ultrassom. Depois foram filtradas (0,45 µm) e transferidas para os vials âmbar e analisados por CLAE.

4.2.7.1.3. PELE

Os testes *in vitro* podem utilizar diferentes membranas, tais como: pele humana, orelha de porco e pele de rato. A escolha da membrana pode variar de acordo com o objetivo do estudo. Por exemplo, as membranas de animais são mais indicadas para a seleção das formulações (triagem), pois possuem maior capacidade de permeação, devido à presença de numerosos folículos pilosos. A pele humana obtida por meio de cirurgias estéticas (mais utilizado), cadáveres ou

biópsia é o modelo mais indicado (“padrão de ouro”), que mimetiza o teste *in vivo* e os resultados são mais confiáveis (LEITE-SILVA, 2012; ZATZ, 1993).

O modelo de pele utilizado no experimento foi o da pele humana, extraída de cirurgia plástica abdominal. O uso da mesma foi aprovado pelos Comitês de Ética da UNIFESP (nº CAAE 59667916.2.0000.5505) (**Anexo A**) e o da USP (nº CAAE 59667916.2.3001.0067) (**Anexo B**), pois houve parceria entre essas duas universidades. Houve também, a realização de emendas aprovadas pelos Comitês de Ética da UNIFESP (**Anexos C**) e USP (**Anexo D**).

Após o consentimento dos voluntários, que se submeteram a cirurgia e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), a doação da pele foi realizada. No dia da coleta, a pele foi recolhida com o médico, colocada em um saco plástico e em seguida congelada a -20 °C. No dia seguinte, a preparação da pele foi realizada. Retirou-se toda a gordura (hipoderme) da pele congelada inicialmente com bisturi e posteriormente com a tesoura histológica. Manteve-se a espessura total da pele (estrato córneo, epiderme e derme), com valor padronizado de 1000 µm, para possibilitar a pesquisa de retenção cutânea do ingrediente ativo nestas camadas. Pequenos quadrados foram cortados, embrulhados em papel manteiga, colocados dentro de um saco plástico datado e identificado e mantidos a -20 °C. O tempo de armazenamento da pele preparada no freezer é de até seis meses, sendo que após este período a integridade da pele não é garantida (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2011; ZATZ, 1993).

4.2.7.1.4. PROCEDIMENTO

No início do experimento, as peles foram selecionadas e após o descongelamento, a integridade da pele foi verificada por meio da análise da perda de água transepidérmica ou *Transepidermal Water Loss* (TEWL). O equipamento utilizado foi o Tewameter® e as peles com valores basais acima de 10 g/ h m² foram descartadas (DE PAEPE et al., 2005; GIOIA; CELLENO, 2002; GUTH et al., 2015).

As peles com TEWL aprovadas foram posicionadas nas células de Franz entre os compartimentos doadores e receptores, com o estrato córneo voltado para cima e a derme voltada para baixo e posteriormente fixados com a ajuda de um grampo metálico. Em seguida, os compartimentos receptores foram preenchidos totalmente

com o líquido receptor adequado, evitando a formação de bolhas e as barras magnéticas foram colocadas (U. S. PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2016).

Nas células de Franz de fluxo estático, o líquido receptor deve ser agitado constantemente com uma barra magnética na velocidade de 600 rpm e sua temperatura deve ser mantida a 32 ± 1 °C. Como as células utilizadas no experimento foram uma adaptação ao modelo da Farmacopeia Americana, a mesma não possui um sistema interno de aquecimento (jaqueta), por isso são encaixadas em um suporte de acrílico, colocado dentro de um aquário com água aquecida e mantida por um termostato a 32 °C, deixando somente os compartimentos receptores submersos (**Figura 15**) (U. S. PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2016).

Figura 15- Sistema adaptado de permeação cutânea

Fonte: Costa (2017).

A dosagem de aplicação no compartimento doador é considerada de infinita dose (> 10 mg/cm²), pois foi colocada aproximadamente 300 mg em uma área de 1,17 cm². Pesou-se esta quantidade em seringas de 3 mL e foram colocadas sobre a pele fixada na célula de Franz. Para uma melhor aderência, espalhou-se as formulações com a ajuda de um êmbolo de 5 mL. O experimento foi protegido da luz (ALSAQR; RASOULLY; MUSTEATA, 2015; DIEMBECK et al., 1999).

A cinética de permeação foi avaliada individualmente nos tempos 1, 4 e 24 h e após o término de cada tempo, a célula foi desmontada, o líquido receptor colhido e transferido para um frasco de vidro âmbar de 60 mL. A formulação remanescente na pele e no compartimento doador foi recolhida com a ajuda de aproximadamente quatro cotonetes que foram armazenados em frascos de vidro âmbar de capacidade

de 60 mL com a presença de 20 mL de etanol P.A. Antes de realizar o procedimento de *tape stripping*, foi verificada a integridade da pele, por meio do mesmo equipamento utilizado no início do experimento (ARMELINI, 2015; RAMEZANLIA, 2017).

O processo de *tape stripping* foi realizado com a aplicação de 16 fitas adesivas consecutivas, com pressão de 225 g/cm^2 por 5 segundos. As fitas foram armazenadas em frascos de vidro âmbar de capacidade de 60 mL contendo 20 mL de etanol P.A., sendo que a primeira fita colhida foi adicionada no frasco que continha os cotonetes, pois ela retirou o excesso de formulação existente na pele e foi considerada a superfície da pele (ALSAQR; RASOULLY; MUSTEATA, 2015; ARMELINI, 2015; BEN-SHABAT et al., 2005).

A epiderme e a derme foram cortadas em pedaços pequenos e armazenadas em frascos de vidro âmbar de capacidade de 60 mL com 20 mL de etanol P.A. (ARMELINI, 2015).

Todas as amostras armazenadas nos frascos de vidro âmbar, foram agitadas por 5 minutos em vórtex (2.500 rpm), levadas ao ultrassom por 15 minutos, filtradas ($0,45 \mu\text{m}$), transferidas para os vials e analisadas por CLAE (item 4.2.4.) (ALSAQR; RASOULLY; MUSTEATA, 2015; ARMELINI, 2015; BEN-SHABAT et al., 2005).

O material utilizado e que teve contato com a pele, foi deixado em hipoclorito a 2% por 24 h e em seguida lavadas normalmente com água e detergente. Os resíduos biológicos foram descartados de acordo com o protocolo da UNIFESP.

4.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa Minitab[®] versão 17 e os testes estatísticos avaliados foram: teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey, para calcular as diferenças estatísticas intra e intergrupos (acima de três grupos); teste t de duas médias, para verificar a diferença de um grupo com o controle; teste t pareado para ver as diferenças estatísticas de amostras iniciais e finais. Os resultados foram avaliados em réplicas de três ou mais amostras e o nível de significância adotado foi de 0,05 (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA TRANSDÉRMICO

O primeiro passo foi definir quais seriam os promotores de permeação que iriam ser utilizados no sistema transdérmico, definindo-se a lecitina de soja e o etoxidiglicol. A escolha da lecitina de soja ocorreu pelo seu uso comprovado em formulações transdérmicas e o etoxidiglicol, por ser uma substância com potencial na pesquisa de transdérmicos, sendo interessante avaliar sua capacidade como promotor de permeação cutânea associada à lecitina de soja (BENTLEY et al.,1997; DREHER et al.,1996; GODWIN; KIM; FELTON, 2002; LANE,2013; MAHJOUR et al.,1990; MURAA et al., 2000; VINTILOIU; LEROUX, 2008; WILLIMANN et al.,1992;).

O segundo passo foi escolher alguma substância para solubilizar a lecitina de soja sob a forma de pó. Vários solventes foram testados, como: PEG-5 ceteth-20, polisorbato 80, etoxidiglicol, óleo de rícino, propilenoglicol e palmitato de isopropila. O escolhido foi o palmitato de isopropila, que melhor incorporou a lecitina de soja na forma de pó, permitindo um aspecto de pasta uniforme, por ser bastante utilizado em conjunto com a lecitina e, também, por possuir características de promotor de permeação cutânea (GUO et al.,2006; KOGAN; GARTI, 2006).

Com a fase oleosa escolhida, foi possível definir a fase aquosa. A forma de gel nesta fase é muito utilizada em sistemas transdérmicos e o polímero de escolha foi o co-polímero de acriloldimetiltaurato de amônio/ VP, pela sua capacidade de permitir a incorporação de álcool na formulação para solubilizar a vitamina D₃, sem alteração das características da preparação. A vitamina D₃ foi selecionada como ingrediente ativo, devido à necessidade em pesquisar alternativas de administração, com a finalidade de diminuir a carência de vitamina D, que vem sendo crescente nas últimas décadas, da maioria da população mundial pela falta de exposição ao sol. Ao incorporar a fase oleosa com a fase aquosa na forma de gel, formou-se um gel-creme de característica opaca (BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2011; GILABERTE et al.,2011; PHARMAESPECIAL, 2016).

A escolha do propilenoglicol associado com o etoxidiglicol visou potencializar a permeação e, também, pelas suas características umectantes. Com a finalidade de melhorar as características de estabilidade da formulação, foram adicionados os

antioxidantes EDTA dissódico (antioxidante/quelante) e butil hidroxi tolueno (GODWIN; KIM; FELTON, 2002; LANE, 2013; MURAA et al., 2000).

O método de extrusão se baseia na pressão exercida de um material, por meio de um orifício, para formação um novo material (extrudado). É utilizado para formação de filmes transdérmicos, para a mistura de substâncias, entre outros. O método foi desenvolvido e adaptado, o que resultou na utilização de duas seringas de tamanhos diferentes (20 e 60 mL) conectadas entre si, na medida em que se empurravam os êmbolos, ocorria um aumento de pressão e o processo de formação do gel-creme se realizava (BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2011; GHEBRE-SELLASSIE; MARTIN, 2007).

5.2. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE

A validação analítica foi realizada para possibilitar o doseamento da vitamina D₃ por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) extraída da formulação durante o Teste de Estabilidade Acelerada. Foram analisados os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, conforme descritos na RDC 899/2003 (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

5.2.1. ESPECIFICIDADE

A avaliação da especificidade foi realizada conforme descrito no item 4.2.4.1.1. e os resultados demonstraram que não houve detecção de sinal no tempo de retenção da vitamina D₃, aproximadamente de 11 minutos, na formulação branca (sem a vitamina D₃) e no solvente. O que significa que este método é específico para a vitamina D₃. Os cromatogramas estão demonstrados nas **Figuras 16 a 21**.

Figura 16- Cromatograma do solvente etanol P.A (branco) realizado por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)

Figura 17- Cromatograma do solvente etanol P.A. acrescido do padrão secundário da vitamina D₃ (indicado pela seta) realizado por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)

Figura 18 - Cromatograma da Formulação 1 (F1), com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol sem a vitamina D₃ (branco) por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)

Figura 19- Cromatograma da Formulação 1 (F1), com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol com a vitamina D₃ (indicado pela seta) por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)

Figura 20- Cromatograma da Formulação 2 (**F2**), com 20% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol sem a vitamina D₃ (branco) por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)

Figura 21- Cromatograma da Formulação 2 (**F2**), com 20% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol com a vitamina D₃ (indicado pela seta) por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)

5.2.2. LINEARIDADE

A linearidade foi analisada como está descrito no item 4.2.4.1.2. e a curva média está descrita na **Figura 22**.

Figura 22- Linearidade do método para quantificação de vitamina D₃ extraída da formulação por CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min)

O gráfico apresenta a curva média de três curvas realizadas em três dias diferentes e obteve-se a **Equação 4** com o coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,9991. Este valor foi considerado satisfatório pela RDC 899/2003, que preconiza um valor de coeficiente de correlação linear igual ou maior que 0,99 e, portanto, este método pode ser considerado linear na relação concentração de vitamina D₃ X área do pico (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

$$y = 90909 x - 9,1154$$

Equação 4- Equação de reta obtida por meio da curva média de três curvas realizadas na faixa de 0,1 a 2 µg/mL.

Onde: o coeficiente angular (**a**) é 90909; o coeficiente linear (**b**) é -9,1154; o **y** é a área do pico em a.u. e o **x** é a concentração da vitamina D₃ em µg/mL .

5.2.3. PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão do método analítico foi calculada de acordo com a **Equação 1** e a exatidão foi calculada conforme a **Equação 2**. Os resultados estão demonstrados na **Tabela 6** e todos os valores encontrados foram considerados aprovados pelo critério da RDC 899/2003, que preconiza que uma precisão adequada precisa possuir valores abaixo de 5% e para exatidão os valores precisam estar entre 95 e 105% (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

Tabela 6- Precisão e exatidão intra-corrida (mesmo dia de análise) e inter-corrida (dias diferentes de análise), com as concentrações médias de vitamina D₃ calculadas pela equação de reta obtida por meio da curva de calibração realizada no dia da análise (n=6)

Concentrações teóricas (µg/mL)	C média ± desvio padrão (µg/mL)	Precisão intra-corrida (%)	Exatidão intra-corrida (%)	C* média ± desvio padrão (µg/mL)	Precisão inter-corrida (%)	Exatidão inter-corrida (%)
0,48	0,470 ± 0,003	0,627	97,99	0,489±0,010	1,962	101,83
1,00	1,003 ± 0,005	0,519	100,29	1,020 ±0,039	3,790	102,04
1,50	1,554 ± 0,004	0,268	103,59	1,546 ± 0,023	1,480	103,09

Legenda: C média ± desvio padrão: concentração média de seis concentrações calculadas pela equação de reta ($y = 92288x - 2054,3$) de uma curva de calibração realizada no dia da análise, com coeficiente de correlação linear (R^2) 0,9993 e desvio padrão; C* média ± desvio padrão: concentração média de seis concentrações e desvio padrão, sendo que uma triplicata foi calculada pela equação de reta ($y = 89541x + 731,3$) de uma curva de calibração realizada no dia da análise, com coeficiente de correlação linear (R^2) 0,9997 e a outra triplicata, realizada em dia diferente, foi calculada pela equação de reta ($y = 90898x + 1295,7$) de uma curva de calibração realizada no dia da análise, com coeficiente de correlação linear (R^2) 0,9974.

5.2.4. LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção é a menor concentração que é detectada pelo método e o limite de quantificação é o menor valor com precisão e exatidão adequado. Estes parâmetros foram avaliados experimentalmente e os resultados estão demonstrados na **Tabela 7** (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

Tabela 7- Precisão e exatidão de concentrações baixas de vitamina D₃ para calcular o limite de quantificação

Concentrações teóricas (ng/mL)	C ₁	C ₂	C ₃	C média ± desvio padrão (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)
80,0	79,02	80,13	79,42	79,52 ± 0,001	0,71	99,41
60,0	57,75	58,01	56,47	57,34 ± 0,001	1,38	95,58
40,0	38,21	40,35	36,68	38,41 ± 0,002	4,80	96,03
20,0	24,93	18,93	18,79	20,88 ± 0,004	16,78	104,44
10,0	-	-	-	-	-	-

Legenda: C₁ a C₃: réplicas das concentrações calculadas pela equação de reta ($y = 89541x + 731,3$) de uma curva de calibração realizada no dia da análise, com coeficiente de correlação linear (R^2) 0,9997; C média ± desvio padrão: concentração média das três concentrações e desvio padrão; -: não houve detecção de sinal.

Os resultados da **Tabela 7** indicam que o limite de detecção do método foi de 20 ng/mL, uma vez que a 10 ng/mL não houve detecção de sinal. O limite de quantificação foi a concentração de 40 ng/mL, por ser o menor valor que apresentou valores de precisão abaixo de 5% e de exatidão entre 95 a 105%.

5.3. TESTE DE ESTABILIDADE

5.3.1. TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

A avaliação da Estabilidade Preliminar foi realizada para verificar a viabilidade das formulações na etapa de triagem. Testaram-se quatro formulações variando a concentração da fase oleosa e do etoxidiglicol e o resultado deste teste está demonstrado na **Tabela 8**.

Tabela 8- Avaliação visual das formulações submetidas ao Teste de Estabilidade Preliminar

Formulações	Teste de Estabilidade Preliminar	
	Centrifugação	Estresse Térmico
F1	N	N
F2	N	N
F3	M	M
F4	LM	LM

Legenda: **N**: normal; **M**: modificado; **LM**: levemente modificado.

Como se observou na **Tabela 8**, as formulações **F1** e **F2** foram aprovadas por não terem sofrido nenhuma modificação na formulação (N). As formulações **F3** e **F4** foram reprovadas por ter ocorrido separação de fase durante os dois processos de teste: o estresse térmico e a centrifugação (M e LM).

As imagens das formulações 1, 2, 3 e 4 após o teste de centrifugação e estresse térmico estão apresentadas nas **Figuras 23 a 26**, respectivamente.

Figura 23- Formulação (**F1**) com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol, após centrifugação (**A**) e estresse térmico (**B**) (n=3) **Figura 24-** Formulação (**F2**) com 20% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol, após centrifugação (**A**) e estresse térmico (**B**) (n=3)

Figura 25 - Formulação (**F3**) com 40% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol, após centrifugação (**A**) e estresse térmico (**B**) (n=3)

Figura 26- Formulação (**F4**) com 40% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol, após centrifugação (**A**) e estresse térmico (**B**) (n=3)

A separação de fase da **F3** e **F4** ocorreu devido a presença de maior proporção da fase oleosa nas formulações, o que desestabilizou o sistema micelar do gel-creme, provocando a coalescência entre as micelas e a consequente separação de fase (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Num estudo realizado por Chen e Taio (2005) foram avaliados diferentes variáveis para a estabilidade de uma emulsão, por exemplo: a razão de óleo/água, entre outros. A emulsão de estudo foi realizada com o emulsificante (monooleato de sorbitan) e óleo diesel, para a formação de uma pasta de carvão que é utilizada como alternativa ao combustível, por ser menos poluente e melhorar a eficiência de combustão. Os resultados demonstraram que conforme a razão de óleo/água diminui, a estabilidade se eleva, sendo a razão 1:1 a de melhor resultado. O que comprovou que quanto maior a carga oleosa da formulação, mais instável será o sistema emulsionado, como ocorreu com as formulações **F3** e **F4**.

5.3.2. TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA

As formulações aprovadas no Teste de Estabilidade Preliminar foram submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada, conforme descrito no item 4.2.5.2. Os resultados se encontram nas **Tabelas 9 e 10**.

As concentrações de vitamina D₃ foram calculadas por meio da **Equação 4**, que foi realizado durante a validação do método analítico.

Tabela 9- Teste de Estabilidade Acelerada para a Formulação 1 (**F1**), com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol

Tempos e condições de armazenamento	Cor	Odor	Aspecto	Valor de pH	Concentração da vitamina D ₃ (µg/mL)
t₀ – tempo inicial	Amarela	Odor característico de etanol	Gel creme opalescente e com brilho	6,26 ± 0,03 ^{AB}	1,05 ± 0,03 ^A
t₁₂ – ciclos (45,0 ± 2,0 °C e -5,0 ± 2,0 °C)	Amarela	Odor característico de etanol	Gel creme opalescente e com brilho	6,37 ± 0,15 ^A	0,58 ± 0,44 ^A
t₁₅ – temperatura ambiente (25,0 ± 2,0 °C)	Amarela	Odor característico de etanol	Gel creme opalescente e com brilho	6,24 ± 0,01 ^{AB}	0,72 ± 0,01 ^A
t₁₅ – estufa (45,0 ± 2,0 °C)	Amarela	Odor característico de etanol	Gel creme opalescente e com brilho	6,12 ± 0,02 ^B	0,86 ± 0,05 ^A
t₁₅ – geladeira (5,0 ± 2,0 °C)	Amarela	Odor característico de etanol	Gel creme opalescente e com brilho	6,28 ± 0,02 ^{AB}	0,77 ± 0,05 ^A

Legenda: t₀: condição em tempo inicial, após 48 horas do preparo; t₁₂: condição após 12 dias; t₁₅: condição após 15 dias.

O valor de pH e a concentração de vitamina D₃ (µg/mL) são expressos como média ± desvio padrão e as letras em sobrescrito, representam o resultado da análise estatística (ANOVA seguido de teste de Tukey com nível de significância de 0,05).

Letras diferentes na mesma coluna são resultados considerados estatisticamente diferentes entre si.

Tabela 10- Teste de Estabilidade Acelerada para a Formulação 2 (**F2**), com 20% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol

Tempos e condições de armazenamento	Cor	Odor	Aspecto	Valor de pH	Concentração da vitamina D ₃ (µg/mL)
t₀ – tempo inicial	Amarela	Odor característico de etanol	Gel creme opalescente e com brilho	6,10 ± 0,01 ^A	0,97 ± 0,02 ^A
t₁₂ – ciclos (45,0 ± 2,0 °C e -5,0 ± 2,0 °C)	Amarela	Odor característico de etanol	Gel creme opalescente e com brilho	6,06 ± 0,03 ^{AB}	0,85 ± 0,05 ^A
t₁₅ – temperatura ambiente (25,0 ± 2,0 °C)	Amarela	Odor característico de etanol	Gel creme opalescente e com brilho	6,01 ± 0,01 ^B	0,58 ± 0,43 ^A
t₁₅ – estufa (45,0 ± 2,0 °C)	Amarela	Odor característico de etanol	Gel creme opalescente e com brilho	5,89 ± 0,02 ^C	0,91 ± 0,04 ^A
t₁₅ – geladeira (5,0 ± 2,0 °C)	Amarela	Odor característico de etanol	Gel creme opalescente e com brilho	5,94 ± 0,03 ^C	0,79 ± 0,06 ^A

Legenda: **t₀**: condição em tempo inicial, após 48 horas do preparo; **t₁₂**: condição após 12 dias; **t₁₅**: condição após 15 dias.

O valor de pH e a concentração de vitamina D₃ (µg/mL) são expressos como média ± desvio padrão e as letras em sobrescrito, representam o resultado da análise estatística (ANOVA seguido de teste de Tukey com nível de significância de 0,05).

Letras diferentes na mesma coluna são resultados considerados estatisticamente diferentes entre si.

As **Tabelas 9 e 10** demonstraram que as características organolépticas (cor, odor e aspecto) não tiveram alterações visuais e olfativas com o decorrer do Teste de Estabilidade Acelerada. Na **Figura 27**, verificam-se o aspecto e cor inicial das formulações testadas (48 horas do preparo) e as mesmas características permaneceram inalteradas até o final do teste. Este foi um bom resultado, pois foi um indicativo de que as formulações possuíram uma tendência de estabilidade após serem submetidas a condições extremas de temperatura, que normalmente apresentam variações de cor e odor, por ocorrer reações de degradação em temperaturas mais elevadas (CADWALLADER, 1989; MAIA, 2002).

Figura 27- Aspecto e cor das formulações testadas no tempo inicial (t_0)

Fonte: Costa (2017).

O teste de análise de variância (ANOVA) avaliou o valor de pH das duas formulações testadas e foram consideradas estatisticamente diferentes entre as condições avaliadas, com o valor de p menor que o nível de significância 0,05; sendo os valores $p = 0,018$ e $0,000$ para **F1** e **F2**, respectivamente. Esta diferença estatística não alterou o produto, pois a formulação continuou biocompatível com a pele, com valores dentro do intervalo tolerável à pele, de 4,5 a 6,5 (MEDEIROS et al., 2009).

O teste de Tukey para o valor de pH da **F1**, demonstrou que todas as condições foram semelhantes estatisticamente ao tempo inicial, conforme descrito na **Tabela 9**. As respostas avaliadas nas condições de armazenamento que mais se assemelharam ao tempo inicial foram: Geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C) e Temperatura Ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C). Portanto podemos considerar estas condições mais adequadas ao armazenamento, de acordo com este teste, para o valor de pH.

Na **Tabela 10**, observou-se por meio do teste de Tukey, que a resposta da variável no tempo inicial foi semelhante estatisticamente apenas com a condição de Ciclo ($45,0 \pm 2,0$ °C e $-5,0 \pm 2,0$ °C), demonstrando um bom indicativo de estabilidade para a **F2**, pois esta condição foi a mais agressiva empregada na avaliação da estabilidade, que alternam ciclos de congelamento e estufa. Apesar da diferença estatística das outras condições avaliadas para a **F2**, a variação de pH foi pequena para as duas formulações, o que demonstrou que foi uma condição rígida de avaliação (**Figura 28**).

Figura 28- Comparação das Formulações 1 e 2 frente ao valor de pH, avaliado durante o Teste de Estabilidade Acelerada (n=3)

Legenda: *: valores diferentes estatisticamente em relação ao t0 ($p < 0,05$).

A vitamina D₃ durante o Teste de Estabilidade se apresentou estável, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre as condições avaliadas, com o valor de p 0,124 para a **F1** e 0,209 para a **F2**, valores maiores que o nível de significância (0,05), de acordo com o teste ANOVA seguido do teste de Tukey, conforme **Tabelas 9** e **10**.

Apesar do estudo estatístico indicar que não houve diferença da concentração de vitamina D₃, percebeu-se uma tendência na diminuição do ingrediente ativo nas condições avaliadas para as duas formulações. Esperava-se que na condição de Geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C), a diminuição da concentração da vitamina D₃ fosse menor, porém permaneceu próxima a Temperatura Ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) para a **F1**, mas para a **F2** o esperado aconteceu. A condição da Estufa ($45,0 \pm 2,0$ °C) obteve um resultado positivo, com valores maiores do que a Geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C), o que indica

um bom perfil de estabilidade para as duas formulações, pois normalmente a condição de elevada temperatura propicia redução de teor do ingrediente ativo (**Figura 29**) (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Figura 29- Comparação das Formulações 1 e 2 frente a concentração da vitamina D₃, avaliado durante o Teste de Estabilidade Acelerada (n=3)

A vitamina D₃, na presença do calor, apresenta reação de isomerização térmica reversível e volta a ser a molécula pré-vitamina D₃, que é a sua precursora. Isto pode explicar o fato de que na condição de Estufa (45,0 ± 2,0 °C) os valores obtidos terem sido maiores do que nas outras condições. Esta reação de isomerização deve ter ocorrido em vez de acontecer às reações de degradação (**Figura 30**) (BALLARD et al., 2007).

Figura 30- Formação da pré-vitamina D₃ e vitamina D₃ através do precursor 7-deidrocolesterol

Fonte: Ballard e colaboradores (2007).

Outra possível explicação pode ser pela presença de antioxidantes na formulação, pois auxiliam na prevenção das reações de degradação ao longo do tempo, conforme foi descrito na patente do Laboratório Abbott (1995) que demonstrou melhorar a estabilidade da vitamina D em produtos nutricionais líquidos com a adição de pelo menos 300 mg/L da vitamina C (ABBOTT LABORATORIES, 1995).

A **F1** obteve um perfil mais coerente em relação a **F2**. Os valores de pH foram maiores e iguais estatisticamente ao t_0 . A concentração de vitamina D₃ obteve resultados esperados, com a sua menor concentração na condição de Ciclo ($45,0 \pm 2,0$ °C e $-5,0 \pm 2,0$ °C), que é a mais agressiva.

5.3.3. TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL

A Formulação 1 (**F1**) foi escolhida para ser avaliada no Teste de Estabilidade Normal, por ter obtido um perfil mais coerente em relação a **F2** e também, por ser a formulação de maior concentração dos promotores de permeação. Os resultados estão apresentados nas **Tabelas 11 e 12**.

Tabela 11- Características organolépticas da Formulação 1 (**F1**) com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol, durante o Teste de Estabilidade Normal

Aparência da formulação					Características organolépticas		
Tempo (dias)	Temperatura Ambiente *				Cor	Odor	Aspecto
t_0					AmCl	OdEt	GelCr OpBr
	Temperatura ambiente * ($25,0 \pm 2,0$ °C)	Radiação luminosa ** ($25,0 \pm 2,0$ °C)	Estufa ($40,0 \pm 2,0$ °C)	Geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C)	Cor	Odor	Aspecto
t_7					AmCl Rad: Br	OdEt Rad: +	GelCr OpBr
t_{15}					AmCl Rad: Br	OdEt Rad: +	GelCr OpBr
t_{60}					AmCl Rad: Br	OdEt Rad: +	GelCr OpBr
t_{90}					AmCl Rad: Br	OdEt Rad: +	GelCr OpBr

Legenda: t_0 : tempo inicial, após 48 horas do preparo; t_7 : 7 dias; t_{15} : 15 dias; t_{60} : 60 dias; t_{90} : 90 dias, *:ao abrigo de luz; **: exposta à luz solar indireta; **AmCl**: amarelo claro; **Rad**: radiação luminosa; **Br**: branco; **OdEt**: odor característico de etanol; +: odor mais acentuado; **GelCr**: gel creme; **OpBr**: opalescente e com brilho.

Tabela 12- Valor de pH e concentração da vitamina D₃ durante o Teste de Estabilidade Normal para a Formulação 1 (F1), com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol

pH					Concentração da vitamina D ₃ (µg/mL)			
Tempo	Temperatura ambiente *				Temperatura ambiente *			
t ₀	6,37 ± 0,02 ^A				0,58 ± 0,11 ^A			
	Temperatura ambiente * (25,0 ± 2,0 °C)	Radiação luminosa ** (25,0 ± 2,0 °C)	Estufa (40,0 ± 2,0 °C)	Geladeira (5,0 ± 2,0 °C)	Temperatura ambiente * (25,0 ± 2,0 °C)	Radiação luminosa ** (25,0 ± 2,0 °C)	Estufa (40,0 ± 2,0 °C)	Geladeira (5,0 ± 2,0 °C)
t ₇	6,16 ± 0,05 ^A	6,26 ± 0,22 ^A	6,39 ± 0,24 ^A	6,41 ± 0,26 ^A	0,58 ± 0,01 ^A	0,39 ± 0,01 ^C	0,55 ± 0,00 ^{AB}	0,44 ± 0,02 ^{BC}
t ₁₅	6,54 ± 0,25 ^A	6,22 ± 0,07 ^A	6,15 ± 0,04 ^A	6,26 ± 0,27 ^A	0,44 ± 0,01 ^{AB}	0,32 ± 0,03 ^B	0,47 ± 0,06 ^{AB}	0,43 ± 0,01 ^{AB}
t ₆₀	6,22 ± 0,04 ^{AB}	5,98 ± 0,03 ^B	5,98 ± 0,24 ^B	6,19 ± 0,05 ^{AB}	0,49 ± 0,02 ^A	0,10 ± 0,02 ^B	0,47 ± 0,02 ^A	0,47 ± 0,02 ^A
t ₉₀	6,45 ± 0,14 ^A	5,77 ± 0,04 ^B	6,21 ± 0,13 ^A	6,33 ± 0,13 ^A	0,49 ± 0,01 ^A	0,06 ± 0,08 ^B	0,48 ± 0,01 ^A	0,50 ± 0,01 ^A

Legenda: t₀: tempo inicial, após 48 horas do preparo; t₇: 7 dias; t₁₅: 15 dias; t₆₀: 60 dias; t₉₀: 90 dias; *: ao abrigo de luz; **: exposta à luz solar indireta.

O valor de pH e a concentração de vitamina D₃ (µg/mL) são expressos como média ± desvio padrão e as letras em sobrescrito, representam o resultado da análise estatística (ANOVA seguido de teste de Tukey com nível de significância de 0,05). Letras diferentes na mesma linha são resultados considerados estatisticamente diferentes entre si.

Valores de ρ para o pH nos tempos t₇, t₁₅, t₆₀ e t₉₀: 0,472; 0,103; 0,007; 0,000, respectivamente.

Valores de ρ para a concentração da vitamina D₃ nos tempos t₇, t₁₅, t₆₀ e t₉₀: 0,003; 0,004; 0,000; 0,000, respectivamente.

Observou-se na **Tabela 11** que o aspecto de gel creme opalescente e com brilho, permaneceu inalterado durante todo o Teste de Estabilidade Normal, para todas as condições analisadas. Nas condições [Temperatura Ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), Estufa ($40,0 \pm 2,0$ °C) e Geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C)], as características organolépticas (cor e odor), não apresentaram alterações importantes no decorrer do teste, mantendo-se a cor amarela clara e o odor característico de etanol. Porém, na condição de Radiação Luminosa ($25,0 \pm 2,0$ °C), as mesmas apresentaram alterações. A cor amarela clara do tempo inicial (48 horas após o preparo) tornou-se branca e o odor característico de etanol ficou mais acentuado para esta formulação nos tempos (t_7 a t_{90}).

A alteração de cor e odor da formulação durante o Teste de Estabilidade ocorre com maior frequência na condição de Radiação Luminosa ($25,0 \pm 2,0$ °C), devido a reações de degradação que possam acontecer durante a exposição à luz (BRASIL, 2004).

Na **Tabela 12**, a concentração da vitamina D₃ na condição de Radiação Luminosa ($25,0 \pm 2,0$ °C) decaiu de 0,58 para 0,06 µg/mL em 90 dias (89,66% de perda), confirmando a degradação da mesma frente à exposição solar indireta e prolongada (fotossensível). Esta condição teve diferenças estatísticas com as demais em todos os tempos de análise, para a concentração e para o valor de pH a diferença estatística ocorreu somente após 60 dias. Portanto, pode ser considerada a condição menos favorável de armazenamento da formulação em questão e por isso é indicado armazenar a formulação ao abrigo da luz, em frascos de vidro âmbar, por exemplo.

Hemery e colaboradores (2015) estudaram a influência da exposição solar e do estresse oxidativo em óleos de soja fortificados com as vitaminas A e D₃, durante dois meses em condições de armazenamento usuais do comércio, antes de vender aos consumidores. Concluiu-se que a exposição solar causa maiores perdas da vitamina D₃ em relação à condição de armazenamento ao abrigo de luz, aproximadamente 60% comparado a 17%, respectivamente, e sugeriram embalagens opacas, vidro ou com muitas camadas para prevenir a exposição à luz.

As outras condições [Temperatura Ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), Estufa ($40,0 \pm 2,0$ °C) e Geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C)] foram consideradas sem diferenças estatísticas entre si no geral e na Geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C) somente no t_7 obteve diferença estatística com a concentração da vitamina D₃ inicial. No período de sete dias, a melhor condição de armazenamento foi a Temperatura Ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), com nenhuma perda da concentração da vitamina D₃, mantendo-se semelhante a concentração inicial. Para o período de 15 dias, a Estufa ($40,0 \pm 2,0$ °C) foi a condição com menor perda, com os valores de 18,97%. Em 60 dias, a condição de Estufa ($40,0 \pm 2,0$ °C) e Geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C), obtiveram valores iguais de perda da concentração da vitamina D₃, de 18,97%. Após 90 dias, a menor perda da concentração, com 13,79% foi a formulação armazenada na Geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C). Com isso explicou-se que a melhor condição em longo prazo de armazenamento foi a Geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C) (**Tabela 12 e Figura 31**).

De acordo com Chen e colaboradores (1965) a degradação da vitamina D₃ ocorreu em temperatura elevada (37°C), temperatura ambiente (25°C), na presença da radiação UV e em solventes aquosos. A mesma permaneceu estável em temperatura mais baixa (4°C), ao abrigo de luz e em solventes orgânicos, tais como etanol, metanol, isooctano e etc.

Figura 31- Comparação das condições de armazenamento da Formulação 1, frente a concentração da vitamina D₃, durante o Teste de Estabilidade Normal ($t_0 = 48h$ do preparo) ($n=3$)

Legenda: *: valores diferentes estatisticamente em relação ao t_0 ($p < 0,05$).

Os valores de pH para todas as condições avaliadas foram considerados sem diferença estatística entre si nos primeiros 15 dias de teste. Após 60 dias as condições de radiação luminosa e estufa obtiveram diferenças estatísticas e em 90 dias somente a radiação luminosa permaneceu com diferença estatística. As faixas de valores de pH ficaram entre 5,8 a 6,5, que é dentro do limite aceitável para a pele (pH 4,5 a 6,5) (**Tabela 12 e Figura 32**) (MEDEIROS et al., 2009).

Figura 32- Comparação das condições de armazenamento da Formulação 1, frente ao valor de pH, durante o Teste de Estabilidade Normal ($t_0 = 48h$ do preparo) ($n=3$)

Legenda: *: valores diferentes estatisticamente em relação ao t_0 ($p < 0,05$)

5.4. TESTE DE SEGURANÇA

Com o intuito de verificar a segurança das formulações de estudo, foi realizada a avaliação do potencial de irritação pelo método HET-CAM.

5.4.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO (HET-CAM)

A forma de análise do experimento, segundo a United States (2010) é por meio da visualização dos efeitos ocorridos nos vasos sanguíneos, tais como:

- Lise vascular: quando ocorre a desintegração dos vasos sanguíneos
- Hemorragia: sangramento dos vasos sanguíneos
- Coagulação: denaturação proteica intra-vascular e extra-vascular.

A classificação final do grau de irritação ocorre por meio da somatória de uma pontuação atribuída aos efeitos ocorridos em determinados tempos, denominada *Irritation Score* (IS), conforme foi mostrado no item 4.2.6.1. nas **Tabelas 3 e 4**.

Os resultados são apresentados na forma de imagens retiradas dos filmes realizados durante o experimento, para poder observar os efeitos ocorridos nos vasos sanguíneos nos tempos 0, 0,5, 2 e 5 minutos.

Foram utilizados dois controles positivos, o hidróxido de sódio (NaOH) e o laurilsulfato de sódio (LSS), considerados pela literatura científica como muito irritantes com o IS de aproximadamente 19 e 10, respectivamente (UNITED STATES, 2010).

Como podemos observar na **Figura 33**, em 30 seg ocorreram os efeitos vasculares de coagulação e hemorragia, e em 2 min aconteceu a desintegração dos vasos sanguíneos (lise). Por isto, o IS ficou com o valor final de 19, sendo atribuído aos efeitos de coagulação e hemorragia, em 30 seg, 9 e 7 pontos, respectivamente, e 3 pontos para a lise, em 2 minutos. Portanto, a classificação final do NaOH foi fortemente irritante, condizente com a literatura científica (UNITED STATES, 2010).

Figura 33– Controle positivo no teste HET-CAM com NaOH 1M: **a)** tempo zero: antes de colocar a amostra, **b)** 0,5 min, **c)** 2 min, **d)** 5 min

A **Figura 34** apresenta o resultado do segundo controle positivo utilizado no teste. O Laurilsulfato de Sódio (LSS) foi classificado como fortemente irritante, pois recebeu a pontuação IS de valor 10. Ocorreram os efeitos vasculares de lise em 30 segundos e hemorragia em 2 min, com valores IS de 5 e 5, respectivamente. Este resultado foi corroborado pela literatura científica (UNITED STATES, 2010).

Figura 34– Controle positivo no teste HET-CAM com o LSS: **a)** tempo zero: antes de colocar a amostra, **b)** 0,5 min, **c)** 2 min, **d)** 5 min

O controle negativo utilizado foi o cloreto de sódio (NaCl), considerado não irritante e com IS 0. O resultado obtido da análise do mesmo confirmou a literatura, pois não foi observado nenhum efeito vascular, ficando com o IS 0 e a classificação de não irritante (**Figura 35**) (UNITED STATES, 2010).

Figura 35– Controle negativo no teste HET-CAM com o NaCl: **a)** tempo zero: antes de colocar a amostra, **b)** 0,5 min, **c)** 2 min, **d)** 5 min

As **Formulações 1** e **2** foram testadas quando a sua segurança por meio do teste HET-CAM, em triplicata, como apresentam as **Figuras 36** e **37**, respectivamente. Ambas obtiveram o IS 0, pois nenhum efeito vascular foi observado ao longo dos 5 minutos e por isso foram classificadas como não irritantes.

A maioria dos componentes das formulações são consideradas não irritantes. O etanol é levemente irritante e o EDTA fortemente irritante, porém as quantidades de uso nas formulações são consideradas pequenas, tais como: 8%p/p e 0,1%p/p, respectivamente. O que corrobora com o resultado da formulação (LUEPKE, 1985; OHNO et al., 1999; SPIELMANN et al., 1991).

Portanto, para a finalidade de uso, as formulações foram consideradas seguras.

Figura 36– Formulação 1 (F1), com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol no teste HET-CAM: **a)** tempo zero: antes de colocar a amostra, **b)** 0,5 min, **c)** 2 min, **d)** 5 min

Figura 37– Formulação 2 (F2), com 20% p/p da fase oleosa e 10% p/p do etoxidiglicol no teste HET-CAM: **a)** tempo zero: antes de colocar a amostra, **b)** 0,5 min, **c)** 2 min, **d)** 5 min

5.5. TESTE DE EFICÁCIA

5.5.1. SOLUBILIDADE DA VITAMINA D₃

A *sink condition* é a capacidade da concentração máxima obtida durante o experimento ser solúvel no líquido receptor e não deve exceder de 10 a 30% da solubilidade máxima do ingrediente ativo no líquido receptor (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014).

A concentração máxima da vitamina D₃ que poderá ser encontrada durante o experimento é de aproximadamente 2,0 µg/mL, caso permeie 100%. Por isto a solubilidade máxima da vitamina D₃ no líquido receptor deve ter valores maiores que 7,0 µg/mL.

A **Figura 38** demonstra que o líquido receptor que obteve maior solubilização da vitamina D₃ (*sink condition*) foi o PBS com 50% de etanol.

Figura 38– Solubilidade da vitamina D₃ nos líquidos receptores, com a variação da concentração de etanol (40% e 50%) ao longo de 24 horas com exposição à luz (n=3)

A **Figura 38** demonstra um decaimento da concentração da vitamina D₃ no decorrer do tempo e nas alíquotas dos tempos de 22 e 24 horas, atingiu o valor de zero. Isto provavelmente ocorreu devido à vitamina D₃ ser fotossensível e reações de degradação ao longo do experimento podem ter ocorrido (BALLARD et al., 2007).

Com o intuito de confirmar a fotossensibilidade da vitamina D₃, um novo teste foi feito e deixado ao abrigo de luz por 24 horas. A **Figura 39** demonstra que não

houve completa degradação da vitamina D₃, como no experimento anterior, sendo então possível quantificar o ingrediente ativo em 24 horas, desde que protegido da luz. A concentração de 50% de etanol em PBS continuou a condição de *sink condition*, sendo 38,4 vezes maior a solubilidade da vitamina D₃ em relação ao PBS com etanol 40% em 24 horas.

Figura 39– Solubilidade da vitamina D₃ nos líquidos receptores, com a variação da concentração de etanol (40% e 50%) ao longo de 24 horas ao abrigo de luz (n=3)

O líquido receptor escolhido para a realização do teste de retenção e permeação cutânea foi o PBS com 50% de etanol. Apesar de o etanol favorecer a permeação cutânea, algumas referências comentam que esta concentração de etanol é a mais comum quando se escolhe a adição de solventes no líquido receptor, com o intuito de solubilizar um ingrediente ativo lipofílico (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2011; SAUNDERS; PUGH, 2002).

A integridade da pele não pode ser afetada pelo líquido receptor e como houve a adição de 50% de etanol no PBS, fez-se necessária a avaliação da perda de água transepidérmica (TEWL) para verificar o potencial de comprometimento da barreira cutânea do mesmo. Para isto, foi realizado um experimento em célula de difusão vertical com pele sem a adição de formulação (branco) por 24 horas e avaliou-se a integridade da pele no início e no final do teste. Os resultados estão demonstrados na **Figura 40**.

Figura 40– Valor inicial (0h) e final (24h) de perda de água transepidermica (TEWL) da pele proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea (n=15)

A integridade da pele não foi afetada pelo líquido receptor com 50% de etanol, pois não houve um aumento do valor de TEWL, o que significaria um comprometimento da barreira cutânea (GIOIA; CELLENO, 2002).

Pelo teste estatístico (teste t pareado) o valor de p foi de 0,439, o que mostrou que não houve diferença estatística entre os tempos inicial e final. Portanto, nas condições deste ensaio, o seu uso está autorizado para a realização do teste de retenção e permeação cutânea.

5.5.2. VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARCIAL

5.5.2.1. ESPECIFICIDADE

A pesquisa de interferentes foi realizada com a finalidade de confirmar a especificidade da vitamina D₃ nos diferentes meios utilizados durante o experimento. Foram testadas as especificidades frente ao líquido receptor, (PBS com etanol 50%), nos meios de etanol com os cotonetes, fitas adesivas, epiderme e derme, na ausência e presença de vitamina D₃ (**Figura 41 a 48**).

Figura 41– Cromatograma do líquido receptor PBS com 50% de etanol, realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea

Figura 42– Cromatograma do líquido receptor PBS com 50% de etanol e com adição da vitamina D₃ (indicada na seta), realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea

Figura 43—Cromatograma do etanol na presença de cotonetes, realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16 min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea

Figura 44—Cromatograma do etanol na presença de cotonetes e adição de vitamina D₃ (indicada na seta), realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea

Figura 45—Cromatograma do etanol na presença de fitas adesivas extraídas da pele, realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea

Figura 46—Cromatograma do etanol na presença de fitas adesivas extraídas da pele e adição da vitamina D₃ (indicada pela seta), realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea

Figura 47—Cromatograma do etanol na presença da epiderme e derme, realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea

Figura 48—Cromatograma do etanol na presença da epiderme, derme e adição da vitamina D₃ (indicada na seta), realizado em CLAE (fase móvel metanol:água (98:2); coluna C18; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 40 µL; temperatura 40 °C; detecção 265 nm e corrida de 16min) proveniente do ensaio branco de retenção e permeação cutânea

A especificidade do método foi confirmada para todos os meios testados, pois nenhum pico ficou retido no mesmo tempo de retenção da vitamina D₃ em aproximadamente 11 minutos.

5.5.2.2. RECUPERAÇÃO DO PADRÃO

A recuperação do padrão foi calculada de acordo com a **Equação 3** do item 4.2.7.1.2.2. e os resultados encontrados estão descritos na **Tabela 13**.

Tabela 13- Recuperação do padrão de vitamina D₃ adicionado em etanol com cotonetes, fitas adesivas e epiderme e derme, provenientes do ensaio branco de retenção e permeação cutânea (n=3)

Concentrações teóricas (µg/mL)	Etanol com cotonetes			Etanol com fitas adesivas			Etanol com epiderme e derme		
	C média ± dp (µg/mL)	R _c (%)	R _c médio (%)	C média ± dp (µg/mL)	R _c (%)	R _c médio (%)	C média ± dp (µg/mL)	R _c (%)	R _c médio (%)
0,48	0,486 ± 0,006	101,22		0,493±0,008	102,80		0,499±0,004	104,06	
1,00	1,050 ± 0,009	104,98	103,83	1,034 ±0,007	103,42	103,91	1,044 ±0,007	104,37	103,84
1,50	1,580 ± 0,001	105,31		1,582 ± 0,009	105,50		1,546 ± 0,006	103,09	

Legenda: C média ± dp: concentração média de três concentrações calculadas pela equação de reta ($y = 90909x - 9,1154$) da curva de linearidade, com coeficiente de correlação linear (R^2) 0,9991 e desvio padrão; R_c: recuperação do padrão; R_c médio: média da recuperação do padrão.

As concentrações teóricas de vitamina D₃ adicionadas nos meios com etanol e presença de cotonetes, fitas adesivas e epiderme e derme foi recuperada com valores médios próximos de 100%, tais como: 103,83; 103,91 e 103,84%, respectivamente. Isto significa que o processo de extração está adequado.

5.5.3. RETENÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA

O teste de retenção e permeação cutânea da Formulação 1 (**F1**) e do controle foi realizado e os resultados estão demonstrados na **Tabela 14**.

Tabela 14- Retenção e permeação cutânea da vitamina D₃, nos tempos de 1, 4 e 24 horas para o controle e a Formulação 1 (**F1**) (n=3)

	1 hora (µg/cm ²)		4 horas (µg/cm ²)		24 horas (µg/cm ²)	
	F1	Controle	F1	Controle	F1	Controle
SP	6,99 ± 0,42	5,77 ± 0,25	5,85 ± 1,43	5,83 ± 0,24	6,21 ± 0,58	5,43 ± 0,12
EC	n.d	0,10 ± 0,18	n.d	0,10 ± 0,18	n.d	n.d
E+D	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,12 ± 0,22
LR	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Legenda: resultados apresentados com valores médios e desvio padrão; **n.d.**: não detectável, abaixo do limite de detecção (20ng/mL); **SP**: superfície da pele; **EC**: estrato córneo; **E+D**: epiderme e derme; **LR**: líquido receptor.

O teste t de duas médias foi utilizado para avaliar a diferença estatística da **F1** com o controle na superfície da pele em cada tempo. Houve diferença estatística somente na primeira hora ($p = 0,023$), pois em 4 e 24 horas não houveram diferenças estatísticas da **F1** e do controle com valores de p 0,989 e 0,152, respectivamente.

A **F1** demonstrou uma tendência em permanecer na superfície da pele durante o período de 24 horas, demonstrando-se, segura para o uso tópico. Provavelmente, por ser lipofílica, a mesma obteve uma afinidade maior com a fase oleosa da formulação o que dificultou a sua liberação. A **Tabela 15** mostra que a recuperação da vitamina D₃ aplicada no compartimento doador obteve valores próximos aos 100% para a superfície da pele, o que comprova a permanência da mesma na formulação.

Tabela 15- Recuperação da vitamina D₃, nos tempos de 1, 4 e 24 horas para a Formulação 1 (**F1**), provenientes do ensaio de retenção e permeação cutânea (n=3)

	F1		Recuperação (%)			
	Form. (g)	Vit. D (µg)	SP	EC	E+D	LR
1h	0,33 ± 0,02	8,13 ± 0,51	100,79 ± 8,83	n.d	n.d	n.d
4h	0,29 ± 0,07	7,36 ± 1,84	93,03 ± 4,22	n.d	n.d	n.d
24h	0,32 ± 0,02	7,97 ± 0,49	90,98 ± 2,93	n.d	n.d	n.d

Legenda: resultados apresentados com valores médios e desvio padrão; **n.d.**: não detectável, abaixo do limite de detecção (20ng/mL); **Form.**: quantidade aplicada no compartimento doador; **Vit. D**: quantidade de vitamina D₃ presente na formulação; **SP**: superfície da pele; **EC**: estrato córneo; **E+D**: epiderme e derme; **LR**: líquido receptor.

O resultado do controle foi diferente, houve retenção cutânea no estrato córneo para os tempos (1 e 4 h) e retenção na epiderme e derme em 24 h. Os valores foram: 1,58% e 1,60% de vitamina D₃ foi encontrada no estrato córneo nos tempos de 1 e 4 horas, respectivamente. Em 24 horas, 1,77% da mesma foi encontrada na epiderme e derme.

O controle possui apenas fase aquosa, pois foram retirados os promotores de permeação primários (lecitina de soja, palmitato de isopropila e etoxietilenoglicol), ficando somente um gel com vitamina D₃ solubilizado em álcool de cereais e propilenoglicol, que são os promotores secundários. Este fato sugere diferença de resposta da **F1** com o controle, pois a vitamina D₃ não possui afinidade com a fase aquosa do gel e por isto, acredita-se que foi liberada mais facilmente, ficando retida no estrato córneo até 4 horas e chegando à epiderme e derme em 24 horas.

A recuperação do controle obteve valor médio de 87% (**Tabela 16**) e demonstra que os valores de recuperação foram mais baixos do que na **F1**, o que sugere que a vitamina D₃ foi liberada do gel controle.

Tabela 16- Recuperação da vitamina D₃, nos tempos de 1, 4 e 24 horas para o controle, provenientes do ensaio de retenção e permeação cutânea (n=3)

	Controle		Recuperação (%)			
	Form. (g)	Vit. D (µg)	SP	EC	E+D	LR
1h	0,31 ± 0,00	7,66 ± 0,11	88,11 ± 4,49	1,58 ± 2,78	n.d	n.d
4h	0,30 ± 0,01	7,58 ± 0,14	89,98 ± 2,71	1,60 ± 2,82	n.d	n.d
24h	0,32 ± 0,01	7,95 ± 0,29	79,99 ± 2,68	n.d	1,77 ± 3,11	n.d

Legenda: resultados apresentados com valores médios e desvio padrão; **n.d.:** não detectável, abaixo do limite de detecção (20ng/mL); **Form.:** quantidade aplicada da formulação no compartimento doador; **Vit. D:** quantidade de vitamina D₃ presente na formulação; **SP:** superfície da pele; **EC:** estrato córneo; **E+D:** epiderme e derme; **LR:** líquido receptor.

Alguns testes prévios a este foram realizados, com exposição à luz e com dose finita. Houve uma baixa recuperação, com valores menores que 50% quando exposto a luz e a quantidade de vitamina D₃ na dose finita, foi considerada insuficiente. Por este motivo neste experimento, foi necessário proteger da luz, para evitar a degradação da vitamina D₃ e possibilitar valores maiores de recuperação. Como também a mudança para dose infinita, garantindo maiores concentrações de vitamina D₃.

Avaliou-se também a perda de água transepidermica (TEWL) para a **F1** e o controle, no decorrer do experimento para verificar a integridade da pele (**Figuras 49 e 50**).

Figura 49– Valores de perda de água transepidermica (TEWL) durante o experimento para a Formulação (**F1**) com 20% p/p da fase oleosa e 20% p/p do etoxidiglicol, nos tempos iniciais (t0) e finais (1, 4 e 24h) (n=9)

Legenda: *: valores diferentes estatisticamente em relação ao t0 ($p < 0,05$)

Figura 50– Valores de perda de água transepidermica (TEWL) durante o experimento para o controle sem os promotores de permeação primários, nos tempos iniciais (t0) e finais (1, 4 e 24h) (n=9)

Legenda: *: valores diferentes estatisticamente em relação ao t0 ($p < 0,05$)

O teste t pareado foi realizado para comparar os valores iniciais e finais de TEWL. Houve diferença estatística em 1 e 4 horas para a **F1** ($p=0,000$) para os dois tempos e em 24 horas ficou estatisticamente igual ($p=0,052$). No controle o inverso ocorreu, somente na primeira hora que foi considerada igual estatisticamente ($p=0,198$), em 4 e 24 horas o valor de p ficou igual a zero, o que significa que foi diferente estatisticamente.

Como demonstra a **Figura 49**, a **F1** obteve valores iniciais próximos a $7,5 \text{ g/h m}^2$ e os valores finais aumentaram em relação ao basal. O TEWL foi um pouco maior que 10 g/h m^2 na primeira hora, o que sugere que a barreira cutânea foi comprometida. Isto provavelmente ocorreu por efeito imediato dos promotores de permeação primários da formulação (lecitina de soja, palmitato de isopropila e etoxietilenoglicol) e após 4 horas os componentes oleosos da mesma mostraram um efeito de hidratação até 24 horas, com a diminuição dos valores de TEWL (GUTH et al., 2015; DE PAEPE et al., 2001).

O controle obteve um comportamento diferente da **F1**, pois em uma hora os valores iniciais e finais ficaram próximos e considerados estatisticamente iguais, sugerindo uma hidratação temporária da pele pelo gel. Após 4 horas de experimento, os valores foram maiores que o limite de comprometimento da barreira cutânea (10 g/h m^2), o que sugere que os promotores de permeação secundários presentes no controle (álcool de cereais e propilenoglicol) favoreceram a retenção cutânea da vitamina D₃ ao longo do experimento, por comprometer a barreira cutânea (**Figura 50**) (GUTH et al., 2015; DE PAEPE et al., 2001).

É possível visualizar nas **Figuras 49 e 50**, que a pele em 24 horas possui uma tendência em se aproximar aos valores basais. Isto pode ser um mecanismo de homeostasia da pele, que apesar da sua barreira cutânea ser comprometida, ela tende a um equilíbrio, reestruturando a mesma em pelo menos 24 horas.

Alguns estudos foram encontrados na literatura científica sobre a avaliação da permeação cutânea de derivados da vitamina D₃ para o uso tópico no tratamento de psoríase. Como o Ben-Shabat e colaboradores (2005) que estudaram a permeação cutânea em pele de porco de um análogo da vitamina D₃, calcipotriol isolado e conjugado com ácidos graxos poliinsaturados: ácido linoleico (ômega-3) e ácido gamalinolênico (ômega-6), visando eficácia no tratamento de psoríase. Estes complexos foram capazes de aumentar a permeação cutânea e inibir o crescimento

de queratinócitos em culturas celulares. O ômega-3 possibilitou maior permeação que o ômega-6 e o calcipotriol sozinho, não permeou. O aumento da permeação cutânea do calcipotriol para a associação com o ômega-3, pode ser justificada pela estrutura tridimensional da molécula, que é mais linear, flexível e menos volumosa que a do ômega-6. A associação foi benéfica, por alterar as características físico-químicas da estrutura do derivado da vitamina D, aumentando a lipofilicidade.

Yamaguchi e colaboradores (2006) avaliaram a retenção e permeação cutânea, de um derivado da vitamina D, chamado de 22-oxacalcitriol, que é um ativo de uma pomada utilizada para psoríase. Utilizou dois modelos de membrana de rato, duas camadas (sem o estrato córneo) e três camadas (estrato córneo, epiderme e derme). Os resultados foram: as concentrações na pomada e na pele diminuíram em 24 horas, e a concentração observada no líquido receptor em 24 horas foi 2,8 vezes maior para a membrana sem o estrato córneo. O que mostra que o estrato córneo é a principal barreira cutânea para o ingrediente ativo. Os autores comentaram que este derivado da vitamina D possuía problemas de metabolização na pele e o método que eles desenvolveram de permeação cutânea possibilitou a realização dos parâmetros de permeação dosando apenas o ativo sem a interferência dos metabólitos. Houve a continuação deste trabalho em (2007), com a avaliação da permeação sobre parâmetros semelhantes do 22-oxacalcitriol, variando as concentrações de um triglicerídeo de cadeia média na pomada (3 e 30%). O coeficiente de difusão foi menor para o 3%, porém a concentração acumulada foi maior para esta concentração. Eles concluíram que o aumento da concentração do triglicerídeo na pomada causou uma diminuição na liberação do ativo, pois o ingrediente ativo, provavelmente, possuía maior afinidade a pomadas mais lipofílicas ficando retida na mesma e dificultando a permeação cutânea.

Um novo análogo da vitamina D para o tratamento de psoríase foi avaliado por Yamaguchi e colaboradores (2008). A permeação cutânea foi realizada em membrana de rato e cultura de pele humana tridimensional. Foram utilizados como comparativo outros dois derivados da vitamina D, o maxacalcitriol e calcipotriol. O novo análogo obteve menor permeação quando comparado com os outros derivados avaliados e uma alta biotransformação, o que leva a ser um potente ativo para tratamento de psoríase com menores efeitos adversos sistêmicos, de hipercalcemia, por exemplo. Os autores concluíram que uma alta lipofilicidade ajuda a diminuir a

permeação cutânea e aumentar sua metabolização na pele, o que causa uma diminuição de efeitos adversos sem reduzir a eficácia terapêutica.

A partir de 2014, a vitamina D₃ começou a ser estudada para uso transdérmico, por Sadat-Ali e colaboradores (2014). Eles realizaram um estudo piloto randomizado com 50 voluntárias femininas estudantes de medicina da Arábia Saudita, para verificar a viabilidade da via transdérmica da vitamina D₃. Somente as mulheres com deficiência de vitamina D₃ foram selecionadas e elas concordaram em não mudar a dieta e seu estilo de vida durante os 3 meses de estudo. Foram divididas em dois grupos: um em que as mulheres aplicariam em seus braços um gel de Aloe Vera com vitamina D₃ (5.000 UI) e outro o gel sem o ativo (controle). O estudo era cego, ou seja, as participantes não sabiam qual formulação estavam usando. Duas coletas de sangue foram realizadas, uma inicialmente e outra após os 3 meses de uso. Os resultados mostraram um aumento significativo dos níveis séricos da vitamina D₃ para o grupo teste e para o grupo controle este aumento não ocorreu ficando com valores semelhantes ao inicial. Com isso eles concluem que a via transdérmica é uma via segura, efetiva e que pode ser explorada.

Os pesquisadores Alsaqr, Rasouly e Musteata (2015) investigaram a capacidade transdérmica da vitamina D₃ adicionada em uma pomada contendo vaselina, lanolina, polietilenoglicóis (400 e 1.500) e os promotores de permeação (ácido oleico ou dodecilamina). A retenção e permeação cutânea foram avaliadas em 24 horas em pele de porco. Os resultados foram: retenção cutânea no estrato córneo e na epiderme para as três formulações [controle (F1), ácido oleico (F2) ou dodecilamina (F3)], sendo que as concentrações da vitamina D₃ foram crescentes, porém com baixa permeação cutânea da mesma para a manutenção de doses diárias de vitamina D. Após um pré-tratamento da pele com 50% de etanol, houve uma permeação aceitável para garantir a dose diária de vitamina D (400 UI). A conclusão foi que a combinação de dodecilamina com etanol favorece a permeação cutânea e sugeriram que após um pré-tratamento da pele com 50% de etanol a via transdérmica pode ser viável.

Porém, se sabe que a pele de porco possui uma maior permeabilidade do que a pele humana. Com isso Ramezanlia e colaboradores (2017) avaliaram a retenção e a permeação cutânea de nanoesferas com vitamina D₃ e solução da vitamina D₃

com etoxidiglicol (controle), em pele de cadáver por até 12 horas. Foi encontrada a vitamina D₃ em maior quantidade na epiderme do que na derme e no líquido receptor ficou abaixo do limite de detecção, o que foi esperado pela alta lipofilicidade da vitamina D₃. A nanoesfera obteve um aumento na entrega tópica do ingrediente ativo, do que o controle. Concluiu-se que a nanoesfera pode ser um carreador da vitamina D₃ para uso tópico.

Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos encontrados pelo Ramezanlia e colaboradores (2017), onde a vitamina D₃ ficou retida na pele em 24 horas e não houve a detecção no líquido receptor. Isto pode ser justificado pela característica físico-química da mesma, que é muito lipofílica ($\log P$ 10,24) o que dificultou a permeação cutânea. Em toxicologia, as substâncias com $\log P$ acima de 4 são classificadas com baixa absorção dérmica, com apenas 10%, ou seja, a permeação cutânea é limitada e, portanto, possuem maior segurança de uso (EUROPEAN COMMISSION, 2004b; LOFTSSON; HREINSDÓTTIR, 2006).

Alguns pontos que podemos salientar diante do exposto: a pele humana é excelente barreira cutânea; as emulsões não são as mais indicadas para ingredientes ativos muito lipofílicos, como a vitamina D, uma vez que podem ficar retidos na formulação por possuir maior afinidade e não serem liberados; os géis são os mais indicados, pois não possuem afinidade e liberam o ingrediente ativo lipofílico com maior facilidade; o etanol e o propilenoglicol demonstraram ser efetivos promotores de permeação cutânea; o uso tópico da vitamina D₃ é mais indicado que o transdérmico para a finalidade que se destina.

6. CONCLUSÕES

Foram desenvolvidas quatro formulações, variando as concentrações dos promotores de permeação químicos primários (lecitina de soja, palmitato de isopropila e etoxidiglicol) e por meio do método de extrusão um gel-creme foi formado.

O método analítico de doseamento da vitamina D₃ por CLAE foi considerado específico, linear, preciso e exato, com limite de detecção e de quantificação aceitáveis. Para o teste de retenção e permeação cutânea foi comprovada a especificidade e efetividade do método de extração, pela avaliação da recuperação do padrão de vitamina D₃.

No *Teste de Estabilidade Preliminar*, as formulações **F1** e **F2** foram consideradas mais estáveis em relação às demais.

Durante o *Teste de Estabilidade Acelerada* as formulações **F1** e **F2** não apresentaram mudanças nas características organolépticas (cor, odor e aspecto) por 15 dias, nas condições de ciclo, temperatura ambiente, estufa e geladeira. O valor de pH obteve diferença estatística, porém dentro da faixa biocompatível com a pele. A concentração da vitamina D₃ ao longo de 15 dias não possuiu diferença estatística para ambas. Houve menor diminuição da concentração do ingrediente ativo na condição de estufa para ambas, indicando a ocorrência da reação de isomerização térmica da vitamina D₃ em 15 dias.

No *Teste de Estabilidade Normal*, a **F1** foi escolhida por ter a maior concentração dos promotores de permeação e o melhor perfil. Não houve alterações nas características organolépticas, na concentração de vitamina D₃ e o valor de pH não obteve diferença estatística, para as condições de temperatura ambiente, estufa e geladeira, durante 90 dias. Na condição de radiação luminosa houve alteração na cor e odor; diminuição da concentração da vitamina D₃ e o valor de pH manteve-se sem diferença estatística somente nos primeiros 15 dias. A condição de armazenamento menos adequada foi a radiação luminosa e a melhor foi a geladeira.

O teste de segurança HET-CAM, realizado nas formulações **F1** e **F2**, verificou que as mesmas são seguras, por não serem irritantes.

O líquido receptor escolhido para o teste de retenção e permeação cutânea foi a PBS com 50% de etanol, por possuir a *sink condition*. Foi comprovado que a integridade da pele não foi afetada pela alta concentração do etanol por meio do teste de perda de água transepidérmica (TEWL). O teste de retenção e permeação cutânea demonstrou que o controle ficou retido no estrato córneo nas primeiras 4 horas e em 24 horas passou para a epiderme e a derme. A **F1** ficou na superfície da pele, demonstrando afinidade da vitamina D₃ com a fase oleosa da formulação e promoveu hidratação da pele em 24 horas de acordo com o teste de perda de água transepidérmica (TEWL).

Por fim, conclui-se que a formulação desenvolvida **F1** é estável, segura e possui efeito de hidratação ao longo de 24 horas. A via transdérmica não foi efetiva, sendo indicado o uso tópico da vitamina D₃. A alta lipofilicidade do ingrediente ativo pode ter diminuído a capacidade de permeação cutânea da mesma e por isso novos estudos poderão ser realizados para verificar o potencial desta via transdérmica, com derivados menos lipofílicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

- ABBOTT LABORATORIES, Abbott Park, Ill (USA). Jerry L. Hill, Johnstown; Benjamin D.Travis, Westerville; Mohamed I.Mahmoud, Columbus; James R.Brooks, West Worthington; Timothy W.Schenz, Powell; Normanella T.Dewille. **Method for Improving Vitamin D Stability in Liquid Nutritional Products**. US005456926A, 10 oct. 1995
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira**. Volume 1, 5ª edição, Brasília: Fundação Oswaldo Cruz. 2010. 510 p.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Porto Alegre: Artemed, 9. ed., 2013, p.118 e 408 - 409.
- ALMEIDA, I. F.; FERNANDES, A. R.; FERNANDES, L.; PENA FERREIRA, M. R.; COSTA, P. C.; BAHIA, M. F. Moisturizing effect of oleogel/hydrogel mixtures. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 13, p. 487–494, 2008.
- ALSAQR, A.; RASOULLY, M.; MUSTEATA, F. M. Investigating transdermal delivery of vitamin D₃. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 963 – 972, 2015.
- ARMELINI, A. I. P. V. **Avaliação do perfil de permeação cutânea in vitro da daidzeína em nanoemulsão cosmética: uma abordagem com foco na avaliação de segurança**. 2015. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- BABY, A.R. **Avaliação in vitro da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. São Paulo, 2007. 170p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- BABY, A.R. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichiliacatigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benthām, padronizado em flavonóides totais**. São Paulo, 2005. 159p. Dissertação de mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- BALLARD, J. M.; ZHU, L.; NELSON, E. D.; SEBURG, R. A. Degradation of vitamin D₃ in a stressed formulation: The identification of esters of vitamin D₃ formed by a transesterification with triglycerides. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 142–150, 2007.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. New York: Informa Health Care, 3rd ed., p. 6. 2009.
- BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M.; ETO, Y. **Formulário Médico-Farmacêutico**. São Paulo: Pharmabooks Editora, 4. ed., 2011, p. 599 – 602 e 714.
- BAUMANN, L.; SAGHARI, S.; WEISBERG, E. **Cosmetic Dermatology: principles and practice**. New York: Mc Graw Hill Medical, 2nd ed., p. 3 – 21, 2009.
- BEN-SHABAT, S.; BENISTY, R.; WORMSER, U.; SINTOV, A. C. Vitamin D₃-based conjugates for topical treatment of psoriasis: Synthesis, antiproliferative activity, and cutaneous penetration studies. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 50-57, 2005.
- BENTLEY, M. V. L. B.; KEDOR, E. R. M.; VIANNA, R. F.; COLLETT, J. H. The influence of lecithin and urea on the in vitro permeation of hydrocortisone acetate through skin from hairless mouse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 146, p. 255-262, 1997.
- BIKLE, D. D. Vitamin D metabolism and function in the skin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 347, p. 80–89, 2011.
- BILODEAU L, DUFRESNE G, DEEKS J, CLÉMENT G, BERTRAND, J, TURCOTTE S, ROBICHAUDA, BERALDINF, FOUQUETA. Determination of vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in foodstuffs by HPLC UV-DAD and LC–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 3, p. 441–448, 2011.
- BISHAI, D.; NALUBOLA, R. The history of food fortification in the United States: Its relevance for current fortification efforts in developing countries. **Economic Development and Cultural Change**, v. 51, n. 1, p. 37-53, 2002.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, J.S.; HUNTER, W.G. **Statistics for Experiments: Design, innovation and discovery**. 2nd ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2005, p. 181-188.
- BRANDÃO, L.A. **Index ABC: ingredientes para a indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes**. 3.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2009. 1460p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília, 2004. v.1, 47p. (Séries Temáticas: Qualidade 1).

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília, 2003. 15p. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.
- BRISSON, P. Percutaneous absorption. **Canadian Medical Association Journal**, v.110, p. 1182- 1185, 1974.
- CADWALLADER, D. E. Stability testing: its role in pre-formulation and formulation of cosmetic products. **Cosmetics & Toiletries**, Carol Stream, v. 104, n. 11, p. 87-102, 1989.
- CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.55, n. 8, p. 566-578, 2011.
- CHEMICAL BOOK. **Isopropyl Palmitate**. Disponível em: <http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0451826.htm>. Acesso em: 06 jun. 2016.
- CHEN, G.; TAO, D. An experimental study of stability of oil–water emulsion. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 499 – 508, 2005.
- CHEN, JR., P. S.; TEREPKA, A. R.; LANE, K.; MARSH, A. Studies of the stability and extractability of vitamin D. **Analytical Biochemistry**, v. 10, p. 421-434, 1965.
- CHILCOTT, R. P.; PRICE, S. **Principles and Practice of Skin Toxicology**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 8-13, 2008.
- CHOCMASTER. **Chocadeira Automática Bela48**. Disponível em: <http://www.chocmaster.com.br/loja/produto-101757-1230-chocadeira_automatica_bela48>. Acesso em: 04 mar. 2017.
- COSTA, G. M. D. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a adição de vitamina D₃**. 2017.132f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- DE PAEPE K.; HOUBEN E.; ADAM R.; WIESEMANN F.; ROGIERS V. Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. **Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin**, v. 11, p.61-69, 2005.

- DE PAEPE, K.; HACHEM, J.P.; VANPEE, E.; GOOSSENS, A.; GERMAUX, M-A.; LACHAPELLE, J-M.; LAMBERT, J.; MATTHIEU, L.; ROSEEUV, D.; SUYS, E.; HECKE, E. V.; ROGIERS, V. Beneficial effects of a skin tolerance-tested moisturizing cream on the barrier function in experimentally elicited irritation and allergic contact dermatitis. **Contact Dermatitis**, v.44, p. 337–343, 2001.
- DIEMBECK, W.; BECK, H.; BENECH-KIEFFER, F.; COURTELLEMONT, P.; DUPUIS, J.; LOVELL, W.; PAYE, M.; SPENGLER, J.; STEILING, W. Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 191-205, 1999.
- DRAELOS, Z. D. **Cosmetic Dermatology**: products and procedures. Chichester: Willey&Blackwell, p. 3-12, 2010.
- DRAIZE J. H.; WOODARD G.; CALVERY H. O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 84, n. 3, p. 377-390, 1944.
- DREHER, F.; WALDE, P.; LUISI, P. L.; ELSNER P. Human skin irritation studies of a lecithin microemulsion gel and of lecithin liposomes. **Skin Pharmacology**, v. 9, p. 124–129, 1996.
- EUROPEAN COMMISSION. **Cosing: cosmetic ingredients & substances**. 2016a. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.simple>>. Acesso em: 12 jun. 2016.
- EUROPEAN COMMISSION. Eskes, C.; Bessou, S.; Bruner, L.; Curren, R.; Jones, J. H. P.; Kreiling, R.; Liebsch, M.; McNamee, P.; Pape, W.; Prinsen, M. K.; Seidle, T.; Vanparys, P.; Worth, A.; Zuang, V. **Subgroup 3. Eye Irritation**. 2004a. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/\(5\)_chapter_3/3_eye_irritation_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/(5)_chapter_3/3_eye_irritation_en.pdf)>. Acesso em: 03 mar. 2017.
- EUROPEAN COMMISSION. **Guidance Document on Dermal Absorption**. Sanco/222/2000 rev. 7. 2004b. 15p.
- EUROPEAN COMMISSION. **Report from the commission to the european parliament and the council**: on the development, validation and legal acceptance of methods alternative to animal testing in the field of cosmetics (2013-2015). Brussels, 2016b. 11p.

- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). **Guideline Transdermal Patches**. EMA/CHMP/QWP/608924/2014. London, 2014. 24 p.
- FELDMAN, D.; PIKE, J. W.; GLORIEUX, F. **Vitamin D**. 2nd Edition, Elsevier Academic Press, 2005. p. 8, 37 – 43.
- FINNIN, B. C.; MORGAN, T. M. Transdermal penetration enhancers: Applications, limitations, and potential. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 10, p. 955-958, 1999.
- FORE-PFLIGER, J. The epidermal skin barrier: Implications for the wound care practitioner, Part I. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 17, n. 8, p. 417- 425, 2004.
- FRANZ, T. J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190-195, 1975.
- GHEBRE-SELLASSIE, I.; MARTIN, C. **Pharmaceutical Extrusion Technology**. Drugs and the pharmaceutical sciences, v.133. New York: Inform Healthcare. p. 1, 19 e 35, 2007.
- GILABERTE, Y.; AGUILERA, J.; CARRASCOSA, J.M.; FIGUEROA, F.L.; ROMANÍ DE GABRIEL, J.; NAGOREG, E. Vitamin D: Evidence and controversies. **Actas Dermosifiliográficas**, v. 102, n. 8, p. 572-588, 2011.
- GIOIA F.; CELLENO L. The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin. **Skin research and technology: official journal of International Society for Bioengineering and the Skin**, v. 8, p. 178-186, 2002.
- GODWIN, D. A.; KIM, N-H.; FELTON, L. A. Influence of Transcutol w CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 23–27, 2002.
- GUO, H.; LIU, Z.; LI, J.; NIE, S.; PAN, W. Effects of isopropyl palmitate on the skin permeation of drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2324—2326, 2006.
- GUTH, K.; SCHÄFER-KORTING, M.; FABIAN, E.; LANDSIEDEL, R.; RAVENZWAAY, B. V. Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 113–123, 2015.

- HEMERY, Y. M.; FONTAN, L.; MOENCH-PFANNER, R.; LAILLOU, A.; BERGER, J.; RENAUD, C.; AVALLONE, S. Influence of light exposure and oxidative status on the stability of vitamins A and D₃ during the storage of fortified soybean oil. **Food Chemistry**, v. 184, p. 90–98, 2015.
- HOLICK, M. F.; CHEN, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, n.87, p.1080S–1086S, 2008.
- IBRAHIM, M. M.; HAFEZ, S. A.; MAHDY, M. M. Organogels, hydrogels and bigels as transdermal delivery systems for diltiazem hydrochloride. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 48 -57, 2013.
- ICH INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1)**. 2005, 17p. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2016.
- INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientações sobre a validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. 2010. 20p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2016.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 359 – 370, 2008.
- KARANDE, P.; MITRAGOTRI, S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788 p. 2362–2373, 2009.
- KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 123–126, p. 369–385, 2006.
- KUMAR, R.; KATARE, O. P. Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: A review. **AAPS PharmSciTech**, v.6, n. 2, p. E298 – E310, 2005.
- LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.447, p. 12– 21, 2013.

- LEITE-SILVA, V. R.; ALMEIDA, M. M.; FRADIN, A.; GRICE, J. E.; ROBERTS, M. S. Delivery of drugs applied topically to the skin. **Expert Review of Dermatology**, v. 7, n. 4, p. 383-397, 2012.
- LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D. Determination of aqueous solubility by heating and equilibration: A technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, Article 4, p. E1 – E4, 2006.
- LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.
- LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The het-cam test: an alternative to the draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6/7, p. 495-496, 1986.
- MAHJOUR, M.; MAUSER, B.; RASHIDBAIGI, Z.; FAWZI, M. B. Effect of egg yolk lecithins and commercial soybean lecithins on *in vitro* skin permeation of drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 14, p. 243-252, 1990.
- MAIA, A. M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico**. São Paulo, 2002. 117p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- McGRATH, J. A.; UITTO, J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. **TRENDS in Molecular Medicine**, v.14, n. 1, p. 20 – 27, 2007.
- MEDEIROS, V. L. S.; ZANIBONI, M. C.; ARRUDA, L. H. F.; OLIVEIRA, S. L.; COBREIROS, N. L. Comparação entre duas loções hidratantes de diferentes pHs na melhora da hidratação da pele e na redução do prurido. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v.1, n. 4, p.168-173, 2009.
- MOSTAFA, W. Z.; HEGAZY, R. A. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. **Journal of Advanced Research**, p. 1-12, 2014.
- MURAA, P.; FAUCCIA, M. T.; BRAMANTIA, G.; CORTI, P. Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p. 365–372, 2000.
- NAIK, A.; KALIA Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 9, p.318-326, 2000.
- NORMAN, A. W.; BOUILLON, R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. **Experimental Biology and Medicine**, v.235, p. 1034-1045, 2010.

- OHNO, Y.; KANEKO, T.; INOUE, T.; MORIKAWA, Y.; YOSHIDA, T.; FUJII, A.; MASUDA, M.; OHNO, T.; HAYASHI, M.; MOMMA, J.; UCHIYAMA, T.; CHIBA, K.; IKEDA, N.; IMANISHI, Y.; ITAKAGAKI, H.; KAKISHIMA, H.; KASAI, Y.; KURISHITA, A.; KOJIMA, H.; MATSUKAWA, K.; NAKAMURA, T.; OHKOSHI, K.; OKUMURA, H.; SAIJO, K.; SAKAMOTO, K.; SUZUKI, T.; TAKANO, K.; TATSUMI, H.; TANI, N.; USAMI, M.; WATANABE, R. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and draize scores for the evaluation of the tests. **Toxicology in Vitro**, v. 13, p. 73-98, 1999.
- OLIVEIRA, A. G. L.; SILVA, R. S.; ALVES, E. N.; PRESGRABE, R. de F.; PRESGRABE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 153-159, 2012.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). ENV/JM/MONO(2011)36. **Guidance Notes on Dermal Absorption**: Series on Testing and Assessment No. 156. Paris, 2011.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline For The Testing Of Chemicals, Section 4, Health Effects, Test nº 405: **Acute Eye Irritation/Corrosion**. 2012, 19p. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-tg405-2012-508.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2017.
- PARISH, J. L. Topical vitamin D₃ analogues: unapproved uses, dosages, or indications. **Clinics in Dermatology**, v. 20, p. 558–562, 2002.
- PHARMAESPECIAL. **Aristoflex® AVC**. Disponível em: <http://www.pharmaspecial.com.br/media/produtos/4_lit_aristoflex_avc.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2016.
- PINTO, C. A. S. O. **Influência da rotina na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do *p*-metoxicinamato de octila (filtro UVB)**. São Paulo 2014. 237p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- PRAUSNITZ, M. R.; ELIAS, P. M.; FRANZ, T. J.; SCHMUTH, M.; TSAI, J-C.; MENON, G. K.; HOLLERAN, W. M.; FEINGOLD, K. R. **Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery, Dermatology**, 3th ed.; J Bolognia, J Jorizzo, J Schaffer, Eds. Elsevier Health Sciences. Section 19, cap. 124, p. 2065 -2073, 2012.

- PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1261–1268, 2008.
- RAMEZANLIA, T.; KILFOYLEA, B. E.; ZHANGC, Z.; MICHNIAK-KOHNA, B. B. Polymeric nanospheres for topical delivery of vitamin D₃. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, p. 196–203, 2017.
- RANADE, V. V. Drug delivery systems. 6. Transdermal drug delivery. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 401-418, 1991.
- RAUTA, S.; BHADORIYAA, S. S.; UPLANCHIWARA, V.; MISHRAB, V.; GAHANEAA, A.; JAINA, S. K. Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 1, p.8–15, 2012.
- SADAT-ALI, M.; BUBSHAIT, D. A.; AL-TURKI, H. A.; AL-DAKHEEL, D. A.; AL-OLAYANI, W. S. Topical delivery of vitamin D₃: A randomized controlled pilot study. **International Journal of Biomedical Science**, v. 10, n. 1, p. 21- 24, 2014.
- SAGIRI, S. S.; SINGH, V. K.; KULANTHAIVELA, S.; BANERJEEA, I.; BASAKB, P.; BATTACHARYAC, M. K.; PAL, K. Stearate organogel – gelatin hydrogel based bigels: Physicochemical, thermal, mechanical characterizations and in vitro drug delivery applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 43, p.1–17, 2015.
- SAUNDERS, M.; PUGH, W. **Use of ethanol in receptor phase — a lucky escape?** In: BRAIN, K. R.; WALTERS, K. A. Perspectives in percutaneous penetration. Abstracts of presentations at the eighth international perspectives in percutaneous penetration conference held in Antibes-Juan-les-Prins. Cardiff: STS Publishing, 2002. v. 8a, p 21.
- SCHUESSLERA, M.; ASTECKERA, N.; HERZIGA, G.; VORISEKA, G.; SCHUSTERA, I. Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D₃: CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D₃-hydroxylases. **Steroids**, v.66, p.399–408, 2001.
- SCRAGG, R. Vitamin D and public health: an overview of recent research on common diseases and mortality in adulthood. **Public Health Nutrition**, v. 14, n. 9, p. 1515–1532, 2011.

- SINGH, V. K.; ANIS, A.; BANERJEE, I.; PRAMANIK, K.; BHATTACHARYA, M. K.; PAL, K. Preparation and characterization of novel carbopol based bigels for topical delivery of metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 151–158, 2014.
- SPIELMANN, H.; GERNER, I.; KALVv'EIT, S.; MOOG, R.; WIRNSBERGER, T.; KRAUS, K.; KREILING, R.; KREUZER, H.; LÜPKE, N.-P.; MILTENBURGER, H. G.; MÜLLER N.; MÜRMANN, P.; PAPE, W.; SIEGEMUND, B.; SPENGLER, J.; STEILING, W.; WIEBEL, F. J. Interlaboratory assessment of alternatives to the draize eye irritation test in Germany. **Toxicology in Vitro**, v. 5, n. 5/6, p. 539-542, 1991.
- TSIARAS, W. G.; WEINSTOC, M. A. Factors Influencing Vitamin D Status. **Acta Dermato-Venereologica**, v.91, p. 115–124, 2011.
- U. S. PHARMACOPEIAL CONVENTION. U. S. Pharmacopeia National Formulary, **USP 39 NF 34**. Baltimore: United Book Pres. 2016. v.1, p. 1869 -1881.
- UNITED STATES. U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program (NTP), National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). Appendix B –ICCVAM-Recommended Test Method Protocol - **Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method**. NIH Publication Nº. 10-7553, p. B- 29 -B-37, 2010. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/invitro-2010/appb-protocols.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2017.
- UNITED STATES. U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program (NTP), National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). Introduction and Rationale: Section 1 - **ICCVAM HET-CAM BRD**, NIH Publication Nº. 06-4515. 2006, 20p. Disponível em:<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/ocubrd/hetcam/hetcam1.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2017.
- UNITED STATES. U.S. Food and Drug Administration (FDA). **Vectical (calcitriol) ointment 3 mcg/g**: for topical use only. 1978. 5 p.
- VINTILOIU, A.; LEROUX, J-C. Organogels and their use in drug delivery - A review. **Journal of Controlled Release**, v. 125, p. 179–192, 2008.

- WECK, A. L., BUNDGAARD, H. **Allergic Reactions to Drugs**. Berlin: Springer-Verlag, 1983, p. 680.
- WENNINGER, J. A.; CANTERBURY, R. C.; McEWEN, G. N. **International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook**. v.1. 8th ed. Washington: The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, 2000.
- WILLIMANN, H.; WALDE, P.; LUSI, P. L.; GAZZANIGA, A.; STROPPOLO, F. Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 9, p. 871 – 874, 1992.
- WOLVERTON, S. E. **Terapêutica Dermatológica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015, p.543 – 549.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Kielhorn, J.; Melching-Kollmuß, S.; Mangelsdorf, I. **Dermal absorption: Environmental health criteria 235**. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2006.
- YAMAGUCHI, K.; MITSUI, T.; ASOA, Y.; SUGIBAYASHI, K. Analysis of in vitro skin permeation of 22-oxacalcitriol from ointments based on a two- or three-layer diffusion model considering diffusivity in a vehicle. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, p. 310–318, 2007.
- YAMAGUCHI, K.; MITSUI, T.; YAMAMOTO, T.; SHIOKAWA, R.; NOMIYAMA, Y.; OHISHI, N.; ASOA, Y.; SUGIBAYASHI, K. Analysis of in vitro skin permeation of 22-oxacalcitriol Having a Complicated Metabolic Pathway. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 4, p. 680–688, 2006.
- YAMAGUCHI, K.; MORITA, K.; MITSUI, T.; ASOA, Y.; SUGIBAYASHI, K. Skin permeation and metabolism of a new antipsoriatic vitamin D₃ analogue of structure 16-en-22-oxa-24-carboalkoxide with low calcemic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, p. 105–112, 2008.
- ZATZ, J. L. **Skin Permeation: Fundamentals and Application**. Allured Publishing Corporation: Wheaton, 1993. 11 – 31, 95 p.

ANEXOS

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIFESP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da permeação cutânea da vitamina D em gel transdérmico

Pesquisador: Vânia Rodrigues Leite e Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59667916.2.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.727.802

Apresentação do Projeto:

Nº CEP: 1246/2016

A principal barreira imposta a sistemas de tratamento tópicos está relacionada à capacidade do ativo passar pelo estrato córneo. Deste modo, estudos sobre promotores de permeação tem se intensificado nos últimos anos, seja pela avaliação da permeação de uma substância ativa por meio da adição de um promotor à sua formulação, ou ainda pelo desenvolvimento de técnicas que modifiquem reversivelmente a função de barreira do

estrato córneo. O objetivo deste trabalho será avaliar a permeação cutânea através de um gel transdérmico contendo vitamina D. A formulação possui promotores de permeação que favorecem a passagem do ingrediente ativo através da pele. O ingrediente ativo de escolha foi a vitamina D. O método utilizado será ex vivo com pele humana de cirurgia plástica, utilizando célula de Franz.

Objetivo da Pesquisa:

.1. Objetivo geral

Avaliar a permeação cutânea da vitamina D veiculada em gel transdérmico.

.2. Objetivos específicos

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.727.802

1. Avaliar, preliminarmente, a permeação das substâncias em membrana natural (células de Franz) quantificando cada amostra na superfície, epiderme, derme e líquido receptor.
2. Realizar a determinação da vitamina D nas amostras obtidas na etapa anterior (método analítico).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador: Riscos: Não oferece risco. A pele humana usada no estudo será obtida pela excisão desta em cirurgias plásticas abdominais durante a rotina desse procedimento, e a gordura subcutânea será removida. Posteriormente a pele será reidratada com Phosphate Buffered Saline (PBS) e sua integridade testada por meio de duas

análises físicas, sendo elas avaliação da perda Transepidermica e sua resistência elétrica

Benefícios: A utilização de veículos que possam aumentar a permeação cutânea é um grande avanço na área de aplicação tópica, tanto para cosméticos quanto para medicamentos, podendo evitar administração oral ou injetável.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo com o objetivo acadêmico de Mestrado, vinculado ao Departamento de Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Campus DIADEMA.

Coordenadora do aluno de mestrado : Profa. Dra. Maria Valeria Robles Velasco

Faculdade de Ciências farmacêuticas USP - Universidade de São Paulo

Responsável pelo teste de permeação cutânea: Profa. Dra. Vânia Rodrigues Leite e Silva Departamento de Ciências Exatas e da Terra - Campus Diadema Universidade Federal de São Paulo

Este ensaio será feito em células de difusão vertical de dois compartimentos (células de Franz), de acordo com procedimento recomendado pela Farmacopéia Americana (United

States Pharmacopoeia), conforme descrito em Pharmacopeia Forum, v. 35 (3) 2009 para medicamentos tópicos (semi-sólidos). Para esse estudo, será utilizada pele humana retirada de cirurgia plástica abdominal, limpa e com a gordura subcutânea removida. Após reidratação com PBS, a integridade da pele será avaliada por dois métodos

físicos: perda de água transepidermica (TEWL) e resistência para verificação de danos (DE PAEPE et al. 2005; GIOIA & CELLENO, 2002). O gel transdérmico contendo o ativo será aplicada na pele na razão de 2mg/cm². O fluido receptor será coletado nos tempos 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 24h (YAMAGUCHI et al. 2007). O líquido receptor utilizado será o tampão fosfato alcalino (pH 7,4), conhecido como PBS, com a adição do etanol na proporção de (7:3) e colocado em banho aquecido

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.727.802

a 35 °C sob constante agitação. A solubilidade das substâncias a serem solubilizadas no fluido será verificada antes do experimento (BEN-SHABAT et al. 2005). A quantidade de vitamina D será identificada e quantificada em 5 diferentes regiões da pele: Superfície da pele (SP), Stratum Corneum (SC), Epiderme Viável (EV), Derme (D) e Fluido Receptor (FR) por Cromatografia líquida de alta performance (CLAE).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos obrigatórios apresentados: Folha de Rosto folha_de_rostoassinada.pdf; Projeto Detalhado (PROJETO_PERMEACAO_FINAL.doc); TCLE(TCLE_CORRIGIDO_2.doc); TCLE (TCLE_Dr_Koji.pdf); Declaração de Pesquisadores Participacao_Gabriela_Costa.docx; Declaração de Pesquisadores Carta_esclarecimento.docx; anuencia_departamento_USP.pdf;

Recomendações:

Nada consta

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem inadequações

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir da data de aprovação final, é necessário o envio de relatórios semestrais (no caso de estudos pertencentes à área temática especial) e anuais (em todas as outras situações). É também obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_779817.pdf	06/09/2016 12:19:16		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rostoassinada.pdf	02/09/2016 16:46:29	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Outros	anuencia_departamento_USP.pdf	23/08/2016 14:38:37	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_esclarecimento.docx	23/08/2016 14:38:10	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Dr_Koji.pdf	23/08/2016 14:37:22	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.727.802

Declaração de Pesquisadores	Participacao_Gabriela_Costa.docx	23/08/2016 14:37:00	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CORRIGIDO_2.doc	23/08/2016 14:35:18	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PERMEACAO_FINAL.doc	23/08/2016 14:35:03	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 14 de Setembro de 2016

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

ANEXO B- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA USP **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**Título da Pesquisa:** Avaliação da permeação cutânea da vitamina D em gel transdérmico**Pesquisador:** Vânia Rodrigues Leite e Silva**Área Temática:****Versão:** 1**CAAE:** 59667916.2.3001.0067**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Paulo**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 1.801.824**Apresentação do Projeto:**

A principal barreira imposta a sistemas de tratamento tópicos está relacionada à capacidade do ativo passar pelo estrato córneo. Deste modo, estudos sobre promotores de permeação tem se intensificado nos últimos anos, seja pela avaliação da permeação de uma substância ativa por meio da adição de um promotor à sua formulação, ou ainda pelo desenvolvimento de técnicas que modifiquem reversivelmente a função de barreira do estrato córneo.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho será avaliar a permeação cutânea em 10 indivíduos doadores de pele retirada da região abdominal e mama após cirurgia plástica através de um gel transdérmico contendo vitamina D. A formulação possui promotores de permeação que favorecem a passagem do ingrediente ativo através da pele. O ingrediente ativo de escolha foi a vitamina D. O método utilizado será ex vivo com pele humana de cirurgia plástica, utilizando célula de Franz. Não haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**RISCOS:**

Não oferece risco. A pele humana usada no estudo será obtida pela excisão desta em cirurgias plásticas abdominais durante a rotina desse procedimento, e a gordura subcutânea sera removida.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.801.824

Posteriormente a pele sera rehidratada com Phosphate Buffered Saline(PBS) e sua integridade testada por meio de duas analises fisicas, sendo elas avaliação da perda Transepidermica e sua resistencia eletrica.

BENEFÍCIOS:

A utilização de veículos que possam aumentar a permeação cutânea é um grande avanço na area de aplicação tópica, tanto para cosméticos quanto para medicamentos, podendo evitar administração oral ou injetável.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa muito interessante e de relevância para sua área.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão de acordo com o exigido pelo CEP, com exceção do documento "Participacao_Gabriela_Costa.docx" que não está assinado pela aluna.

Recomendações:

Recomendo que:

- 1) o documento "Participacao_Gabriela_Costa.docx" seja assinado pela aluna;
- 2) apresente a seção de "riscos e beneficios" da pesquisa como sendo de "risco mínimo";

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está bem escrito e os termos estão de acordo com o exigido, com exceção do documento acima citado. Recomenda-se que o pesquisador siga as recomendações do CEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser aprovado assim que as providências indicadas sejam atendidas na Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_779817.pdf	06/09/2016 12:19:16		Aceito
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	02/09/2016		Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfct@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.801.824

Básicas do Projeto	ETO_779817.pdf	16:46:58		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	02/09/2016 16:46:29	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Outros	anuencia_departamento_USP.pdf	23/08/2016 14:38:37	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_esclarecimento.docx	23/08/2016 14:38:10	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Dr_Koji.pdf	23/08/2016 14:37:22	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Participacao_Gabriela_Costa.docx	23/08/2016 14:37:00	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CORRIGIDO_2.doc	23/08/2016 14:35:18	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PERMEACAO_FINAL.doc	23/08/2016 14:35:03	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 01 de Novembro de 2016

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepf@usp.br

ANEXO C- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIFESP–EMENDA **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Avaliação da permeação cutânea da vitamina D em gel transdérmico

Pesquisador: GABRIELA MARIA D ANGELO COSTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 59667916.2.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.955.022

Apresentação do Projeto:

EMENDA AO PROTOCOLO

Nº CEP: 1246/2016

A principal barreira imposta a sistemas de tratamento tópicos está relacionada à capacidade do ativo passar pelo estrato córneo. Deste modo, estudos sobre promotores de permeação tem se intensificado nos últimos anos, seja pela avaliação da permeação de uma substância ativa por meio da adição de um promotor à sua formulação, ou ainda pelo desenvolvimento de técnicas que modifiquem reversivelmente a função de barreira do

estrato córneo. O objetivo deste trabalho será avaliar a permeação cutânea através de um gel transdérmico contendo vitamina D. A formulação possui promotores de permeação que favorecem a passagem do ingrediente ativo através da pele. O ingrediente ativo de escolha foi a vitamina D. O método utilizado será ex vivo com pele humana de cirurgia plástica, utilizando célula de Franz

Objetivo da Pesquisa:

1. Objetivo geral

Avaliar a permeação cutânea da vitamina D veiculada em gel transdérmico.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.955.022

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

NÃO SE APLICA

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo com o objetivo acadêmico de Mestrado, vinculado ao Departamento de Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Campus DIADEMA.

Coordenadora do aluno de mestrado :Profa. Dra. Maria Valeria Robles Velasco

Faculdade de Ciências farmacêuticas USP - Universidade de São Paulo

Responsável pelo teste de permeação cutânea: Profa. Dra. Vânia Rodrigues Leite e Silva Departamento de Ciências Exatas e da Terra - Campus Diadema Universidade Federal de São Paulo

a emenda no projeto intitulado "Avaliação da permeação da vitamina D em gel transdérmico", com as seguintes alterações:

1. Houve a mudança de pesquisador responsável, já aprovada pelo Comitê de Ética, em que a Profª. Drª. Vânia Rodrigues Leite e Silva passou a ser pesquisadora associada e a Gabriela Maria D'Angelo Costa se tornou a atual pesquisadora responsável. Os documentos como: TCLE, declaração de participação e descrição da equipe foram atualizados com a nova informação da pesquisadora responsável.
2. Inclusão da Profª. Drª. Vânia Rodrigues Leite e Silva, como equipe de pesquisa.
3. No campo onde se fala dos riscos, houve a mudança da frase "Não oferece risco" para "Oferece risco mínimo", conforme foi solicitado no parecer da USP nº CAAE 59667916.2.3001.0067.
4. A mudança do cronograma foi necessária, uma vez que ainda faltam ensaios a ser realizados, devido ao atraso do cronograma. Por isso solicito a prorrogação do cronograma até dia 31/08/2017.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

EMENDA AO PROJETO

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

EMENDA APROVADA

Considerações Finais a critério do CEP:

O parecer foi acatado pelo colegiado.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.955.022

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_870964 E1.pdf	21/02/2017 15:43:46		Aceito
Outros	Carta_esclarecimento_emenda.docx	21/02/2017 15:35:36	GABRIELA MARIA D ANGELO COSTA	Aceito
Outros	DESCRICAO_DA_EQUIPE_DE_PESQ UISA_PesquisadoraresponsavelGabriela.docx	21/02/2017 15:34:21	GABRIELA MARIA D ANGELO COSTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CORRIGIDO_Gabrielapesquisadoraresponsavel.doc	21/02/2017 15:32:00	GABRIELA MARIA D ANGELO COSTA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_participacao_gabrielapesquisadoraresponsavel035.pdf	21/02/2017 15:30:14	GABRIELA MARIA D ANGELO COSTA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	02/09/2016 16:46:29	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Outros	anuencia_departamento_USP.pdf	23/08/2016 14:38:37	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_esclarecimento.docx	23/08/2016 14:38:10	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Dr_Koji.pdf	23/08/2016 14:37:22	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Participacao_Gabriela_Costa.docx	23/08/2016 14:37:00	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CORRIGIDO_2.doc	23/08/2016 14:35:18	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PERMEACAO_FINAL.doc	23/08/2016 14:35:03	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.955.022

SAO PAULO, 08 de Março de 2017

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

ANEXO D- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA USP - EMENDA **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**Título da Pesquisa:** Avaliação da permeação cutânea da vitamina D em gel transdérmico**Pesquisador:** GABRIELA MARIA D ANGELO COSTA**Área Temática:****Versão:** 2**CAAE:** 59667916.2.3001.0067**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Paulo**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 2.063.828**Apresentação do Projeto:**

Na última década a vitamina D ganhou destaque entre os pesquisadores, tornando-se um objeto de estudo frequente, o que possibilitou a descoberta de novas e diferentes funções desta vitamina. Esta tem sido prejudicada pelo excessivo uso de fotoprotetores e a não exposição solar com fins de prevenção do câncer de pele. A suplementação oral e o enriquecimento de alimentos com a vitamina D são hábitos comuns hoje em dia, para manter ou aumentar os níveis séricos da mesma, porém a aplicação tópica ainda é pouco utilizada. É aprovado pelo FDA somente a utilização

da vitamina D em aplicação tópica para o tratamento de psoríase. Os dermatologistas tem preferência por medicamentos tópicos, por apresentarem algumas vantagens em relação ao oral. Por exemplo, não possui efeito de primeira passagem, efeito local mais rápido e menor reações adversas.

As formulações tópicas podem permear ou não na pele. Caso não ocorra a permeação pode-se utilizar promotores de permeação, que é característico de um sistema transdérmico, pois o mesmo permea através da pele para promover o efeito terapêutico desejado. Os transdérmicos representam o mercado farmacêutico de mais sucesso dentro do sistema não oral de liberação de fármacos e em meados dos anos 2000 estava

avaliado em aproximadamente 2 bilhões de dólares. Para que ocorra a permeação da substância ativa, é necessário atravessar a barreira cutânea, que é composta por estrato córneo, epiderme

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112**Bairro:** Butantã**CEP:** 05.508-000**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)3091-3622**Fax:** (11)3031-8986**E-mail:** cepfcd@usp.br

USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.063.828

viável, derme e tecido adiposo. Esta permeação possui diferentes rotas, que podem ser pelo estrato córneo ou pelos folículos pilosos e ductos de glândulas sebáceas. Uma vez permeando pela via do estrato córneo a substância pode seguir dois caminhos: através das células e espaços intercelulares existentes (polar) ou pela parte lipofílica das células (apolar). Ao chegar à derme ela entra em contato com os vasos sanguíneos presentes nesta camada, possibilitando que a substância caia na circulação sanguínea e efetue seu efeito desejado. Testes in vivo e in vitro podem ser realizados para avaliar a permeação cutânea. Alguns estudos avaliaram a correlação com os testes in vivo e in vitro e obtiveram resultados satisfatórios, de boa correlação entre os métodos. A permeação realizada in vitro é feita em células de difusão, com uma membrana natural, uma fase receptora e fase doadora. A membrana pode ser de animal, como pele de porco, ou pele humana, sendo a

última a de melhor comparação com o que ocorre no nosso organismo. A fase receptora, normalmente é uma solução salina ou isotônica, para mimetizar as condições fisiológicas e a fase doadora é a sua substância de análise. A célula de difusão mais usada é a célula de Franz. Para esse estudo, será utilizada pele humana retirada de cirurgia plástica abdominal, limpa e com a gordura subcutânea removida. Após reidratação com PBS, a integridade da pele será avaliada por dois métodos físicos: perda de água transepidérmica (TEWL) e resistência para verificação de danos. O gel

transdérmico contendo o ativo será aplicada na pele na razão de 2mg/cm². O fluido receptor será coletado nos tempos 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 24h. O líquido receptor utilizado será o tampão fosfato alcalino (pH 7,4), conhecido como PBS, com a adição do etanol na proporção de (7:3) e colocado em banho aquecido a 35 °C sob constante agitação. A solubilidade das substâncias a serem solubilizadas no fluido será verificada antes do experimento.

A quantidade de vitamina D será identificada e quantificada em 5 diferentes regiões da pele: Superfície da pele (SP), Stratum Corneum (SC), Epiderme Viável (EV), Derme (D) e Fluido Receptor (FR) por Cromatografia líquida de alta performance (CLAE).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a permeação cutânea da vitamina D veiculada em gel transdérmico

Objetivo Secundário:

1. Avaliar, preliminarmente, a permeação das substâncias em membrana natural (células de Franz) quantificando cada amostra na superfície, epiderme, derme e líquido receptor.
2. Realizar a determinação da vitamina D nas amostras obtidas na etapa anterior (método

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfctf@usp.br

Continuação do Parecer: 2.063.828

analítico).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Oferece risco mínimo. A pele humana usada no estudo será obtida pela excisão desta em cirurgias plásticas abdominais durante a rotina desse procedimento, e a gordura subcutânea será removida.

Posteriormente a pele será reidratada com Phosphate Buffered Saline(PBS) e sua integridade testada por meio de duas análises físicas, sendo elas avaliação da perda Transepidérmica e sua resistência elétrica.

Benefícios:

A utilização de veículos que possam aumentar a permeação cutânea é um grande avanço na área de aplicação tópica, tanto para cosméticos quanto para medicamentos, podendo evitar administração oral ou injetável.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem estruturada e embasada na literatura científica da área.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está de acordo com as necessidades de preservação do participante, em forma de convite, em linguagem simples e identificando contato, se for necessário

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_870964_E1.pdf	21/02/2017 15:43:46		Aceito
Outros	Carta_esclarecimento_emenda.docx	21/02/2017 15:35:36	GABRIELA MARIA D ANGELO COSTA	Aceito
Outros	DESCRICAO_DA_EQUIPE_DE_PESQ UISA_PesquisadoraresponsavelGabriela.docx	21/02/2017 15:34:21	GABRIELA MARIA D ANGELO COSTA	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfctf@usp.br

**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Continuação do Parecer: 2.063.828

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CORRIGIDO_Gabrielapesquisadoraresponsavel.doc	21/02/2017 15:32:00	GABRIELA MARIA D ANGELO COSTA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_participacao_gabrielapesquisadoraresponsavel035.pdf	21/02/2017 15:30:14	GABRIELA MARIA D ANGELO COSTA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	02/09/2016 16:46:29	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Outros	anuencia_departamento_USP.pdf	23/08/2016 14:38:37	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_esclarecimento.docx	23/08/2016 14:38:10	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Dr_Koji.pdf	23/08/2016 14:37:22	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Participacao_Gabriela_Costa.docx	23/08/2016 14:37:00	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CORRIGIDO_2.doc	23/08/2016 14:35:18	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PERMEACAO_FINAL.doc	23/08/2016 14:35:03	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 15 de Maio de 2017

Assinado por:

**Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)**

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfct@usp.br

ANEXO E- CURRÍCULO LATTES

Gabriela Maria D Angelo CostaEndereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2183777463201584>

Última atualização do currículo em 09/09/2017

Possui graduação em Farmácia e Bioquímica - Faculdades Oswaldo Cruz (2014). Tem experiência na área de Cosmetologia. Realizou Iniciação Científica na Faculdades de Ciências Farmacêuticas-USP durante três anos no laboratório de Cosmetologia, sendo dois deles financiados pela FAPESP (nº 2011/20784-0). Além disso, fez estágios nas empresas International Flavors and Fragrances (IFF) e EVIC Brasil. Atualmente é aluna de mestrado, no Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP, no laboratório de Cosmetologia. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Gabriela Maria D Angelo Costa

Nome em citações bibliográficas COSTA, Gabriela Maria D'Angelo; COSTA, G. M. D.; Gabriela M. D. Costa; COSTA, GABRIELA MARIA D'ANGELO; COSTA, Gabriela Maria D Angelo; COSTA, GABRIELA MARIA D ANGELO; GABRIELA MARIA D'ANGELO COSTA; GABRIELA MARIA D ANGELO COSTA

Endereço**Formação acadêmica/titulação**

2015 Mestrado em andamento em Fármacos e Medicamentos (Conceito CAPES 4).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: "Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a adição de vitamina D3. Orientador: Maria Valeria Robles Velasco.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Palavras-chave: Sistemas Transdérmicos; Vitamina D; Permeação cutânea.

2010 - 2014 Grande área: Ciências da Saúde
Graduação em Farmácia.
Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Brasil.

Formação Complementar

2015 - 2015 Extensão universitária em Cosmetologia Aplicada. (Carga horária: 30h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP, FCF USP, Brasil.

2014 - 2014 Curso de Inglês. (Carga horária: 111h).
Kaplan International Colleges Oxford - United Kingdom, KIC OXFORD, Inglaterra.

2011 - 2013 Extensão universitária em Iniciação Científica. (Carga horária: 2400h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP, FCF USP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional
2015 - Atual Vínculo: Aluna de Mestrado, Enquadramento Funcional: Aluna de Mestrado, Regime: Dedicção exclusiva.

Vínculo institucional
2011 - 2014 Vínculo: Aluna Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Aluna Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades
07/2015 - Atual Pesquisa e desenvolvimento , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Linhas de pesquisa
Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a adição de vitamina D3

03/2011 - 01/2014 Pesquisa e desenvolvimento , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .

<p>Linhas de pesquisa</p> <p>Validação de metodologia analítica para a quantificação simultânea de avobenzona e p-metoxinamato em fotoprotetores utilizando Ressonância Magnética Nuclear- Projeto FAPESP nº 2011/20784-0</p>	
<p>EVIC Brasil, EVIC, Brasil.</p>	
<p>Vínculo institucional</p> <p>2014 - 2014</p>	<p>Vínculo: Estagiária de pesquisa clínica, Enquadramento Funcional: Estagiária de pesquisa clínica de cosméticos, Carga horária: 30, Regime: Dedicação exclusiva.</p>
<p>Outras informações</p>	<p>- Aplicação de testes de segurança e eficácia de cosméticos; - Monitoramento de documentos de estudo clínico; - Auxílio na elaboração de relatórios finais de estudo clínico; - Acompanhamento do sistema da qualidade na pesquisa clínica; - Auxílio no recrutamento e seleção de voluntários.</p>
<p>IFF Essências e Fragrâncias, IFF, Brasil.</p>	
<p>Vínculo institucional</p> <p>2012 - 2012</p>	<p>Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiária análise sensorial de fragrâncias, Carga horária: 30</p>
<p>Outras informações</p>	<p>- Experiência na avaliação sensorial de produtos cosméticos; - Organização e aplicação de painéis para os testes sensoriais; - Análise estatística dos testes sensoriais; - Desenvolvimento de relatórios.</p>

Linhas de pesquisa

- Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a adição de vitamina D3
Objetivo: O objetivo do projeto é o desenvolvimento e a avaliação de sistemas transdérmicos com a combinação de promotores de permeação cutânea químicos e acrescidos com o componente ativo vitamina D3..
Palavras-chave: Vitamina D; Sistemas Transdérmicos; Permeação cutânea.
- Validação de metodologia analítica para a quantificação simultânea de avobenzona e p-metoxinamato em fotoprotetores utilizando Ressonância Magnética Nuclear- Projeto FAPESP nº 2011/20784-0
Objetivo: Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação simultânea da avobenzona e do p-metoxinamato de octila em formulações fotoprotetoras, utilizando a espectroscopia da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), quanto aos parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação..
Grande área: Ciências da Saúde
Palavras-chave: Avobenzona; p- metoxinamato de octila; RMN.

Projetos de pesquisa

<p>2015 - Atual</p>	<p>Desenvolvimento e avaliação de sistemas transdérmicos com a adição de vitamina D3</p> <p>Descrição: A via de administração transdérmica apresenta vantagens, como: alternativa no tratamento de pacientes com dificuldades de deglutição, com diminuição da capacidade absorvedora no intestino; evita o metabolismo de primeira passagem; possibilita uma liberação gradual e constante; e possui maior aceitação e adesão dos pacientes. O uso de promotores químicos em formulações transdérmicas é bastante comum, devido seu baixo custo e facilidade de incorporação nas formulações. Possui a finalidade de facilitar a permeação cutânea e os escolhidos para o trabalho foram: lecitina de soja, palmitato de isopropila, etoxidilglicol, propilenoglicol e etanol. O ingrediente ativo de escolha foi a vitamina D3 pela elevada incidência de hipovitaminose D que vem sendo crescente nos últimos anos, com a necessidade de novas formas farmacêuticas de administração da mesma..</p> <p>Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.</p>
<p>2012 - 2013</p>	<p>Integrantes: Gabriela Maria D Angelo Costa - Integrante / Maria Valéria Robles Velasco - Coordenador.</p> <p>Validação de metodologia analítica para a quantificação simultânea de avobenzona e p-metoxinamato em fotoprotetores utilizando ressonância magnética nuclear (renovado)</p> <p>Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p>
<p>2011 - 2012</p>	<p>Integrantes: Gabriela Maria D Angelo Costa - Integrante / Maria Valéria Robles Velasco - Coordenador.</p> <p>Validação de metodologia analítica para a quantificação simultânea de avobenzona e p-metoxinamato em fotoprotetores utilizando ressonância magnética nuclear</p>

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Gabriela Maria D Angelo Costa - Integrante / Maria Valéria Robles Velasco - Coordenador.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Cosmetologia.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. MARTINS, T. E. A. ; **COSTA, G. M. D.** ; PINTO, C. A. S. O. ; DARIO, M. F. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Review of children's products for topical use. Household and Personal Care Today (Testo Stampato), v. 10, p. 75, 2015.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. PINTO, C. A. S. O. ; **COSTA, G. M. D.** ; MARTINS, T. E. A. ; ISSA, M. G. ; DARIO, M. F. ; PERES, D. D. ; CONSIGLIERI, V. O. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Interaction between butyl methoxydibenzoylmethane, ethylhexyl methoxycinnamate and rutin: MNR, fluorescence and thermal analysis. In: 28th Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC), 2014, Paris. Anais of Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC), 2014. p. 3254-3255.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. PINTO, C. A. S. O. ; **COSTA, G. M. D.** ; GONCALVES, M. I. A. ; DARIO, M. F. ; CONSIGLIERI, V. O. ; ALMEIDA, A. J. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Rutin as UV filter photostabilizer: NMR, qualitative fluorescence and thermal analysis. In: 27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2014, São Paulo. Cosmetic & Toiletries, 2014. v. 26. p. 104-104.
2. PINTO, C. A. S. O. ; BABY, A. R. ; GONCALVES, M. I. A. ; **COSTA, G. M. D.** ; VELASCO, M. V. R. . UV filters photostabilization in the presence of rutin. In: 1º Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2012, Pernambuco. CD-ROM do Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2012.
3. PINTO, C. A. S. O. ; BABY, A. R. ; GONCALVES, M. I. A. ; **COSTA, G. M. D.** ; MARTINS, T. E. A. ; KANEKO, T. M. ; GOUVEIA, J. C. ; VELASCO, M. V. R. . Evaluation of the UV filters photoestabilization in the presence of rutin by relectance spectroscopy and NMR. In: 27th Congress of the International Federation of the Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC), 2012, Johannesburg. CD-ROM of 27th Congress of the International Federation of the Societies of Cosmetic Chemists, 2012.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **COSTA, G. M. D.** ; DARIO, M. F. ; PINTO, C. A. S. O. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . New Method for Determination of Vitamin D3 in Topical Formulations. In: XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2016, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016. v. 52. p. 38-38.
2. ESTEVES, V. B. ; INOUE, S. N. N. ; **COSTA, G. M. D.** ; DARIO, M. F. ; PINTO, C. A. S. O. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Estudo de Estabilidade de Emulsões Fotoprotetoras contendo Rutina como Fotoestabilizador. In: 28º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2015, São Paulo. Cosmetics & Toiletries (ed. português), 2015. v. 27. p. 98-98.
3. **COSTA, G. M. D.** ; PINTO, C. A. S. O. ; GONCALVES, M. I. A. ; KANEKO, T. M. ; DARIO, M. F. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aplicada à quantificação simultânea de filtros solares em fotoprotetores. In: XXI COLAMIQ, 2013, São Paulo. Cosmetics & Toiletries (ed. português), 2013. v. 25. p. 28-28.
4. **COSTA, G. M. D.** ; PINTO, C. A. S. O. ; GONCALVES, M. I. A. ; KANEKO, T. M. ; BABY, A. R. ; GOUVEIA, J. C. ; VELASCO, M. V. R. . Photostability of UV filters evaluated by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. In: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2013, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. v. 49. p. 47-47.
5. PINTO, C. A. S. O. ; **COSTA, G. M. D.** ; GONCALVES, M. I. A. ; KANEKO, T. M. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . The application of NMR Spectroscopy in the simultaneous determination of chemical sunscreen in topical emulsion. In: XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2012, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. v. 48. p. 17-17.

Apresentações de Trabalho

1. **COSTA, G. M. D.**; SOUZA, A. D. F. . Perspectivas e Egressos do EPIFAR. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
2. FLORES, M. I. C. ; GOSHIYAMA, A. M. ; **COSTA, G. M. D.** ; FREIRE, T. ; CONSIGLIERI, V. O. ; BEDIN, V. ; VELASCO, M. V. R. . Action of Desodorante and antiperspirant in the human body. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. **COSTA, G. M. D.**; PINTO, C. A. S. O. ; BEDIN, V. ; **BABY, A. R.** ; VELASCO, M. V. R. . Vitamina D: Origens, Funções e Deficiências. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. **COSTA, G. M. D.**. Avaliação da eficácia de produtos cosméticos ? prático-demonstrativo. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
5. **COSTA, G. M. D.**. Avaliação da eficácia fotoprotetora in vitro. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
6. **COSTA, G. M. D.**; SOUZA, A. D. F. . Perspectivas e Egressos do EPIFAR. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
7. **COSTA, G. M. D.**; DARIO, M. F. ; PINTO, C. A. S. O. ; **BABY, A. R.** ; VELASCO, M. V. R. . New Method for Determination of Vitamin D3 in Topical Formulations. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
8. **COSTA, G. M. D.**. Plantas Aromáticas e Especiarias em Saúde. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
9. **COSTA, G. M. D.**. Ingresso no mestrado. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
10. FREIRE, T. ; PINTO, C. A. S. O. ; **COSTA, G. M. D.** ; **BABY, A. R.** ; CATALANO, S. P. ; BEDIN, V. . Fotoprotetores e flavonóides potencializadores. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. VELASCO, M. V. R. ; **BABY, A. R.** ; **COSTA, G. M. D.** ; PINTO, C. A. S. O. ; CATALANO, S. P. ; BEDIN, V. . Melasma e Pycnogenol. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
12. ESTEVES, V. ; **COSTA, G. M. D.** ; DARIO, M. F. ; GONCALVES, M. I. A. ; **BABY, A. R.** ; PINTO, C. A. S. O. ; VELASCO, M. V. R. . Sunscreens containing rutin as a photostabilizer: stability study. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
13. ESTEVES, V. B. ; **COSTA, G. M. D.** ; DARIO, M. F. ; GONCALVES, M. I. A. ; **BABY, A. R.** ; PINTO, C. A. S. O. ; VELASCO, M. V. R. . Avaliação da fotoestabilidade de emulsões contendo avobenzone, p-metoxicinamato de octila e rutina. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Bancas

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

1. **COSTA, G. M. D.**. 23º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP - Mostra de Destaques IC/IT - Avaliador Júnior. 2015. Universidade de São Paulo.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 22ª FCE Cosmetique- Exposição Internacional de Tecnologia para a Indústria Cosmética. 2017. (Feira).
2. 30º Congresso Brasileiro de Cosmetologia. 2017. (Congresso).
3. Professores e professoras: Carreiras e Vocações Possíveis. 2017. (Outra).
4. Workshop "O Perfil do Consumidor". 2017. (Outra).
5. Workshop de Biodiversidade. 2017. (Outra).
6. Workshop de Empreendedorismo de Tecnologia. 2017. (Outra).
7. Workshop de Publicação Científica em Química, Bioquímica e afin. 2017. (Outra).
8. 21ª FCE Cosmetique- Exposição Internacional de Tecnologia para a Indústria Cosmética. 2016. (Feira).
9. Fórum de eBooks Elsevier. 2016. (Outra).
10. International Congress of Aesthetic Dermatology and Healthy Aging Medicine. 2016. (Congresso).
11. Treinamento sobre Web of Sciences, Endnote Web, Journal Citation Reports, Essencial Sciences Indicators e InCites. 2016. (Outra).
12. Workshop de Análise Térmica e suas Diversas Aplicações para Estudo e Caracterização dos Materiais do Segmento Farmacêutico. 2016. (Outra).
13. Workshop de Escrita Científica AJE. 2016. (Outra).
14. 20ª FCE Cosmetique- Exposição Internacional de Tecnologia para a Indústria Cosmética. 2015. (Feira).
15. 28º Congresso Brasileiro de Cosmetologia - Associação Brasileira de Cosmetologia (ABC). Estudo de Estabilidade de Emulsões Fotoprotetoras contendo Rutina como Fotoestabilizador. 2015. (Congresso).
16. Curso EPIFAR - Escola de verão: pesquisa e inovação em fármacos e medicamentos. 2015. (Outra).
17. I Colóquio PAE. 2015. (Outra).
18. Workshop de Sensorial - 28º Congresso Brasileiro de Cosmetologia. 2015. (Outra).
19. 19ª FCE Cosmetique- Exposição Internacional de Tecnologia para a Indústria Cosmética. 2014. (Feira).
20. Workshop em Boas Práticas e Calibração de Micropipetas Manuais e Eletrônicas- Mettler Toledo. 2014. (Outra).
21. Workshop em Boas Práticas em Medição de pH e Condutividade - Mettler Toledo. 2014. (Outra).
22. 18ª FCE Cosmetique- Exposição Internacional de Tecnologia para a Indústria Cosmética. 2013. (Feira).

23. 5º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas durante a XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Photostability of UV filters evaluated by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. 2013. (Simpósio).
24. Curso "As Fórmulas Secretas do Prof. Maurício Pupo" - 8º CONSULFARMA. 2013. (Outra).
25. Curso "Lançamentos em Ativos Cosméticos e Formulações Inovadoras Para Encantar Seus Médicos?" - 8º CONSULFARMA. 2013. (Outra).
26. Mini curso de Cosmetologia - XVII Congresso Paulista de Farmacêuticos. 2013. (Outra).
27. Workshop em Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos: Atualização e Tendências. 2013. (Outra).
28. XXI Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos-COLAMIQC. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aplicada à quantificação simultânea de filtros solares em fotoprotetores. 2013. (Congresso).
29. 17ª FCE Cosmetique- Exposição Internacional de Tecnologia para a Indústria Cosmética. 2012. (Feira).
30. 4º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas durante a XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. The application of NMR Spectroscopy in the simultaneous determination of chemical sunscreens in topical emulsion. 2012. (Simpósio).
31. Curso de Bioestatística Prática - XXVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica (SUPFAB). 2012. (Outra).
32. Curso de Nanotecnologia - XXVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica (SUPFAB). 2012. (Outra).
33. Oficina de Desenvolvimento de Perfumes - XXVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica (SUPFAB). 2012. (Oficina).
34. Treinamento operacional do Espectrofotômetro Evolution 600 ? Thermo Scientific. 2012. (Outra).
35. 16ª FCE Cosmetique- Exposição Internacional de Tecnologia para a Indústria Cosmética.. 2011. (Feira).
36. Semana Farmacêutica das Faculdades de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas "Oswaldo Cruz". 2011. (Outra).
37. Seminário de Atualização em Cosmetologia. 2011. (Seminário).
38. Seminário de Atualização em Cosmetologia. 2011. (Seminário).
39. 20ª Semana Racine -Congresso de Farmácia e Eventos Integrados. 2010. (Congresso).
40. IV Seminário de Análises Clínicas e Toxicológicas ? CRF. 2010. (Seminário).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **COSTA, G. M. D.;** SOUZA, A. D. F. ; MOTA, G. C. H. F. ; SILVA, J. V. ; MACHADO, K. N. ; SANTOS, N. C. L. ; GONCALVES, P. V. ; SILVA, R. S. ; FERNANDES, T. B. . III Escola de Verão: Pesquisa e Inovação em Fármacos e Medicamentos (EPIFAR). 2017. (Outro).

Inovação

Projetos de pesquisa

Educação e Popularização de C & T

Apresentações de Trabalho

1. **COSTA, G. M. D.;** Ingresso no mestrado. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

ANEXO F- FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9139 - 6881300/1 - Gabriela Maria D'Angelo Costa

Email: gmdcosta@usp.br
Data de Nascimento: 15/08/1992
Cédula de Identidade: RG - 360686163 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutica - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 2015

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 07/07/2015
Início da Contagem de Prazo: 07/07/2015
Data Limite para o Depósito: 08/01/2018
Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Valeria Robles Velasco - 07/07/2015 até o presente. Email: mvrobles@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/07/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 15/08/2016
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017
Impresso em: 05/09/2017 14:38:42

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9139 - 6881300/1 - Gabriela Maria D'Angelo Costa

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5805-2/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	05/08/2015	13/10/2015	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5871-8/2	Análise de Vitaminas em Alimentos: Aspectos Atuais	11/08/2015	22/09/2015	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5777-3/5	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	13/08/2015	25/11/2015	45	3	100	A	N	Concluída
QFL5714-7/1	Introdução à Análise Térmica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/08/2015	04/10/2015	90	6	95	A	N	Concluída
TNM5784-5/2	Preparação Pedagógica para Aperfeiçoamento do Ensino de Ciências (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	05/04/2016	16/05/2016	30	2	90	A	N	Concluída
FBT5776-5/3	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	17/10/2016	30/10/2016	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBF5779-3/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	10/03/2017	19/05/2017	90	6	89	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 05/09/2017 14:38:43

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9139 - 6881300/1 - Gabriela Maria D'Angelo Costa

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
57532	Maria Valeria Robles Velasco	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

impresso em: 05/09/2017 14:38:43