

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**GABRIELLA MIERS**

**LIBERAÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO A PARTIR DE FORMAS FARMACÊUTICAS  
SEMISSÓLIDAS**

**CURITIBA**

**2015**

**GABRIELLA MIERS**

**LIBERAÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO A PARTIR DE FORMAS FARMACÊUTICAS  
SEMISSÓLIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr<sup>o</sup> Itamar Francisco Andrezza  
Co-orientadores: Prof. Dr<sup>a</sup> Mayumi Sato  
Prof. Dr<sup>o</sup> Fábio Seigi Murakami

**CURITIBA**

**2015**

Miers, Gabriella  
Liberação de ácido kójico a partir de formas farmacêuticas semissólidas / Gabriella Miers – Curitiba, 2015.  
99 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Itamar Francisco Andrezza  
Coorientadora: Professora Dra. Mayumi Sato  
Coorientador: Professor Dr. Fábio Seigi Murakami  
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Ácido kójico 2. Espalhabilidade. 3. Liberação *in vitro*. 4. Reologia.  
I. Andrezza, Itamar Francisco. II. Sato, Mayumi. III. Murakami, Fábio Seigi.  
IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

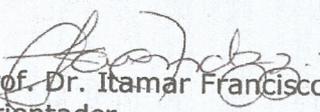
CDD 615.19

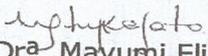
## **TERMO DE APROVAÇÃO**

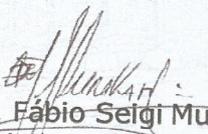
**GABRIELLA MIERS**

**Título: "LIBERAÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO A PARTIR DE FORMAS FARMACÊUTICAS SEMI-SÓLIDAS"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

  
Prof. Dr. Itamar Francisco Andrezza  
Orientador

  
Profa. Dra. Mayumi Eliza Otsuka Sato  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof. Dr. Fábio Seigi Murakami  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 26 de fevereiro de 2015.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas em especial ao professor Itamar, pelo aceite de orientação neste novo desafio e por todo auxílio e conhecimentos transmitidos.

Ao coordenador do Programa pela oportunidade proporcionada e ao secretário do mesmo pela disponibilidade e pronto atendimento.

Às professoras Renata e Marilene pela confiança e carta de recomendação ao programa.

À professora Mayumi e professor Fábio pela colaboração na realização do trabalho.

À Inez pela alegria, amizade e por todas as conversas no laboratório.

À Maria da Graça pelo auxílio e presteza.

Ao professor Rilton e ao BioPol pela ajuda e orientações nas análises reológicas.

Ao CEB em especial à Letícia pela ajuda com os equipamentos.

Ao Gui pela paciência, compreensão e dedicação em todos os momentos.

Aos meus pais, Margareth e Edson, por todo apoio e incentivo.

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

## **EPÍGRAFE**

“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele.  
Por isso o universo de cada um se resume ao tamanho do seu saber”

*Albert Einstein*

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – APLICAÇÃO DO A.K.....	11
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES SEGUNDO SUA FINALIDADE.....	33
TABELA 3- ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SEGUNDO SUA FINALIDADE.....	33
TABELA 4 – FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO.....	34
TABELA 5- FORMULAÇÕES PREPARADAS.....	37
TABELA 6- COMPOSIÇÃO QUALITATIVA DOS VEÍCULOS.....	47
TABELA 7- CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES.....	48
TABELA 8- VALORES DE ESPALHABILIDADE EM FUNÇÃO DO PESO APLICADO.....	48
TABELA 9 – CONCENTRAÇÕES OBTIDAS NA AVALIAÇÃO INTRA-DIA.....	56
TABELA 10- CONCENTRAÇÕES OBTIDAS NA AVALIAÇÃO INTER-DIAS.....	57
TABELA 11- TESTE DE RECUPERAÇÃO.....	58
TABELA 12- VALORES DE t CALCULADO PARA TESTE O DE EXATIDÃO.....	59
TABELA 13- CONCENTRAÇÕES OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DO TEMPO DE LEITURA.....	60
TABELA 14 - QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F1, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA.....	60
TABELA 15- QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F2, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA.....	61
TABELA 16- QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F3, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA.....	61
TABELA 17- QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F4, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA.....	62

TABELA 18 – QUANTIDADE DE A.K. RETIDA SOBRE A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA APÓS O TESTE DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	63
TABELA 19- QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F1, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE.....	66
TABELA 20 - QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F2, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE.....	67
TABELA 21 - QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F3, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE.....	67
TABELA 22 - QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F4, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE.....	68
TABELA 23- QUANTIDADE RETIDA, APÓS O TESTE DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> , COM CADA MEMBRANA.....	69
TABELA 24 – TESTE ESTATÍSTICO (TESTE T) ENTRE A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA E DE ACETATO DE CELULOSE.....	71

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CAMADAS DA PELE E SUAS ESTRUTURAS.....	6
FIGURA 2 – ESQUEMA BIOQUÍMICO DA FORMAÇÃO DE EUMELANINA E FEOMELANINA.....	8
FIGURA 3- ESTRUTURA DO ÁCIDO KÓJICO.....	11
FIGURA 4 – ESTRUTURA DA HIDROQUINONA.....	13
FIGURA 5 – ESTRUTURA DO ÁCIDO RETINÓICO.....	14
FIGURA 6 – ESTRUTURA DO ÁCIDO GLICÓLICO.....	14
FIGURA 7 – ESTRUTURA DO ÁCIDO AZELÁICO.....	15
FIGURA 8 – ESTRUTURA DO ÁCIDO SALICÍLICO.....	16
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ROTAS DE PENETRAÇÃO DE ATIVOS.....	17
FIGURA 10- AÇÃO DOS PROMOTORES DE PENETRAÇÃO NOS LIPÍDIOS INTERCELULARES.....	20
FIGURA 11- PERFIL DE VISCOSIDADE DE FLUIDOS COM COMPORTAMENTO NEWTONIANO E NÃO-NEWTONIANO, A REPRESENTA UM FLUIDO NEWTONIANO, B PSEUDOPLÁSTICO, C PLÁSTICO E D DILATANTE.....	26
FIGURA 12- CÉLULA DE DIFUSÃO DE FRANZ.....	30
FIGURA 13- DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE.....	39
FIGURA 14- EQUIPAMENTO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	43
FIGURA 15- DESENHO EXPERIMENTAL DA DISPOSIÇÃO DAS CÉLULAS NO TESTE DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	44
FIGURA 16- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MONTAGEM DA CÉLULA DE LIBERAÇÃO.....	45
FIGURA 17- ESPALHABILIDADE MÉDIA DAS FORMULAÇÕES EM FUNÇÃO DO PESO ADICIONADO.....	49

FIGURA 18- VARREDURA DE TENSÃO NA FREQUÊNCIA DE 0,05Hz.....	50
FIGURA 19- VARREDURA DE TENSÃO NA FREQUÊNCIA DE 10Hz.....	51
FIGURA 20- VARREDURA DE FREQUÊNCIA DA F1.....	52
FIGURA 21- VARREDURA DE FREQUÊNCIA DA F2.....	52
FIGURA 22- VARREDURA DE FREQUÊNCIA DA F3.....	53
FIGURA 23- VARREDURA DE FREQUÊNCIA DA F4.....	53
FIGURA 24- VISCOSIDADE ABSOLUTA DAS FORMULAÇÕES.....	54
FIGURA 25- CURVA PADRÃO DE A.K.....	56
FIGURA 26- ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV-VIS DA SOLUÇÃO DE 1µg/mL DA BASE EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4.....	58
FIGURA 27- PORCENTAGEM DE A.K. LIBERADA EM CADA COLETA, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA.....	63
FIGURA 28- RELAÇÃO ENTRE PORCENTAGEM DE A.K LIBERADA COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA E VISCOSIDADE DAS FORMULAÇÕES.....	65
FIGURA 29- QUANTIDADE LIBERADA EM FUNÇÃO DA $\sqrt{t}$ COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA UTILIZANDO OS PONTOS DE COLETA DE 0,25h A 3HORAS.....	66
FIGURA 30- PORCENTAGEM DE A.K. LIBERADA EM CADA COLETA, UTILIZANDO MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE.....	69
FIGURA 31- RELAÇÃO ENTRE PORCENTAGEM DE A.K LIBERADA COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE E VISCOSIDADE DAS FORMULAÇÕES.....	70
FIGURA 32- QUANTIDADE LIBERADA EM FUNÇÃO DA $\sqrt{t}$ COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA UTILIZANDO OS PONTOS DE COLETA DE 0,25h A 3HORAS.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A.K	Ácido Kójico
Ei	Espalhabilidade da amostra para peso i ( $\text{mm}^2$ )
R	Coefficiente de correlação
$R^2$	Coefficiente de determinação
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
DPR	Desvio padrão relativo
VDC	Célula de difusão vertical

## RESUMO

O melasma é caracterizado pelo aumento de melanina, cujo tratamento se faz com a utilização de agentes despigmentantes como o ácido kójico. As farmácias magistrais preparam formulações contendo este ativo a partir de bases pré-elaboradas disponíveis no mercado que possuem uma composição de excipientes bastante diversas, proporcionando preparações tópicas com constituição e consistência diferenciadas. As características físico-químicas da formulação interferem na liberação do ativo, etapa primordial para o fármaco atingir seu local de ação. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo preparar quatro diferentes formulações a partir de bases magistrais comerciais, avaliando suas características reológicas, espalhabilidade e a liberação *in vitro* de ácido kójico. As formulações foram preparadas com veículos comerciais de grande utilização como a base Lanette N®, base não-iônica e uma base comercial composta por fosfolipídios. As formulações apresentaram comportamento de espalhabilidade semelhantes, sendo maior quanto maior o peso adicionado. Na reologia evidenciou-se a característica pseudoplástica em todas as formulações com  $G'$  (módulo de armazenamento) superior a  $G''$  (módulo de perda). A validação da metodologia foi realizada em ultravioleta-visível em 269nm, em solução tampão fosfato pH 7,4, levando-se em consideração os aspectos do teste de liberação *in vitro*, obtendo-se linearidade, precisão, exatidão e robustez para o método. Diferentes comportamentos de liberação do fármaco foram obtidos, sendo que a F4, composta por base com fosfolipídios, apresentou a maior liberação, seguido da F3, F2 (base não iônica) e F1(base Lanette N®) com a menor taxa de liberação do ácido kójico. Observou-se uma relação entre a taxa de liberação e a viscosidade, sendo que quanto menor a viscosidade maior a taxa de liberação do fármaco. As membranas de polietersulfona e acetato de celulose não apresentaram diferença estatística significativa ( $p$ -value > 0,05) de liberação do ácido kójico, sugerindo-se a intercambialidade das mesmas para o estudo do fármaco.

**Palavras-chave:** ácido kójico, espalhabilidade, liberação *in vitro*, reologia.

## ABSTRACT

The melasma is characterized by the increase in melanina and its treatment is by topical with depigmentation agents like kojic acid. The dosage form containing this isolated pharmaco are generally prepared in pharmacies from prebuilt bases available in the market with a very diverse composition, providing differentiated and varied topical preparations. The physicochemical characteristics of the formulation influences on the release of the drug, primordial stage for it to reach the site of action. In this context, the present work aimed to assess the *in vitro* release of kojic acid. The formulations were prepared with commercial vehicles, base Lanette N®, non-ionic base and a commercial base consists of phospholipids. The formulations showed similar behavior spreadability, being greater with the weight added. In the rheology characteristic is evidenced the pseudoplastic behavior in all formulations with  $G'$  (elastic modulus) greater than  $G''$  (viscous modulus). The validation of the method was performed in an ultraviolet-visible at 269nm, in phosphate buffer pH 7.4, resulting in linearity, precision, accuracy and robustness to the method. Different drug release behavior was obtained, and F4, base consisted of phospholipids, showed the greatest release, followed by the F3, F2 (non-ionic base) and F1 (Lanette N®) with a lower rate release of kojic acid. The membranes of polyethersulfone and cellulose acetate showed no statistically significant difference ( $p$ -value > 0.05) release of kojic acid, suggesting the interchangeability.

**Key words:** kojic acid, spreadability, *in vitro* release test, rheology.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
3.1 Pele.....	4
3.1.1 Funções da pele.....	6
3.1.1.1 Função melanogênica.....	6
3.2 Discromias.....	9
3.2.1 Hipocromias.....	9
3.2.2 Leucomelanodermias.....	9
3.2.3 Hiper Cromias.....	9
3.2.3.1 Melasma.....	10
3.3 AGENTES DEPIGMENTANTES.....	10
3.3.1 Ácido Kójico.....	11
3.3.2 Hidroquinona.....	13
3.3.3 Ácido retinóico.....	14
3.3.4 Ácido glicólico.....	14
3.3.5 Ácido azelaico.....	15
3.3.6 Ácido salicílico.....	16
3.4 PENETRAÇÃO DE FÁRMACOS NA PELE.....	16
3.4.1 Substâncias que promovem a absorção cutânea.....	18
3.5 ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS ATRAVÉS DA VIA TÓPICA.....	20
3.6 FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS.....	21

3.7 REOLOGIA.....	25
3.8 TESTE DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	29
3.9 VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	32
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	36
4.1.1 Materiais e Reagentes.....	36
4.1.2 Equipamentos.....	36
4.2 PREPARO DAS FORMULAÇÕES.....	37
4.3 DETERMINAÇÃO DO pH.....	37
4.4 DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE.....	38
4.5 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA.....	39
4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	40
4.6.1 Linearidade.....	40
4.6.2 Precisão.....	40
4.6.2.1 Repetitividade.....	40
4.6.2.2 Precisão Intermediária.....	41
4.6.3 Exatidão.....	41
4.6.4 Robustez.....	42
4.6.4.1 Influência do tempo de leitura na intensidade de absorção.....	42
4.7 ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	42
4.7.1 Solução Receptora.....	43
4.7.1.1 Teste de Solubilidade.....	43
4.7.2 Preparo da amostra.....	44
4.7.3 Preparo das membranas.....	44
4.7.4 Preparo do aparato.....	44
4.7.5 Execução do ensaio.....	44

4.7.6 Cálculo da velocidade de liberação <i>in vitro</i> .....	46
4.7.7 Comparação das velocidade de liberação <i>in vitro</i> entre as membranas.....	46
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>47</b>
5.1 FORMULAÇÕES.....	47
5.2 DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE.....	48
5.3 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA.....	50
5.3.1 Varredura de tensão.....	50
5.3.2 Varredura de frequência.....	51
5.3.2.1 Viscosidade absoluta.....	54
5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	55
5.4.1 Linearidade.....	55
5.4.2 Precisão.....	56
5.4.2.1 Repetitividade.....	56
5.4.2.2 Precisão intermediária.....	57
5.4.3 Exatidão.....	57
5.4.4 Robustez.....	59
5.4.4.1 Influência do tempo de leitura na intensidade de absorção.....	59
5.5 ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	60
5.5.1 Liberação <i>in vitro</i> com a membrana de polietersulfona.....	60
5.5.1.1 Cálculo de velocidade de liberação com a membrana de polietersulfona.....	65
5.5.2 Liberação <i>in vitro</i> com a membrana de acetato de celulose.....	66
5.5.2.1 Cálculo de velocidade de liberação com a membrana de acetato de celulose.....	70
5.5.3 Comparação das velocidade de liberação <i>in vitro</i> entre a membrana de polietersulfona e acetato de celulose.....	71
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A área de dermocosméticos está em rápida expansão, há uma elevada demanda por tratamentos tópicos em um mundo globalizado onde a preocupação com a aparência física tornou-se um aspecto de grande importância.

As discromias são alterações na coloração normal da pele, resultados de diferenças quantitativas de pigmento melanina. São patologias que geram máculas principalmente na face afetando a aparência do paciente, podendo causar transtornos a nível psicológico. O melasma é discromia desencadeada pelas radiações solares, hormônios sexuais ou agentes externos (fonte de radicais livres). O tratamento é feito basicamente por via tópica com agentes despigmentantes como o ácido kójico. Substância natural produzida por vários tipos de fungos e bactérias, entre elas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter*. O ácido kójico apresenta ação antimicrobiana e quelante de íons cobre, atua inibindo lentamente e reversivelmente a tirosinase reduzindo assim a eumelanina (BENTLEY, 2006).

Produtos industriais apresentam na composição o ácido kójico associado a outros agentes despigmentantes com o ácido glicólico e fítico. A administração de forma isolado do ácido kójico é possível através de formas farmacêuticas emulsionadas preparadas em farmácias de manipulação, a partir de bases pré-elaboradas industrialmente, proporcionando preparações tópicas com constituição e consistência diversas.

As características físico-químicas de uma emulsão, como o teor de água e as características reológicas são consequências da constituição da formulação, dos excipientes, e influenciam diretamente na liberação do ativo. Esta é a etapa inicial e fundamental para que então o fármaco entre em contato com a superfície celular e permeie pelo estrato córneo para atingir seu local de ação.

Através de teste de liberação *in vitro* é possível quantificar o ativo liberado do seu veículo. Este teste é aplicado no desenvolvimento de produtos e no controle de qualidade de rotina.

O fármaco se difunde, nos estudos *in vitro*, através de uma membrana sintética ou biológica para uma solução receptora, onde é feita a determinação analítica do conteúdo liberado ao longo do tempo. A Farmacopéia Americana sugere o uso de células de difusão vertical para ensaio de desempenho de produtos tópicos (UEDA *et al.*, 2009). Entre as células de difusão vertical, o modelo de Franz é o mais utilizado, apresenta como característica a

bicompartmentalização, possuindo um compartimento para o fármaco e outra para a solução receptora, separados por uma membrana.

Os testes de liberação *in vitro* constituem uma ferramenta que auxilia no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos tópicos, a fim de selecionar bases que proporcionem liberação e atividade terapêutica adequada do ativo, visto a grande variedade de veículos e adjuvantes disponíveis no mercado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a liberação do ácido kójico de formas farmacêuticas semissólidas emulsionadas preparadas com bases magistrais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar formulações com ácido kójico utilizando como veículo bases pré-elaboradas;
- Avaliar as características reológicas das preparações;
- Avaliar a espalhabilidade das formulações;
- Validar metodologia para a quantificação de ácido kójico em sistemas emulsionados;
- Avaliar a influência da formulação na liberação *in vitro* do ácido kójico;
- Avaliar a liberação *in vitro* do ácido kójico com a membrana de acetato de celulose e polietersulfona.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 PELE

A pele apresenta espessura variável de 1 a 4 mm, área total no adulto de aproximadamente  $2m^2$  e é composta por tecidos distintos mutuamente dependentes. Apresenta-se mais espessa nas superfícies dorsais e extensoras do corpo do que nas ventrais e flexoras e mais distensíveis no dorso da mão. O fator etário condiciona a espessura da pele e a elasticidade da mesma (DANGELO *et al.*, 2000). A pele apresenta diversas funções como: mecânica, barreira, receptora de estímulos externos, reguladora da temperatura corporal, síntese, metabolização e secreção de substâncias (BARRY, 1983).

A epiderme pode variar de espessura de acordo com a região do corpo, sendo mais fina ao redor dos olhos e mais espessa nas palmas das mãos e planta dos pés. Encontra-se estratificada, sendo formada pelo estrato córneo, lúcido, granuloso, germinativo e camada basal, renovando-se entre 14 e 30 dias, dependendo da região da pele sendo que as células produzidas nos estratos mais profundos sofrem um processo de corneificação à medida que atingem os estratos mais superficiais, sendo as células da epiderme continuamente substituídas e convertidas em camadas de queratina (BARRY, 1983; DANGELO *et al.*, 2000).

A epiderme é composta basicamente de três tipos de células: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans. Os queratinócitos ou células escamosas produzem queratina, proteína estrutural dos pelos e unhas, além de ser um complexo filamentos proteico que forma o estrato córneo. Os melanócitos são as células de pigmentação da epiderme que produzem melanina e as células de Langerhans exercem seu papel na indução de rejeição ao enxerto, na sensibilização e na imunovigilância (ARNOLD, ODOM, JAMES, 1994).

O estrato córneo é a camada mais superficial, com apenas 15 a 20  $\mu m$  de espessura, onde as células estão em estágio final de diferenciação (MARTINS, VEIGA, 2002). Esta camada é a barreira da pele, sendo formada por uma estrutura bifásica de lipídeo-proteína, composta por células anucleadas (corneócitos) e dispersas em uma matriz rica em lipídeos não polares. A matriz é constituída principalmente por ceramidas (18%), ácidos graxos livres (19%), esteróides (14%) e triacilgliceróis (25%), representando uma região importante no controle da absorção cutânea de fármacos (GRATIERI *et al.*, 2008).

O estrato lúcido é a camada pobre em hialina, presente nas palmas das mãos e plantas dos pés. Os percussores de queratina são produzidos pelos grânulos de queratohialina, presentes no estrato granuloso, que consiste em 3 a 5 camadas de queratinócitos achatados, sendo esta a camada mais superficial em que as células ainda possuem núcleo. No estrato germinativo observam-se alterações morfológicas e histoquímicas das células e a camada basal localiza-se na junção dermo-epidermal, onde ocorrem constantes mitoses para a renovação da epiderme e é a camada onde os melanócitos estão presentes.

A derme, mais espessa que a epiderme, localiza-se sobre a hipoderme sendo composta pelas camadas papilar e reticular, irrigada com extensas redes capilares, rica em fibras colágenas e elásticas (75% de colágeno, 4% de elastina e 0,4% de reticulina), envolvidas em mucopolissacarídeos, conferindo à pele a capacidade de distender quando tracionada, além de possuir elementos neuronais para percepção de toque, dor, coceira e temperatura (BARRY, 1983).

As glândulas sudoríparas e sebáceas localizam-se na derme. As primeiras, possuem um longo ducto excretor que atravessa a epiderme, apresentando importante função na regulação da temperatura corporal, pois o suor secretado por elas absorve calor por evaporação da água. As glândulas sebáceas se abrem em folículos pilosos e secretam sebo, lubrificando a pele e os pelos (DANGELO *et al.*, 2000).

A hipoderme ou tecido subcutâneo localizado abaixo da derme, é formada por células adiposas unidas por fibras de colágeno e desempenha as funções de amortecedor mecânico, barreira térmica e estoque de energia. Contém o maior número de vasos sanguíneos da pele. (AULTON, 2005).

A pele íntegra apresenta o pH entre 5,5 e 7 de acordo com a região do corpo, sendo mantido por um sistema tampão de ácido láctico/lactato pelos ácidos do suor, sebo e elementos ácidos da queratina (PRISTA *et al.*, 2003). Devido à produção de ácido láctico ocorre a formação de um “manto ácido cutâneo” conferindo à superfície cutânea ação bactericida e fungicida.

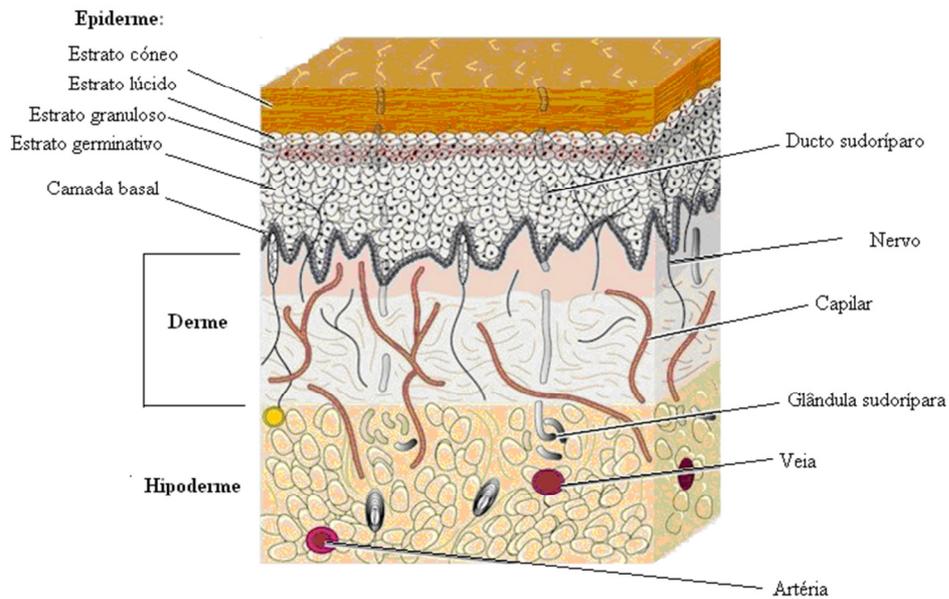


FIGURA 1 – CAMADAS DA PELE E SUAS ESTRUTURAS  
 FONTE: ADAPTADO DE MEDICALLY SPEAKING, 2010.

### 3.1.1 Funções da pele

A pele, como órgão, desempenha diversas funções gerais e específicas como a recepção de estímulos externos como tato, calor e dor; síntese e metabolização de substâncias; secreção de suor, sebo e hormônios, além de apresentar a função barreira, protegendo contra a entrada de microrganismos, substâncias químicas, radiação, calor e choque mecânico, considerados funções gerais da pele. As funções específicas estão relacionadas com a síntese de suor, sebo, queratinócitos e melanina (BARRY, 1983).

#### 3.1.1.1 Função Melanogênica

O principal determinante para a cor da pele é a melanina, porém ainda há dependência da hemoglobina dos vasos sanguíneos e dos pigmentos exógenos amarelos, os carotenoides.

As melaninas são encontradas em praticamente todos os tecidos vivos na forma insolúvel, sendo um grupo de biopolímeros heterogêneos, pigmentados, polifenólicos de alto peso molecular. Produzidas nos seres humanos pelos melanócitos na forma de eumelanina e feomelanina, com distintas propriedades físicas e biológicas, sendo responsável pela coloração da pele, cabelos e olhos. A principal função da melanina é a proteção solar do genoma celular contra os efeitos nocivos da radiação UV, além de neutralizar radicais livres e

superóxidos, protege contra afecções actínicas, previne câncer de pele, minimiza o impacto de radiações solares e regulação da síntese de vitamina D (CHARLET, 1996).

A eumelanina é um pigmento solúvel, resultante da polimerização oxidativa de compostos indólicos, de coloração variando do marrom ao preto e contém pequena quantidade de enxofre, absorve e dispersa a luz ultravioleta, reduzindo os efeitos nocivos do sol. (VIGLIOGLIA, 1989).

A Feomelanina apresenta coloração variável de amarelo a marrom avermelhado, resultado da polimerização da cistenildopa e produtos de ciclização. É facilmente degradada pela radiação UV, sendo menos fotoestável que a eumelanina e apresenta grande potencial em gerar radicais livres, em resposta à radiação ultravioleta. Pessoas com pele mais clara apresentam uma quantidade maior de feomelanina, sendo assim apresentam um risco maior ao dano epidérmico induzido por radiação ultravioleta. A eumelanina e a feomelanina raramente encontram-se isoladas, formam-se ambas em diferentes proporções durante a melanogênese surgindo diferentes tonalidades de cores de pele (NORLUND *et al.*, 1989).

Os melanócitos são células dendríticas, derivadas embriologicamente dos melanoblastos, e geralmente estão localizados na camada basal e, ocasionalmente, na derme. A quantidade de melanócito varia de acordo com a área e não de acordo com raça, sendo a diferença de cor de pele resultado da capacidade funcional do melanócito e na proporção dos subtipos de melanina formados (eumelanina e feomelanina). Na região da cabeça e antebraço existem em torno de 2000 melanócitos/mm<sup>2</sup>, enquanto que no restante do tegumento cerca de 1000 melanócitos/mm<sup>2</sup> (SAMPAIO, RIVITTI, 1998).

No melanócito, a síntese de melanossomos se inicia no retículo endoplasmático rugoso assim como a síntese do complexo tirosinase. Já no complexo de Golgi, na presença de cobre, a tirosinase é ativada formando vesículas citoplasmáticas que se unirão aos melanossomos e ocorrerá a síntese de melanina, sendo o cobre o cofator mais relevante. A síntese de melanina ocorre exclusivamente no melanossomos, dependendo de diversos genes (ORDIZ, 2003).

A síntese de melanina, ou melanogênese, apresenta 3 fases distintas: a formação de cisteinildopa, dependente da concentração de cisteína; oxidação da cisteinildopa para formar feomelanina e produção da eumelanina, processo que somente se inicia ao término da cisteinildopa (ORDIZ, 2003).

A tirosina, é o aminoácido inicial e fundamental na síntese de melanina, sofre ação da tirosinase em presença de oxigênio e é transformada em dopa. Esta, novamente pela ação da

tirosinase armazenada nos melanossomas e em presença de oxigênio é degradada em dopaquinonina (JIMBOW *et al.*, 1999).

A presença de cisteína determina o rumo da rota de síntese da melanina. Na ausência da cisteína a dopaquinona é convertida em ciclodopa e em seguida em dopacromo. O dopacromo origina dois complexos : o DHI (dopa,5,6- dihidroxiindol) em maior proporção, e o DHICA (5,6 diidroxindol-2-ácido carboxílico) que são posteriormente oxidados à eumelanina. Enquanto que na presença de cisteína, a dopaquinona gera 5-S-cisteinildopa e 2-S-cisteinildopa. As cisteneinildOPA são oxidadas em intermediários benzotiazínicos e em seguida em feomelanina (ITO, 2003).

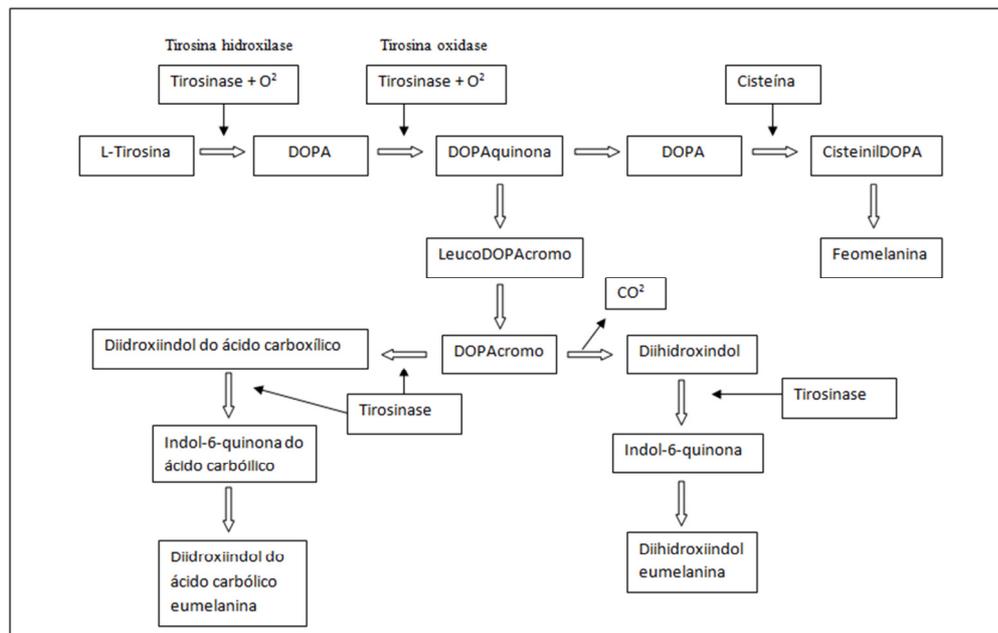


FIGURA 2- ESQUEMA BIOQUÍMICO DA FORMAÇÃO DA EUMELANINA E FEOMELANINA.

FONTE: ADAPTADO SULAIMON *et.al*, 2003

Após a síntese de melanina, os melanossomas são inseridos no interior dos queratinócitos pelo melanócito através de seus prolongamentos dendríticos. Dentro dos queratinócitos, os melanossomas tendem a distribuir-se sobre a parte superior do núcleo, protegendo contra as radiações ultravioletas e o DNA celular. Geralmente a unidade epidérmica da melanina é constituída de trinta e seis queratinócitos para um melanócito, formando uma unidade funcional chamada de “unidade epidermo-melânica” (BOISSY, 1988).

Na camada basal da epiderme e folículo pilo-sebáceo, os melanócitos produzem e secretam, continuamente, melanina para os queratinócitos, cuja atividade diminuída ao longo dos anos (VIGLIOGLIA, 1989).

## 3.2 DISCROMIAS

Discromias são alterações na coloração normal da pele, formando máculas de tonalidade variada e resultados de diferenças quantitativas de pigmentos, melanina. São patologias comuns e dependentes de fatores genéticos e ambientais. Apresentam-se de forma localizada, difusa, regional ou circunscrita no corpo. As desordens pigmentares, locais ou generalizadas são classificadas de acordo com a distribuição anômala de melanina em hipocromias, leucomelanodermias e hiperpigmentações (FONSECA, SOUZA, 1986).

### 3.2.1 Hipocromias

Hipocromias, também conhecidas como hipopigmentação, hipomelanose ou leucomelanodermias, caracterizam-se pela diminuição ou ausência de melanina, que resultam da ausência de melanócito e problemas na formação e transferência dos melanosomos para os queratinócitos, levando a produção insuficiente de melanina. A hipopigmentação também pode estar associada à falta de vitamina B (LEITE JR, 2000).

### 3.2.2 Leucomelanodermias

As leucomelanodermias são associações de hipocromias e hiperpigmentações, caracterizadas por manchas brancas de diferentes formatos com total ausência de melanina, envoltas por uma zona hiperpigmentada (FITZPATRICK, 1983).

### 3.2.3 Hiperpigmentações

As hiperpigmentações, hiperpigmentação ou hipermelanoses surgem devido a fatores externos ou endógenos que levam a uma produção excessiva de melanina dérmica. O depósito de melanina e o melanócito podem estar normais ou aumentados (LEITE JR, 2000).

### 3.2.3.1 Melasma

Entre as hiperpigmentações, a mais comum é a formação do melasma, um distúrbio adquirido pigmentar comum, caracterizado por máculas castanhas, contornos irregulares, comum em áreas fotoexpostas como face, pálpebras e membros superiores. Pode acometer ambos os sexos e todas as raças, porém é mais comum em mulheres adultas em idade fértil, representando apenas 10% dos casos no sexo masculino (RENDON *et al.*, 2006).

Mais evidente em fototipos intermediários e indivíduos de origem oriental ou hispânica, particularmente os tipos de pele Fitzpatrick IV e VI. Caracteriza-se como uma anormalidade comum e benigna. Para combater e reverter as alterações estéticas utilizam-se despigmentantes ou agentes clareadores tópicos e seu controle com o uso de fotoprotetores (GUEVARA, PANDYA, 2001).

Existem três tipos de melasma; o epidermal (marrom), dermal (acinzentado) e misto (azulado). Esta caracterização determina a conduta no tratamento, pois o misto não responde ao tratamento com agentes despigmentantes.

Há inúmeros fatores associados ao desenvolvimento do melasma, como: exposição à radiação ultravioleta, predisposição genética, gravidez, cosméticos, terapias hormonais, fatores emocionais, entre outros. Porém a exposição à radiação ultravioleta e predisposição genética são os fatores mais importantes e frequentemente associados ao aparecimento de melasma (PONZIO, CRUZ, 1993).

## 3. 3 AGENTES DESPIGMENTANTES

Agentes despigmentantes ou hipopigmentantes são produtos destinados a alterar a pigmentação da pele. Atuam sobre os melanócitos, sobre a melanogênese em suas diversas etapas e/ou na transferência de melanina para os queratinócitos (HERMANNNS *et al.*, 2002).

São classificados em categorias de acordo com o seu mecanismo de ação: por inibição direta da atividade da tirosinase; inibição competitiva e não competitiva da tirosinase; supressão da síntese ou maturação da tirosina; toxicidade melanocitária seletiva; esfoliante; adsorção de melanina pré-formada, inibição indireta da tirosinase via quelação de oligoelementos; agentes redutores; estimulação da eliminação da melanina dos queratinócitos e/ou inibição da síntese da tirosinase.

Existem uma grande variedade de agentes despigmentantes no mercado, utilizados isolados ou associados.

### 3.3.1 Ácido Kójico

O ácido kójico (2-hydroxymethyl-5-hydroxy-g-pyrone) possui fórmula molecular  $C_2H_6O_4$  e peso molecular de 142,1. Encontrado na forma de cristais quase brancos a amarelo pálido, apresenta ponto de fusão entre  $151^{\circ}C$  a  $154^{\circ}C$ , sendo solúvel em água, etanol, acetona e acetato de etila e pouco solúvel em éter, álcool etílico, clorofórmio e piridina (BATISTUZZO, *et al.*, 2002).

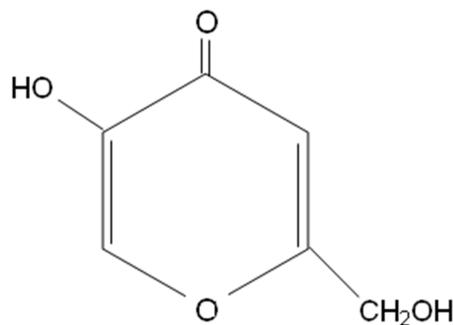


FIGURA 3– ESTRUTURA DO ÁCIDO KÓJICO

O ácido kójico pode ser aplicado em diversas funções na área medicinal, de alimentos, agricultura, cosméticos e química a Tabela 1 apresenta suas principais aplicações

TABELA 1 - APLICAÇÕES DO A.K.

Área	Função
Medicina	Antibacteriano
	Antifúngico
	Analgésico
Alimentos	Intensificador de sabor
	Antioxidante
Agricultura	Anti-melanose
	Ativador de inseticida
	Agente clareador

<b>Cosméticos/ Fármacos</b>	Inibidor da tirosinase
	Anti-radicais livres
	Agente radioprotetor
	Filtro ultravioleta
<b>Química</b>	Reagente para determinação do ferro
	Síntese de 2-metil-4-pirona
	Quelante de ferro
	Conjugados ácido kójico-quitosona

FONTE: MOHAMED, *et al.*, 2010.

O ácido kójico foi descoberto no Japão por Saito em 1907, que isolou o “novo” composto de uma cultura de *Aspergillus oryzae*, sendo considerado um dos primeiros metabólitos secundário de fungos isolados e de interesse industrial. Em 1912, Yabuta foi responsável por nomear o composto de “koji” e observou que apresentava fraco poder antisséptico em fungos e leveduras, sendo o crescimento bacteriano interrompido quando a concentração de ácido kójico era de 0,5% (BENTLEY, 2006).

Saruno *et.al.*, 1979 observou que a cultura de *A.albus* inibia a atividade da tirosinase, o inibidor foi extraído, filtrado e identificado como ácido kójico, o responsável pela redução da indução da eumelanina em células de hiperpigmentação (BENTLEY, 2006).

Produzido biologicamente como produto secundário do metabolismo de diversas espécies de *Aspergillus*: *A.alliaceus*, *A. awamori*, *A. arachidicola*, *A.bombycis*, *A. caelatus*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. effusus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A giganteus*, *A. glaucus*, *A. gymnosardae*, *A. leporis*, *A. luteovirescens*, *A lutescens*, *A. minisclerotigens*, *A. nidulans*, *A. nominus*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudotamarii*, *A. tamarisii* e *A.wentii*. Também como produto secundário do metabolismo de diversas cepas de *Penicillium* e *Acetobacter* (BENTLEY, 2006).

Compostos com fontes de carbono também podem ser utilizados para a produção de ácido kójico, como o etanol, ácido glicólico, dihidroxiacetona, lactato, piruvato, ácido tartárico, gluconolactona, ácido glucônico, manitol, sorbitol, além de materiais com estrutura mais complexa como arroz, batata-doce, trigo, centeio e aveia. O mercado de produção de ácido kójico vem se desenvolvendo desde 1955, quando Charles Pfizer and Company, anunciaram a primeira produção deste ácido orgânico, contudo, o processo industrial de produção ainda está sendo estudado extensivamente (MOHAMED, *et al.*, 2010).

A atividade inibitória da tirosinase, enzima limitante na biosíntese do pigmento melanina, o efeito inibidor da melanogênese e a capacidade de alterar os melanócitos em não dendríticos, naturalmente desencadeou o uso do ácido kójico como agente clareador da pele e seu uso com essa finalidade foi aprovado primeiramente pelas autoridades de saúde no Japão em 1988 (BENTLEY, 2006).

Atualmente é muito utilizado como agente despigmentante, formulado em cremes e emulsões fluidas não iônicas, géis, géis-cremes e loções aquosas na concentração de 1% a 3%. Amplamente utilizado por não causar irritação e fotosensibilização, possibilitando seu uso inclusive de dia. Sua presença pode ser associada a outros clareadores como o ácido glicólico e prolonga a vida útil do produto por não sofrer oxidação e retardar tanto a degradação química como microbiana (BATISTUZZO, *et al.*, 2002).

### 3.3.2 Hidroquinona

A 1,4-benzenodiol é um agente despigmentante da pele, comercializado como cristais em forma de agulha, incolores ou brancos de sabor adocicado e escurece quando em contato com o ar e a luz, A hidroquinona atua como um substrato da tirosinase, competindo com a tirosina e inibindo a oxidação a DOPA, além de diminuir a melanina cutânea através da toxicidade melanocitária, acelerando a degradação dos melanócitos (CHARLET,1996).

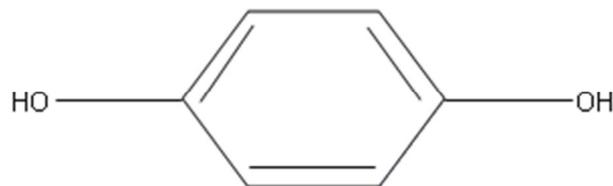


FIGURA 4- ESTRUTURA DA HIDROQUINONA

Sua concentração pode variar de 2 a 10%, porém, por ser irritante deve-se evitar aplicar em áreas com lesões próximos aos olhos ou em crianças. Devido a sua toxicidade mutagênica e citotóxica pode causar irritações cutâneas, como queimação e vermelhidão, altas concentrações podem levar a ocronose em uso contínuo, sendo sua utilização proibida nos Estados Unidos. (PETIT, PIERARD, 2003).

### 3.3.3 Ácido retinóico

O ácido retinóico também chamado de tretinoína, é a forma ácida da vitamina A. Age sobre os melanossomos, acelerando a renovação celular e diminuindo a ação da collagenase. Geralmente é utilizado associado à hidroquinona, por isoladamente ser um fraco agente despigmentante. Sua concentração usual varia de 0,01 a 0,1 %, podendo apresentar efeito teratogênico (PETIT, PIERARD, 2003).

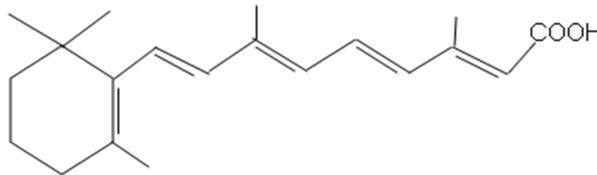


FIGURA 5 – ESTRUTURA DO ÁCIDO RETINÓICO

### 3.3.4 Ácido glicólico

O ácido glicólico pertence a “família” dos alfa hidroxí ácidos (AHAs), atua esfoliando a pele e melhorando os transtornos de pigmentação. Geralmente utilizado na concentração de 8 a 12%, quando isolado e de 5 a 10% quando associado com outro agente despigmentante (ARCHIPRE,1996).

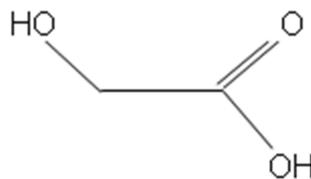


FIGURA 6- ESTRUTURA DO ÁCIDO GLICÓLICO

Os alfa hidroxí ácidos apresentam diversas funções, além da ação clareadora, atuam hidratando, como antioxidante além de estimular a renovação da camada córnea e síntese de colágeno.

Quando aplicados sobre a pele em concentrações elevadas provocam a liberação de queratinócitos e a epidermólise, e quando aplicados em concentrações baixas reduzem a coesão entre os corneócitos e causam evidente descamação da camada córnea (CAMPOS, *et al.*, 1999).

Sua atividade está diretamente relacionada ao valor de pH, sendo que devem estar na forma ácida para serem eficazes na promoção da esfoliação e renovação celular. A redução do pH provoca a máxima ação de certas enzimas, resultando em um aumento da proliferação celular e diferenciação (CATEC, 2001).

### 3.3.5 Ácido azelaico

O ácido azeláico é o nome usual para o composto dicarboxílico denominado ácido mononodióico, é um ácido graxo saturado de elevado peso molecular, atua inibindo competitivamente a tirosinase.

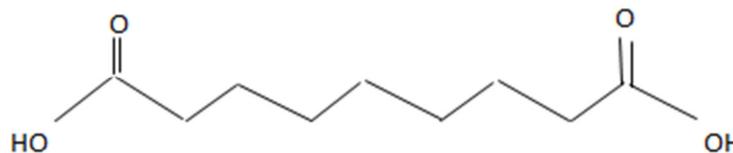


FIGURA 7 - ESTRUTURA DO ÁCIDO AZELÁICO

Além do efeito despigmentante, atua como antibacteriano (contra o *Staphylococcus epidermidis* e o *Propionibacterium acnes*); antiinflamatório; reduz o nível de lipídeos da superfície da pele e controla o ciclo de renovação celular dentro do folículo piloso, evitando seu bloqueio por material queratinoso, possuindo também ação anticomedogênica (FITTON, 1991).

Utilizado nas concentrações de 10 a 20 % em cremes e loções, pode entretanto ocasionar ardor, queimação, prurido e eritema. Não se encontram relatados dos efeitos adversos sistêmicos, podendo ser utilizado topicamente nos meses de maior insolação, na gravidez e lactação, e por períodos bastante prolongados (DERMAGE, 2014).

### 3.3.6 Ácido salicílico

O ácido salicílico é um  $\beta$ -hidroxiácido encontrado na casca do salgueiro e apresenta propriedades queratolíticas.

Utilizado topicamente para o tratamento de patologias com escamação da pele como dermatite seborreica, psoríase, ictiose, além de apresentar ação antifúngica. Seu uso mais comum é no tratamento da acne, porém, por ser um agente de descamação, promovendo a remoção do estrato córneo reduzindo assim as manchas mais superficiais e promovendo um aspecto mais uniforme na pele (FAGRON, 2014).

Com a finalidade queratolítica, o ácido salicílico é utilizado em concentração acima de 2% e pode estar associado a outros agentes clareadores potencializando a ação dos mesmos (MAPRIC, 2014).

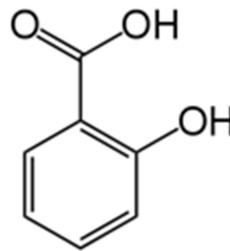


FIGURA 8 - ESTRUTURA DO ÁCIDO SALICÍLICO

### 3.4 PENETRAÇÃO DE FÁRMACOS NA PELE

A epiderme comporta-se como uma barreira lipídica, poucos fármacos conseguem penetrar através da pele íntegra. Os que penetram, sua absorção é proporcional à área da superfície sobre a qual são aplicados e à sua lipossolubilidade. No entanto a derme é livremente permeável a muitos solutos, como consequência a absorção sistêmica de drogas é muito mais rápida pela pele danificada. A inflamação aumenta o fluxo sanguíneo cutâneo, potencializando também a absorção (GOODMAN, GILMAN, 1996).

O fator determinante para o fármaco penetrar nas diversas camadas da pele é a liberação da substância ativa do veículo e difusão. A pele e seus apêndices regulam a entrada

de substâncias externas no organismo, podendo ocorrer a penetração pela via transepidérmica e via apêndices (BARRY, 1983).

A via transepidérmica é a principal via de permeação de fármacos, envolvendo a difusão pelo estrato córneo, através de duas diferentes vias, a intercelular e a transcelular. Na via intercelular, rota mais frequente de permeação, o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos permanecendo constante dentro da matriz lipídica. Na via transcelular, o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular intermediária (GRATIERI *et al.*, 2008; BARRY, 2004; MARTINS, VEIGA, 2002).

A via apêndice é representada pelo folículo pilosebáceo e poros, constitui apenas 0,1% da pele, sendo essa via de permeação menos expressiva (MARTINS, VEIGA, 2002). A Figura 9 é uma representação esquemática da pele das diferentes rotas de penetração de ativos.

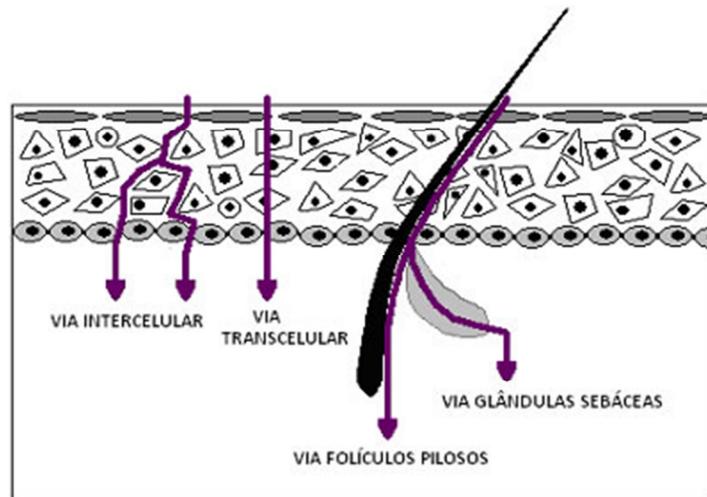


FIGURA 9- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ROTAS DE PENETRAÇÃO DE ATIVOS  
FONTE: RAFFIN, 2010

A permeação de fármacos através do estrato córneo pode ser descrita pela primeira lei de Fick, a qual pode ser simplificada em (HADGRAFT, 1999):

$$J = \frac{DK\Delta c}{h}$$

Onde:

J: é o fluxo de fármaco por unidade de área

D: é o coeficiente de difusão na pele

K: é o coeficiente de partição entre a pele e o veículo

$\Delta c$ : é a diferença de concentração do fármaco entre o veículo e a pele

h: distância difusional a ser percorrida (espessura da pele)

O coeficiente de partição (K) é a razão da solubilidade do fármaco na pele ( $S_p$ ) pela solubilidade do fármaco no veículo ( $S_v$ ):

$$K = \frac{S_p}{S_v}$$

O fluxo de fármaco através da pele, J, aumenta com o incremento do coeficiente de difusão do fármaco na pele (D), com a solubilidade do fármaco na pele ( $S_p$ ), com o aumento de concentração de fármaco no veículo ( $\Delta c$ ) ou com o decréscimo da sua solubilidade no veículo ( $S_v$ ) (MARTINS, VEIGA, 2002).

#### 3.4.1 Substâncias que promovem a absorção cutânea

A pele humana é notavelmente uma eficiente barreira, causando dificuldades na liberação de agentes terapêuticos. A maioria dos fármacos necessita permear o estrato córneo para alcançar seu local de ação, sendo assim, a utilização de fármacos tópicos está limitada pela capacidade deste de ultrapassar a barreira da pele. A fim de aumentar a efetividade de medicamentos tópicos, observam-se estudos e utilização crescente de substâncias químicas capazes de potencializar a penetração de fármacos (BARRY *et al.*, 2004).

Os potencializadores de penetração são substâncias químicas, farmacologicamente inativas, que interagem com os constituintes da pele para promover um fluxo aumentado de fármaco, diminuindo a resistência da pele à difusão da substância ativa. Atualmente uma grande variedade de substâncias químicas estão sendo avaliadas como potencializadores de penetração ou promotores de absorção, ainda que suas inclusões em formulações tópicas ou transdermais é limitada, uma vez que os mecanismos de ação desses agentes não estão definidos com clareza. Modificações físico-químicas, uso de tensoativos, lipossomas, métodos elétricos, aplicação de ultrassom e terapia gênica, também podem ser utilizados para aumentar a liberação de fármacos (MARTINS, VEIGA, 2002; BARRY *et al.*, 2004).

O promotor de permeação ideal deve ser farmacologicamente inerte, não tóxico, de ação imediata, não irritante, não alérgico, de ação reversível, química e fisicamente compatível com o fármaco e excipientes, aceitável cosmeticamente, inodoro, insípido, incolor, acessível e com boas propriedades de solvente. Há uma grande dificuldade em encontrar um promotor de permeação que apresente todas as propriedades requeridas, porém muitos exibem vários destes atributos e vêm sendo amplamente testados e estudados. A água é considerada o melhor promotor, devido a sua segurança e eficiência, por ser hidratante e qualquer substância penetra melhor através de uma pele hidratada. (HADGRAFT, 1999).

Os fosfolipídios são fortes promotores de permeação/liberação de uma grande variedade de fármacos aplicados topicamente. KATO *et al.*, (1987) reportou que a liberação *in vitro* de bunazosin foi significativamente aumentada com a incorporação de fosfolipídios, que influenciam diretamente na bicamada lipídica do estrato córneo, aumentando também a permeação da indometacina (YOKOMIZO, SAGITANI, 1996).

O mecanismo de ação dos promotores de absorção estão baseados na lei de Fick, porém o mecanismo é complexo e não está totalmente esclarecido. Através da fórmula da Fick, é possível prever o mecanismo de ação dos promotores: aumentando a concentração efetiva do fármaco no veículo; melhorando a partição entre a formulação e estrato córneo; diminuindo a espessura da pele (por exemplo, fornecendo um atalho para a permeação) ou aumentando o coeficiente de difusão do fármaco no estrato córneo ao romper a barreira natural dessa camada, agindo, por exemplo, na bicamada lipídica intercelular, como representado na Figura 10 (BARRY *et al.*, 2004):

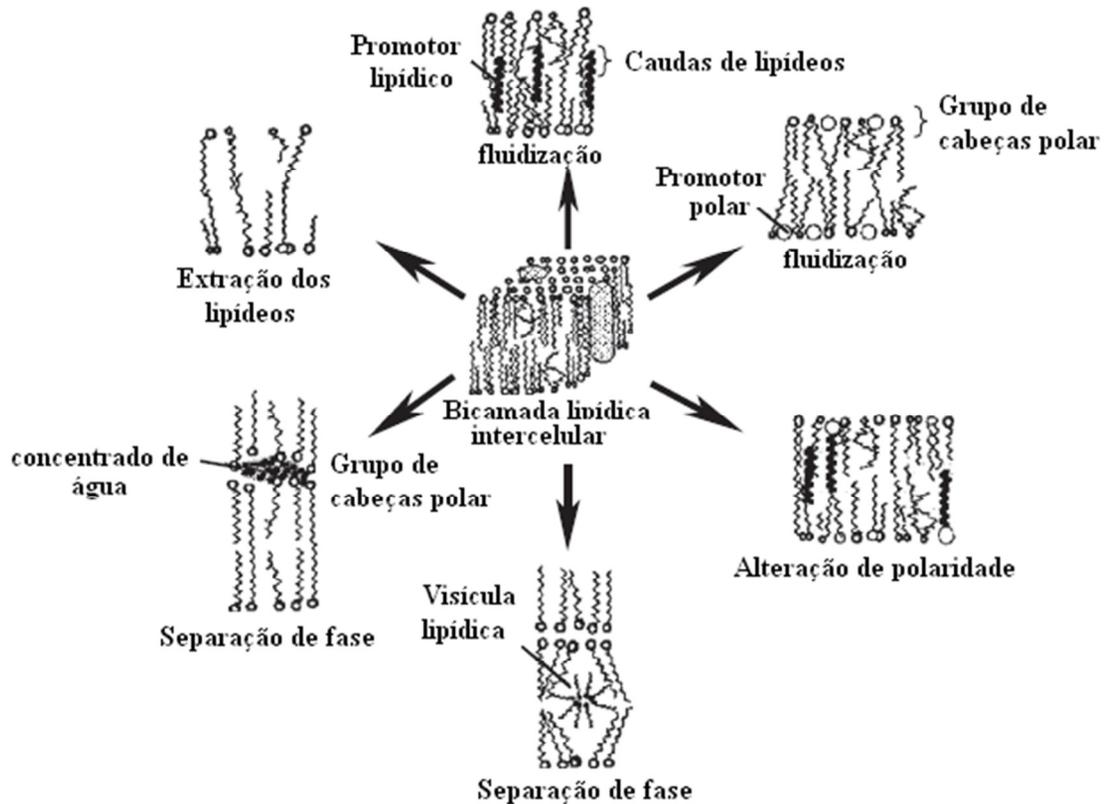


FIGURA 10 – AÇÃO DOS PROMOTORES DE PENETRAÇÃO NOS LIPÍDIOS INTERCELULARES  
 FONTE: ADAPTADO DE BARRY *et al.*, 2004

### 3.5 ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS ATRAVÉS DA VIA TÓPICA

O uso de medicamentos tópicos tem como objetivo maximizar a concentração de fármaco no tecido alvo, podendo-se aplicá-los com diferentes funções como agentes de limpeza, protetores, anti-infecciosos, hidratantes, absorventes, agentes que aliviam os sintomas e agentes anti-inflamatórios. Normalmente os fármacos administrados através da via tópica são muito potentes, não irritantes, com tempo de meia-vida curtos, não sofrem metabolismo na pele e apresentam bom coeficiente de partição (MARTINS, VEIGA, 2002).

Observa-se o uso crescente da terapia tópica, pois a mesma apresenta diversas vantagens em relação às demais vias de administração de medicamentos: diminuição das variações plasmáticas de fármaco, menor frequência de administração, não ocorre variabilidade da absorção oral, não ocorre o metabolismo pré-sistêmico, melhor adesão do doente à terapêutica, fácil aplicação permitindo a autoadministração e pode-se interromper o uso de forma imediata (WAGNER *et al.*, 2001).

Assim como todas as formas de administração de medicamentos, existem algumas desvantagens como a possibilidade de irritação local e de desencadeamento de tolerância e/ou resistência, além de ocorrer um intervalo de tempo entre a administração do medicamento e o alcance da concentração terapêutica, pois o fármaco necessita atravessar a barreira do estrato córneo. Apesar das desvantagens, a aplicação cutânea de fármacos é uma alternativa atrativa em relação às demais vias de administração e vem adquirindo crescente interesse (MARTINS, VEIGA, 2002).

Os medicamentos tópicos podem exercer ação local ou sistêmica. Para o tratamento de distúrbios dérmicos a ação do fármaco deve ser local e a liberação do ativo deve ocorrer na pele. São utilizadas formas farmacêuticas como suspensões, loções, sprays e aerossóis, ou semissólidas como os cremes, pomadas e géis (SHAH *et al.*, 1993).

Os fármacos numa formulação tópica, são incorporados aos excipientes, proporcionando preparações com composição e consistência diversas. As propriedades físico-químicas dos fármacos são fatores determinantes na modulação da absorção e permeação dos mesmos através da pele, entretanto, o restante dos componentes, como os excipientes, determinam a natureza e a consistência das formulações afetando também na liberação do fármaco do seu veículo (MARTINS, VEIGA, 2002).

### 3.6 FORMAS FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS

Diferentes formas farmacêuticas foram desenvolvidas para facilitar a administração e permitir melhor aproveitamento do fármaco. As formulações tópicas podem ser sólidas (cataplasma), líquidas (tinturas) ou semissólidas (creme, pomada, géis). Com o avanço no entendimento das propriedades da pele, dos fatores que controlam a permeação de fármacos, das propriedades físico-químicas dos excipientes em uma formulação, exige-se produtos dermatológicos físicos, químicos e biologicamente mais estáveis e com eficácia melhorada (SAINI, 2010).

As formas farmacêuticas semissólidas são os principais veículos de escolha, pois quando aplicados sobre a pele apresentam elevada espalhabilidade, permanecendo aderidos ao corpo até serem removidos por transpiração ou limpeza. A formulação para produtos dermatológicos geralmente é influenciada pela fisiopatologia da pele (BARRY, 1993; SAINI, 2010).

A Farmacopéia 5ª edição (BRASIL, 2010), define preparações tópicas semissólidas como aquela prevista para aplicação na pele ou em certas mucosas para ação local ou penetração percutânea de fármacos, ou ainda por sua ação emoliente ou protetora. Os veículos semissólidos podem apresentar-se na forma de cremes, pomadas ou géis.

As pomadas apresentam maior constituição lipídica são utilizadas em regiões menores, com menos pelos, não sendo aconselhada sua utilização em lesões abertas, normalmente contém menos do que 20% de água e mais do que 50% de hidrocarbonetos, ceras ou polióis como veículo (USP, 2009).

Os géis são compostos por pequenas partículas inorgânicas ou grandes moléculas orgânicas preenchidas por um líquido. São preparações normalmente formadas por água, álcool ou mistura hidro-alcóolica e um agente gelificante à base de derivados de celulose, polímeros polissacarídeos ou polímeros acrílicos. Constituídos por uma base aquosa, não contém óleo ou gordura, sendo mais utilizados em regiões úmidas e para diminuir a oleosidade da pele (LOURENÇO, 2013; BRASIL, 2010).

Os cremes ou emulsões possuem menor oleosidade que as pomadas e espalhabilidade facilitada, são indicadas para áreas extensas do corpo e regiões com pelos e podem conter uma ou mais substâncias ativas dissolvidas ou dispersas em suas formulações (BRASIL, 2010).

As emulsões são sistemas heterogêneos, formado por duas fases contendo dois líquidos imiscíveis, um está disperso no outro na forma microscópica ou gotículas submicroscópicas. De acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante, do volume das fases ou do tipo de agente emulsificante empregado, as emulsões classificam-se em óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), onde tradicionalmente a nomenclatura cita a fase dispersa primeiramente (NETZ, ORTEGA, 2002; MINER, 1993).

Emulsões O/A são preparações utilizadas para a aplicação tópica de fármacos hidrofílicos, são absorvidos de maneira mais rápida e facilmente removidos da superfície da pele devido ao baixo conteúdo de óleo. As emulsões A/O são utilizadas quando deseja-se também a hidratação da pele, podendo-se ter efeito oclusivo com hidratação das camadas superficiais do estrato córneo. O desenvolvimento de múltiplas emulsões, O/A/O e A/O/A permitem a inclusão de fármacos e excipientes incompatíveis e com propriedades físico-químicas diferentes (MILAN, *et al.*, 2007).

Diversos excipientes e adjuvantes podem ser adicionados a formulação com a finalidade de melhorar determinadas características como aspecto, odor, sabor ou para

adequar a estabilidade da emulsão, solubilizando, suspendendo, aumentando a viscosidade, diluindo, emulsificando, estabilizando ou conservando os agentes terapêuticos (ALLEN JR. *et al.*, 2007).

A fase oleosa de uma emulsão é composta pelos emolientes conduzindo características importantes de um creme, podendo ser modulados de acordo com sua estrutura química, determinando as características sensoriais como espalhabilidade, grau de absorção, emoliência, lubrificação, toxicidade, viscosidade, controle da umidade e comedogenicidade. Na fase oleosa são acrescentados componentes como os antioxidantes, responsáveis pela conservação da formulação contra a degradação química e física decorrentes das alterações ambientais (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

Os antioxidantes previnem a degradação química por oxidação, podendo atuar por diversos mecanismos : inibindo a auto-oxidação pela ausência de oxigênio; podem se oxidar mais facilmente que os fármacos; inibindo a formação de radicais livres ou reduzindo o fármaco ou o componente que pode ser oxidado . Geralmente utilizados na concentração de 0,001 a 0,1%. Para sistemas oleosos utilizam-se antioxidantes como o palmitato de ascorbila, butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT). Existem antioxidantes para sistemas aquosos como o ácido ascórbico, bissulfito, metabissulfito e tiosulfato de sódio (THOMPSON, 2006).

Na fase aquosa de uma emulsão são incorporados elementos hidrossolúveis como alguns fármacos, corantes, aromatizantes, tampões e conservantes, pois esta é a fase mais susceptível a contaminação. Muitos são os conservantes que podem ser utilizados em preparações tópicas, como os álcoois e glicóis (álcool etílico, álcool isopropílico, propilenoglicol, glicerina), ácidos orgânicos (ácido benzoico e ácido sórbico) e parabens. A associação de mais conservantes aumenta o espectro de atividade por ação sinérgica, potencializando a ação conservante em uma formulação (THOMPSON, 2006).

Os agentes emulsionantes são compostos que se localizam na interface das fases imiscíveis da emulsão, promovendo a emulsificação e mantendo a estabilidade. Há uma grande variedade de agentes emulsionantes classificados em tensoativos sintéticos ou semissintéticos, os quais são classificados de acordo com o seu grau de ionização em solução aquosa e substâncias de origem natural e seus derivados (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

Os tensoativos aniônicos em solução aquosa se dissociam formando íons carregados negativamente, responsáveis pela sua capacidade emulsionante, sendo muito utilizados, de

baixo custo. São classificados como tensoativos aniônicos os sais de sódio, potássio ou amônia, ácidos graxos de cadeia longa, trietanolamina, laurilsulfato de sódio e sais de cálcio (AULTON, 2005).

Os tensoativos catiônicos dissociam-se em solução aquosa formando íons positivos, como exemplo, a cetrimida (brometo de cetiltrimetilamônio). Os não iônicos apresentam natureza anfifílica ocorrendo um balanço entre as porções hidrofóbicas e hidrofílicas da molécula, se enquadrados nesta classificação os ésteres de glicerina e glicóis (monoestearato de glicerila), ésteres de sorbitano (monoestearato de sorbitano), polissorbatos (polissorbato 80). Os tensoativos anfóteros são grupamentos carregados positiva e negativamente, dependendo do pH do sistema como a lecitina e N-alquilaminoácidos (FLORENCE, 2003; ALLEN JR *et al.*, 2007).

A grande variedade de emulsionantes permite a associação dos mesmos com suas diferentes características, permitindo um melhor empacotamento e contribuindo para a resistência do filme, bem como para a estabilidade da emulsão de uma maneira mais eficaz (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

Há uma grande variedade de adjuvantes que podem ser acrescentados a uma emulsão proporcionando características distintas. A viscosidade, por exemplo, pode ser alterada pela composição de lipídios (álcool cetílico, parafina, álcool estearílico), pela proporção entre a fase aquosa e oleosa, assim como pela concentração dos emulsionantes. Agentes acidificantes (como o ácido cítrico, acético) e alcalinizantes (como a trietanolamina, hidróxido de sódio) podem ser adicionados a uma preparação tópica a fim de manter uma faixa específica de pH (BEZERRA *et al.*, 2001).

O propilenoglicol, glicerina e polietilenoglicol geralmente estão incluídos em uma formulação como agentes umectantes, reduzindo a evaporação da água, tanto após a abertura do produtos acondicionados quanto após sua aplicação sobre a superfície cutânea (AULTON, 2005).

A grande diversidade de excipientes e adjuvantes permite associações variadas formando formulações com características distintas. Nas farmácias de manipulação, os fármacos são incorporados em bases galênicas, “preparações compostas de uma ou mais matérias-primas, com fórmulas definidas, destinadas a serem utilizadas como veículo/excipiente de preparações farmacêuticas” (BRASIL, 2007), as quais podem ser elaboradas na própria farmácia ou adquiridas comercialmente.

As bases autoemulsionantes comerciais são elaboradas a partir de uma ampla gama de aditivos, apresentando diferentes apelos e funções, podendo ser utilizadas como veículos de uma grande variedade de fármacos e proporcionando preparações física e quimicamente distintas. A base aniônica, Lanette N<sup>®</sup> é muito utilizada e conhecida, trata-se de uma dispersão coloidal formada por álcool cetosteárico e cetil estearil sulfato de sódio. Bases auto-emulsionantes não-iônicas também são muito utilizadas, pois são compostas por agentes espessantes, emolientes, umectantes e conservantes, possibilitando sua utilização em uma ampla variedade de formulações semissólidas.

### 3.7 REOLOGIA

A palavra reologia provém do grego *rheos*, escoamento, primeiramente sugerida por Reiner e Bingham, consistindo no estudo do escoamento e deformação do material quando submetido a uma tensão (força). As medições reológicas são utilizadas no desenvolvimento de formulações e na avaliação de sua qualidade, permitindo caracterizar a facilidade com que o material possa ser transferido de um recipiente para outro, do seu processo de embalagem e também da sua espalhabilidade no momento da administração. Nos produtos semissólidos, as características reológicas podem afetar a liberação do fármaco e o grau de absorvência cutânea (BRASIL, 2010). A reologia em materiais semissólidos consiste em estabelecer a relação entre as propriedades reológicas do material e sua composição.

A viscosidade é a resistência que o produto oferece à deformação ou ao fluxo e depende das características físico-químicas e das condições de temperatura do material. Com o aumento da temperatura, aumenta a energia cinética média das moléculas, diminuindo o intervalo de tempo que as moléculas passam juntas, tornando-se menos efetivas as forças intermoleculares e menor sua viscosidade. Há vários métodos para se determinar a viscosidade, os mais frequentes são viscosímetros rotativos, de orifício e capilares (BRASIL,2007).

Robert Hooke, em 1678, desenvolveu a “verdadeira teoria da elasticidade”, onde em um sólido perfeitamente elástico a tensão e à deformação são diretamente proporcionais. Os materiais são tradicionalmente classificados em sólidos de Hooke ou líquidos newtonianos, porém a grande maioria das substâncias apresentam comportamento intermediário (FREITAS, 2003).

O fluido newtoniano apresenta viscosidade igual, em uma determinada temperatura, independente de sua taxa de cisalhamento. No material identificado como não newtoniano, a viscosidade varia em função da velocidade de cisalhamento, podendo ser dependente ou independente do tempo, estando então de acordo com às suas propriedades reológicas são classificados em três grupos: plásticos, pseudo-plásticos e dilatantes (CHORILLI, 2007).

No comportamento plástico ou de Bingham, o material começa a fluir a partir do momento que se aplica uma tensão mínima, ocorrendo uma ruptura e o material começa então a fluir. Os materiais pseudoplásticos se apresentam similar aos fluidos newtonianos, no primeiro momento, onde se observa a influência da taxa de cisalhamento sobre a viscosidade, sendo chamado de primeiro platô newtoniano. A partir de uma determinada taxa de cisalhamento, ocorre uma diminuição abrupta da viscosidade, segundo platô newtoniano. A região em que ocorre a diminuição da viscosidade com a tensão de cisalhamento aplicada é denominada de “lei das potências”. No comportamento dilatante observa-se um aumento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, sendo o comportamento inverso da pseudoplasticidade (FREITAS, 2003), Figura 11.

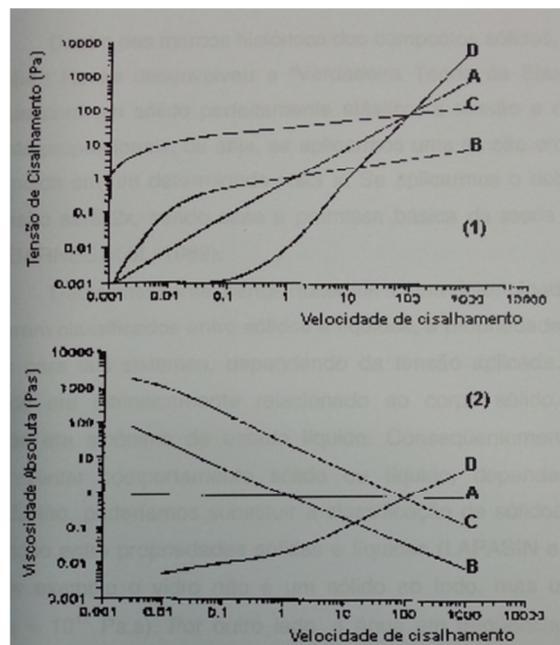


FIGURA 11- CURVA DE FLUXO (1) E PERFIL DE VISCOSIDADE (2) DE FLUIDOS COM COMPORTAMENTO NEWTONIANO E NÃO-NEWTONIANO, ONDE A REPRESENTA UM FLUIDO NEWTONIANO, B PSEUDOPLÁSTICO, C PLÁSTICO E D DILATANTE.

FONTE: ADAPTADO, FREITAS, 2003

Fluidos ideais, como água, deformam-se irreversivelmente, escoam e mudam suas posições. A energia de deformação é dissipada para o ambiente, geralmente na forma de calor, assim, quando a força externa é removida o material não recupera sua forma original. Sólidos ideais, como o aço, apresentam uma deformação elástica, mudam suas posições mas a energia é armazenada e quando forças externas são removidas retornam à posição original. Entretanto, a maioria dos materiais não apresentam comportamento newtoniano ou completamente elástico, apresentam ambos, comportamento viscoso e elástico, sendo denominados de materiais viscoelásticos. A viscosidade não é constante e sim variável de acordo com a taxa de cisalhamento (NAÉ, 1993).

A consistência de uma emulsão se deve a estrutura da fase contínua que forma uma rede de gel viscoelástica, aspecto importantíssimo em um produto tópico afetando a aplicação e que pode ser avaliado por métodos reológicos com técnicas em fluxo contínuo, tensão constante e oscilatória (LIPPACHER, MULLER, MADER, 2004).

As análises oscilatórias permitem a determinação da energia elástica armazenada e a energia perdida pelo fluxo através do cálculo dos módulos elásticos, viscosos e complexos entre outros parâmetros, que são utilizados para o estudo da viscoelasticidade de sistemas complexos (LIPPACHER, MULLER, MADER, 2004).

A Lei de Hooke descreve o comportamento mecânico ideal utilizando uma equação constitutiva na qual estresse e strain (tensão aplicada) são relacionados através de uma proporcionalidade constante chamada de módulo  $G^*$ .

O módulo  $G^*$  ( $G^* = G' + G''$ ) é a medida de resistência à deformação total do material, onde  $G'$  (módulo elástico ou de armazenamento) é a medida da elasticidade do material, a habilidade do material de armazenar energia. O módulo  $G''$  (módulo viscoso ou de perda) é a habilidade do material de dissipar energia, como por exemplo o calor (LIPPACHER, MULLER, MADER, 2004).

O complexo modular ( $G^* = G' + G''$ ) inclui a porção elástica e a porção viscosa do comportamento reológico, assim como o ângulo de fase. O ângulo de fase ( $\delta$ ) é a defasagem, medida de amortecimento do material, razão entre o módulo de perda e o módulo de armazenamento.

$$\tan \delta = G'' / G'$$

A faixa de tensão onde o módulo  $G^*$  e o ângulo de fase  $\delta$  são independentes da tensão aplicada é chamada de região viscoelástica linear. Em um sistema elástico ideal, a curva de tensão irá seguir a curva de deformação e o ângulo de fase será de  $0^\circ$ . Para um sistema viscoso ideal, a tensão não seguirá a curva de deformação, formando um ângulo de fase de  $90^\circ$ , enquanto sistemas viscoelásticos terão um ângulo de fase entre  $0^\circ$  e  $90^\circ$ , sendo que num ângulo mais próximo a  $0^\circ$  o material apresenta mais características elásticas, enquanto que mais próximo o ângulo de fase a  $90^\circ$ , maior a característica viscosa do material (NAÉ, 1993).

A viscosidade de um semissólido pode ser influenciada pela temperatura da amostra, pela técnica de amostragem, tamanho e forma do recipiente e a metodologia empregada para a medida da viscosidade. Materiais não-newtonianos não apresentam uma proporcionalidade entre a taxa e tensão de cisalhamento, sendo que ocorrem variações da viscosidade em função da taxa de cisalhamento, não se devendo determinar um único ponto de viscosidade (MINER, 1993).

Cada componente de uma emulsão contribui para a reologia do sistema, a fase dispersa, a fase contínua e o emulsificante. A fase dispersa pode afetar a reologia da emulsão através da sua concentração, tamanho da partícula, forma e distribuição, viscosidade e constituição química. Com o aumento da concentração, cresce a interação entre as gotículas aumentando a viscosidade do sistema. A forma das gotículas e sua susceptibilidade à deformação afetam as propriedades viscoelásticas da emulsão, particularmente quando em um nível alto de concentração. A natureza química da fase também influencia as forças de interação entre as partículas, assim como a partição do emulsificante entre a fase dispersa e contínua (MINER, 1993).

A fase contínua, entretanto, depende muito da sua viscosidade pela presença de um emulsificante. A variação da concentração do emulsificante tem um efeito maior na viscosidade da fase contínua, o tamanho da partícula e sua distribuição na fase dispersa afetam em menor proporção. A seleção correta do emulsificante é muito importante e fundamental para a reologia do sistema, dois ou mais emulsificantes fornecem mais flexibilidade e controle da formulação em relação ao uso de somente um emulsificante (MINER, 1993).

A caracterização reológica, de um semissólido, permite o entendimento e influência da taxa de cisalhamento e da tensão de cisalhamento no processo de produção; assim como a falta de conhecimento nesta área pode levar a formulações com sensoriais potencialmente indesejáveis. Compreender os efeitos dos ingredientes na estabilidade da formulação, assim como prever antecipadamente a resposta final do produto, como a dispensação e aplicação

sobre a pele, permitem formular cremes e loções com uma adequada espalhabilidade, agregando valor ao produto (MINER, 1993).

### 3.8 TESTES DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O teste *in vitro* pode ser aplicado como um teste de desempenho, capaz de quantificar a liberação do fármaco do seu veículo, esta liberação é a maneira em que o ativo se torna disponível para ser absorvido pelo organismo (CHOWDARY, RAJYALAKSHMI, 1987; UEDA *et al.*, 2009).

A reprodutibilidade é um requisito básico para testes de desempenho, embora o mesmo não quantifique a biodisponibilidade, é capaz de detectar alterações nas características de liberação de ativos que podem alterar o desempenho biológico do fármaco (UEDA *et al.*, 2009).

Os testes de desempenho de produtos dermatológicos devem ser interpretados de maneira diferenciada em relação aos testes de produtos transdérmicos. O local de ação de um produto dermatológico é a pele, devendo apresentar uma alta retenção do fármaco na mesma e pequeno fluxo através da membrana. Nos produtos de ação transdérmica, o efeito desejado é sistêmico, devendo apresentar assim, baixa retenção na pele e grande fluxo através da membrana (SHAH, 1993).

No desenvolvimento de produtos e no controle de qualidade de rotina, os testes *in vitro* são amplamente aplicados pela indústria farmacêutica, apesar de terem sido desenvolvidos para formas sólidas, podendo ser aplicados também para formas semissólidas (MARCOLONGO, STORPIRITIS, 2003).

Nos primeiros estágios de desenvolvimento farmacotécnico, os testes *in vitro* são úteis na identificação das variáveis críticas na produção, para seleção de uma formulação, para avaliação de risco, em geral para a otimização do produto e processo. Durante a fase de produção, são importantes para a liberação dos lotes e para avaliação de impacto quando ocorrer mudanças nos equipamentos ou local de fabricação de fármacos (MANADAS *et al.*, 2002; BRASIL, 2003).

A literatura mostra uma grande variedade de equipamentos que podem ser compostos por cilindro rotatório; suporte recíproco; células de difusão. São empregados em estudos de cinética de liberação e/ou permeação de fármacos. Para formas farmacêuticas emulsionadas

utilizam-se as “células de difusão vertical” também conhecidas como “células de Franz” (UEDA *et al.*, 2009).

O sistema de célula de difusão vertical (VDC) é um método simples, confiável e reprodutível para liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas semissólidas. Composto por duas câmaras, uma contendo amostra e outra a solução receptora, separadas por um compartimento contendo a membrana, onde aplica-se normalmente de 200 a 400mg de amostra (UEDA *et al.*, 2009).

Para produtos semissólidos, estes estudos são realizados para que o fármaco seja liberado da formulação onde está veiculado, se difunda através de uma membrana (biológica ou sintética) para uma solução receptora, onde é feita a determinação analítica do conteúdo de princípio ativo liberado ao longo do tempo (BARRY, 1983). A solução receptora pode ser bombeada continuamente (fluxo contínuo) ou o volume da solução receptora pode permanecer constante (fluxo estático) durante o experimento (CHIEN, 1987).

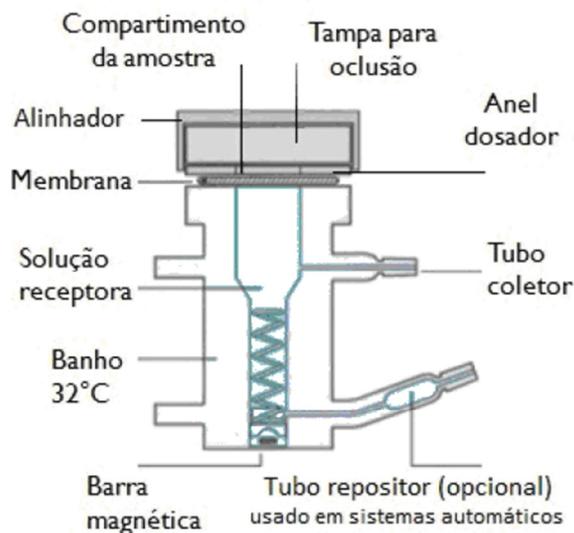


FIGURA 12 – CÉLULA DE DIFUSÃO DE FRANZ

A pele humana oriunda de cirurgia plástica pode ser utilizada como membrana biológica, porém necessita-se submeter ao Comitê de Ética, apresenta pouca disponibilidade e elevado custo de armazenamento, tornando o uso desta membrana limitado. A pele de orelha de porco, de abdômen de rato e pele de cobra também podem ser utilizadas como membranas biológicas. As membranas sintéticas são uma boa alternativa, pois não apresentam a interferência de fatores biológicos, apresentando custo de armazenamento mais baixo (BABY *et al.*, 2008).

As membranas sintéticas servem como suporte para a amostra, não podendo interagir com o fármaco, com o veículo ou com a solução receptora e apresentando permeabilidade suficiente para garantir uma resistência mínima à difusão (CORBO *et al.*, 1993; TOSCANO *et al.*, 1997).

Uma grande variedade de membranas sintéticas tem sido utilizada nos testes de liberação *in vitro*, com diversos materiais e espessuras. O tamanho do poro geralmente é 0,45 µm e o material das mesmas podem ser: nylon, celulose, acetato de celulose, nitrato/acetato de celulose (misto de ésteres de celulose), PVDF, PTFE, polipropileno, polissulfona/polietersulfona, silicone e fibra de vidro. As mais comuns são as de polissulfona/polietersulfona, celulose/acetato de celulose e silicone (ZATZ, SEGERS, 1998; TOSCANO *et al.*, 2001, NG *et al.*, 2010).

A seleção de um meio receptor adequado é um fator crítico para a realização de um teste de liberação eficiente. A concentração do fármaco dissolvida no meio de liberação deve ser menor que 10% da sua concentração de saturação à temperatura de 32°C(+/- 0,5), diz-se que o sistema está operando sob a *sink condition*. A composição do meio receptor para fármacos solúveis em água apresenta-se como solução tampão com pH fisiológico e para fármacos lipofílicos sugere-se meio hidro-alcoólico (SHAH *et al.*, 1995).

Higuchi (1960, 1962) descreveu o modelo que caracteriza a difusão em membranas sintéticas. Quando um fármaco está disperso/suspenso em uma matriz semissólida a quantidade liberada em função do tempo pode ser descrita por:

$$M = \sqrt{2 \times C_o \times C_s \times D \times t} , C_s \ll C_o$$

Ou se o fármaco estiver totalmente dissolvido no veículo:

$$M = 2 \times C_o \sqrt{\frac{D \times t}{\pi}}$$

Onde:

M = quantidade de fármaco liberado no meio por cm<sup>2</sup>

C<sub>o</sub> = Concentração do fármaco na matriz

C<sub>s</sub> = Solubilidade de fármaco na matriz

D = Coeficiente de difusão do fármaco através da matriz

t = tempo

A VDC de Franz em sistema estático e fluxo contínuo tem sido a ferramenta mais empregada para acompanhar o desenvolvimento farmacotécnico, a caracterização biofarmacêutica e estabelecer critérios de qualidade (SHAH *et al.*, 1994).

O fórum da Farmacopéia Americana (USP, 2008) sugeriu o uso da VDC para ensaios de controle da qualidade dos produtos tópicos e transdérmicos (UEDA *et al.*, 2009), assim como o O *FDA's Guidance for Industry* (1997) descreve o estudo de taxa de liberação *in vitro* utilizando a VDC de Franz para semissólidos (FDA, 1997).

Uma terapia tópica efetiva requer que o fármaco seja liberado em concentrações adequadas para produzir o efeito farmacológico desejado. Os veículos e seus excipientes podem afetar o grau de liberação dos fármacos neles solubilizados, sendo o teste de liberação *in vitro* uma ferramenta que auxilia no desenvolvimento e controle de formulações a fim de assegurar uma liberação suficiente do ativo e conseqüentemente um tratamento eficiente (SHAH *et al.*, 1994).

### 3.9 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

O conceito de validação foi estabelecido, na década de 70, a partir da preocupação com a qualidade dos produtos farmacêuticos, na medida em que a indústria farmacêutica começou a intensificar a produção de medicamentos, surgindo então, a necessidade de adequação de procedimentos e metodologias para garantir a qualidade do produto produzido. A validação de metodologias não apresenta uma única legislação ou um único método de trabalho, permitindo diferentes interpretações e adaptações para cada tipo de problema. (BRASIL, 2003).

A Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 cita que o objetivo da validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, garantindo que os resultados de uma análise sejam confiáveis (BRASIL, 2003).

A diversidade e complexidade de métodos e substâncias tornam inviável um método único para efetuar a validação. Todos os equipamentos utilizados devem estar devidamente calibrados e é importantíssimo um bom planejamento onde sejam avaliados os requerimentos legais e o método analítico selecionado (CHASIN *et al.*, 1998).

Devido a grande variedade de métodos, os testes são classificados (Tabela 2) segundo sua finalidade:

TABELA 2- CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES SEGUNDO SUA FINALIDADE

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do teste</b>
<b>I</b>	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
<b>II</b>	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
<b>III</b>	Testes de performance (dissolução, liberação de ativo).
<b>IV</b>	Testes de identificação.

FONTE: BRASIL,2003.

Os parâmetros analíticos geralmente analisados em um processo de validação são: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez.

TABELA 3- ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO, SEGUNDO SUA FINALIDADE.

<b>Parâmetro</b>	<b>Categoria I</b>	<b>Categoria II</b>		<b>Categoria III</b>	<b>Categoria IV</b>
		<b>Quantitativo</b>	<b>Ensaio Limite</b>		
<b>Especificidade</b>	Sim	Sim	Sim	*	Sim
<b>Linearidade</b>	Sim	Sim	Não	*	Não
<b>Intervalo</b>	Sim	Sim	*	*	Não
<b>Precisão</b>	Sim	Sim	Não	Sim	Não
<b>Repetibilidade</b>					
<b>Intermediária</b>	**	**	Não	**	Não
<b>Limite de detecção</b>	Não	Não	Sim	*	Não
<b>Limite de quantificação</b>	Não	Sim	Não	*	Não
<b>Exatidão</b>	Sim	Sim	*	*	Não
<b>Robustez</b>	Sim	Sim	Sim	Não	Não

\* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico;

\*\* Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

FONTE: BRASIL, 2003.

A especificidade define-se como a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas, produto de degradação e da matriz, sendo o primeiro passa para a validação de um método (BRASIL, 2003).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Os resultados devem ser analisados através de métodos estatísticos adequados para a determinação do coeficiente de correlação linear, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. O critério mínimo aceitável é o coeficiente de correlação (R) ser igual a 0,99 (ICH, 1996).

A faixa de trabalho, normalmente derivada da linearidade entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico é o intervalo. A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragem múltiplas de uma mesma amostra (BRASIL, 2003).

A exatidão deve ser determinada a partir de no mínimo nove determinações, contemplando o intervalo linear do procedimento. É um método analítico que analisa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003; ICH, 1996). Sendo calculada a partir da fórmula abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica (real)}} \times 100$$

A Robustez é a capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, os quais deverão ser controlados e suas precauções devem ser incluídas no procedimento.

TABELA 4 – FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO

<b>Preparo das amostras</b>	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
<b>Espectrofotometria</b>	Variação do pH da solução
	Temperatura
	Diferentes fabricantes do solvente
<b>Cromatografia líquida</b>	Variação do pH
	Variação na comparação da fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Fluxo da fase móvel
<b>Cromatografia gasosa</b>	Diferentes lotes ou fabricantes de coluna
	Temperatura

	Velocidade do gás de arraste
--	------------------------------

FONTE: BRASIL, 2003.

A revalidação é uma reavaliação de um método analítico validado em resposta a uma mudança em algum aspecto do método. Pode ser considerada quando o nível de qualidade desejado é alterado, o processo é modificado ou quando o método é usado novamente após um certo tempo ( JENKE, 1998; HILL, 1999).

Os parâmetros que devem ser inclusos na revalidação, não estão definidos, sendo que quanto maiores as alterações, maior deverá ser a abrangência da validação.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

#### 4.1.1 Materiais e Reagentes

- Ácido Kójico, Pharmanostra<sup>®</sup>
- Água Purificada
- Base comercial C, Biotec<sup>®</sup>
- Clorofórmio, Merck<sup>®</sup>
- Creme base Lanette N<sup>®</sup>, Bula Verdde<sup>®</sup>
- Creme base não iônico, Bula Verdde<sup>®</sup>
- Fosfato de sódio monobásico, Neon<sup>®</sup>
- Fosfato de sódio dibásico, Proquímios<sup>®</sup>
- Membrana de acetato de celulose 0,45  $\mu\text{m}$ , Merck<sup>®</sup>
- Membrana de polietersulfona 0,45 $\mu\text{m}$ , Sartorius<sup>®</sup>
- Metanol seco 0,003% de água, Merck<sup>®</sup>

#### 4.1.2 Equipamentos

- Balança analítica AG200, Gehaka<sup>®</sup>, Brasil
- Balões volumétricos de 10, 25, 100 e 1000 mL
- Cubetas de quartzo
- Espectrofotômetro de UV-visível – 1800, Shimadzu<sup>®</sup>, Tokyo, Japan
- Micropipetas automáticas ajustáveis 5 a 50  $\mu\text{L}$
- Medidor de pH mPA210, MS Tecnopon<sup>®</sup>, Piracicaba, Brasil
- Topical and Transdermal Diffusion Cell Systems, Hanson Research<sup>®</sup>, Chatsworth, USA
- Haakerheostress 1, Thermo Scientific<sup>®</sup>, Victoria, Austrália
- Karl Fisher V20 volumetric KF Titrator, Mettler Toledo<sup>®</sup>, Schwerzenbach, Switzerland.
- *Shaker* MA 830, Marconi, São Paulo, Brasil

## 4.2 PREPARO DAS FORMULAÇÕES

Foram preparadas quatro formulações (Tabela 5) variando-se o veículo utilizado, os quais foram adquiridos como bases pré-elaboradas produzidas industrialmente. Em todas as formulações o ácido kójico foi acrescentado na concentração de 3%.

TABELA 5- FORMULAÇÕES PREPARADAS

<b>Fórmula</b>	<b>Composição</b>
<b>F1</b>	Base A 100g Ácido kójico 3%
<b>F2</b>	Base B 100g Ácido kójico 3%
<b>F3</b>	Base C 100g Ácido kójico 3% 10% de água do volume final
<b>F4</b>	Base C 100g Ácido kójico 3% 50% de água do volume final

O creme base A (aniônico) é comercializado como Lanette N<sup>®</sup> e se difere da base B (não-iônico) somente em relação ao tensoativo, são bases auto-emulsionantes utilizadas em uma grande variedade de formulações e suportam a adição de diferentes ativos, sendo uns dos principais veículos para o preparo de formas farmacêuticas semissólidas emulsionadas. A base comercial C apresenta caráter não iônico e é disponibilizada como um veículo funcional elaborada com fosfolipídios e permanece estável com até 80% de água podendo-se preparar cremes de diferentes consistências.

## 4.3 DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH foi realizada no medidor de pH (mPA210 MS Tecno<sup>®</sup> Piracicaba, Brasil) com eletrodo de vidro, dispersando uma amostra de cada formulação em

água destilada, na proporção de 10% (m/v) e o eletrodo foi inserido diretamente na dispersão aquosa (BRASIL, 2010).

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE

A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com a metodologia previamente descrita na literatura por KNORST (1991). Sob um suporte com área de 400cm<sup>2</sup>, onde foi posicionada uma folha de papel milimetrada e sobre o papel aplicou-se uma placa de vidro. Uma placa-molde, circular, de vidro (diâmetro de 20cm, espessura de 0,2mm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro foi colocada sobre a placa suporte.

A amostra foi introduzida no orifício da placa-molde, com o auxílio de uma espátula foi espalhada e nivelada. Em seguida, a placa-molde foi cuidadosamente retirada e sobre a amostra, colocou-se uma placa de *petrie* e diferentes pesos pré-determinados. Após 1 minuto, calculou-se a superfície que a formulação abrangeu, através da medição do diâmetro médio em duas posições opostas. Este procedimento foi realizado em triplicata em todas as formulações, aplicando-se 5 pesos diferentes.

Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, determinados a 25 °C, através da equação:

$$Ei = \frac{d^2 \cdot \pi}{4}$$

Onde:

Ei= espalhabilidade da amostra para peso i (mm<sup>2</sup>)

d= diâmetro médio (mm)

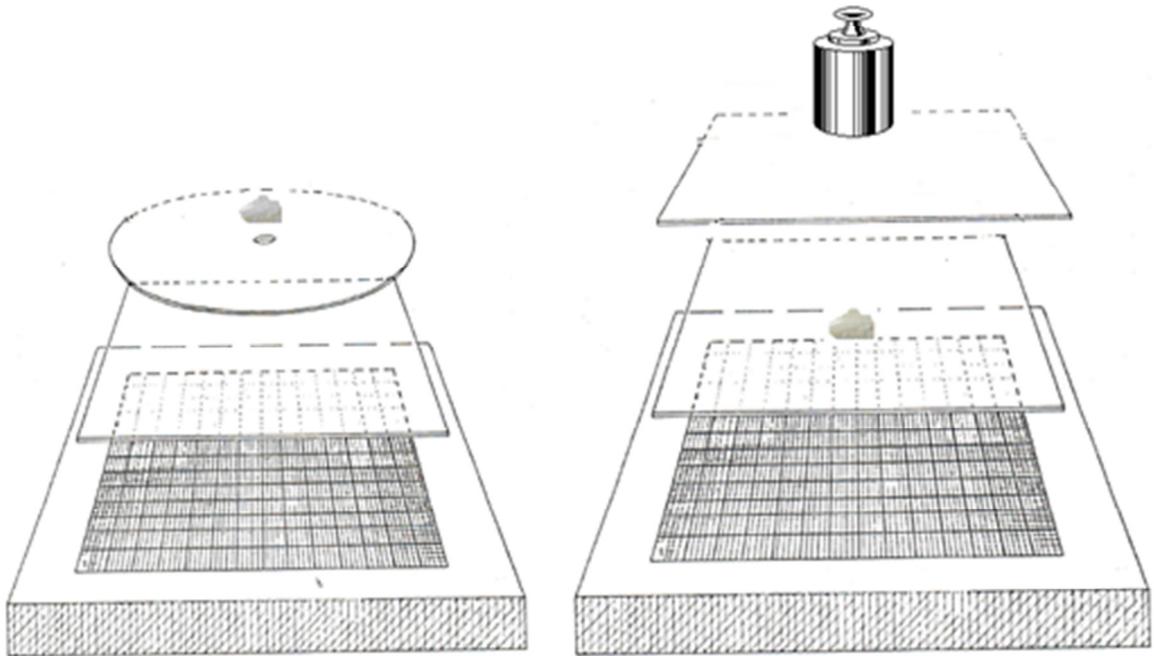


FIGURA 13 - DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE

FONTE: ADAPTADO KNORST, 1991

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

As análises reológicas foram realizadas no equipamento Haakerheostress 1 (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Victoria, Austrália), equipado com banho termo circulante para controle da temperatura. Utilizou-se o sistema de medida cone-placa com o sensor C60/2°Ti (raio= 30cm; ângulo  $\beta = 2^\circ$ ; material de titânio).

Primeiramente realizou-se uma varredura de tensão, com o objetivo de determinar a região viscoelástica de cada formulação em função da tensão. Assumiu-se a tensão de 1Pa para as 4 formulações e em seguida foi realizada uma varredura de frequência na faixa de 0,05 a 10Hz, em duplicata. As amostras foram carregadas com o auxílio de uma espátula e ajustou-se o banho termo circulante em 25°C.

## 4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, sendo classificada em quatro categorias (de I a IV) de acordo com a finalidade dos testes.

Testes quantitativos para a determinação do fármaco em produtos farmacêuticos foram realizados (categoria I), onde validou-se a quantificação do ácido kójico em tampão fosfato pH 7,4. O método espectrométrico de absorção em UV-vis foi desenvolvido e validado considerando-se a metodologia proposta por Gomara (2003), a qual determina a região de absorção do ácido kójico em UV-vis metodologia proposta por Piantavini (2010), que relaciona diferentes soluções e pH para determinação do ácido kójico na metodologia proposta.

### 4.6.1 Linearidade

A linearidade foi determinada através do preparo de 3 soluções-mãe (2000 µg/mL de ácido kójico, em dias diferentes) da qual foram feitas diluições volumétricas para se obter soluções de concentrações (0,75; 2,6; 5; 10; 15; 20 µg/mL) de ácido kójico. Realizou-se ensaio em triplicata, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de UV-visível 269 nm, utilizando como branco tampão fosfato pH 7,4.

Relacionaram-se as absorbâncias obtidas com as suas concentrações correspondentes e traçou-se um gráfico, determinando-se a equação da reta e o coeficiente de determinação.

### 4.6.2 Precisão

Avaliou-se em dois níveis, a repetitividade (precisão intra-dias) e a precisão intermediária (inter-dias).

#### 4.6.2.1 Repetitividade

Para avaliar a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, preparou-se no mesmo dia, três soluções-mãe de 2000 µg/mL. A partir destas, preparou-se soluções volumétricas com diferentes concentrações de ácido kójico (5,10 e 15 µg/mL). O

desvio padrão relativo (DPR) de cada uma das diferentes concentrações foi calculado e as leituras das absorvâncias foram realizadas em 269nm, utilizando como branco o tampão fosfato pH 7,4.

#### 4.6.2.2. Precisão Intermediária

Avaliou-se a concordância entre os resultados inter-corridas, preparando-se em dias distintos, duas soluções-mãe de concentrações iguais de 2000 µg/mL. A partir destas, realizou-se diluições em balão de 10 mL para obter-se diferentes concentrações de ácido kójico (5,10 e 15 µg/mL). O teste foi realizado em triplicata e as leituras das absorvâncias foram realizadas em 269nm, utilizando como branco o tampão fosfato pH 7,4. O DPR de cada uma das concentrações foi avaliado.

#### 4.6.3 Exatidão

A exatidão foi determinada através do ensaio de recuperação, método mais utilizado para a validação de processos analíticos. Reflete a quantidade do analito recuperado no processo em relação à quantidade real presente na amostra.

A exatidão é expressa como erro sistemático percentual inerente ao processo que ocorre pela baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra.

Realizou-se o ensaio de recuperação segundo INMETRO (2011), preparando-se 3 soluções distintas, c1 ( solução fortificada com o veículo), c2 ( solução com o creme base) e c3 (solução de ácido kójico adicionado). A recuperação foi calculada segundo a fórmula:

$$Recuperação (\%) = \left( \frac{c1 - c2}{c3} \right) \times 100$$

A leitura foi realizada em 269nm, utilizando como branco o tampão fosfato pH 7,4 com 5 determinações, sendo estas em 3 níveis de concentrações (5, 10, 15 µg/mL).

Para avaliar a exatidão, aplicou-se o teste de significância Teste *t* de *Student*. Os valores foram submetidos ao teste hipótese, sendo estabelecida como hipótese nula (H<sub>0</sub>):

$\mu=100\%$  e como hipótese alternativa ( $H_1$ ):  $\mu \neq 100\%$  . O valor de  $t$  experimental foi calculado através da equação :

$$t_{\text{exp}} = \frac{(\bar{X}_{\text{Rec}} - \mu)\sqrt{n}}{S_{\text{Rec}}}$$

onde:

$\bar{X}_{\text{Rec}}$  = média de recuperação do métodos

$\mu$  = valor esperado

$n$ = tamanho da amostra

$S_{\text{Rec}}$  = desvio padrão das médias de recuperação de cada nível de fortificação

#### 4.6.4 Robustez

No teste de robustez, avaliou-se a influência do tempo de leitura na intensidade de absorção, visto que os testes *in vitro* foram realizados em um período de 6 horas.

##### 4.6.4.1 Influência do tempo de leitura na intensidade de absorção

Preparou-se uma solução-mãe de ácido kójico de 2000  $\mu\text{g/mL}$ , a partir da qual se obteve três soluções volumétricas com concentrações de 1; 7,6 e 15 $\mu\text{g/mL}$ . O teste foi realizado em triplicata e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de ultravioleta em 269 nm utilizando como branco o tampão fosfato pH 7,4.

Após a primeira leitura (tempo zero), a amostra foi mantida em temperatura ambiente e realizou-se uma segunda leitura 6 horas após a primeira. Para verificar a igualdade das médias das variáveis no tempo zero e tempo 6 aplicou-se o teste *t-student*, obtendo-se o valor de “p”.

#### 4.7 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado utilizando o equipamento “Topical and Transdermal Diffusion Cell Systems”, Hanson Research<sup>®</sup>. O sistema é composto por: microetteplus<sup>®</sup> (responsável pela injeção da solução receptora e onde programa-se o ensaio), multiFill<sup>®</sup> (realiza as coletas), Stirrer<sup>®</sup> (responsável pela agitação magnética), banho de

aquecimento, suporte para as células, impressora e as células e seus componentes como o *wafer* (anel dosador), disco oclusivo, tampa metálica e trava, Figura 14. O sistema é composto por 6 células que apresentam área difusional de  $1,76 \text{ cm}^2$  e volume de aproximadamente 7 mL.

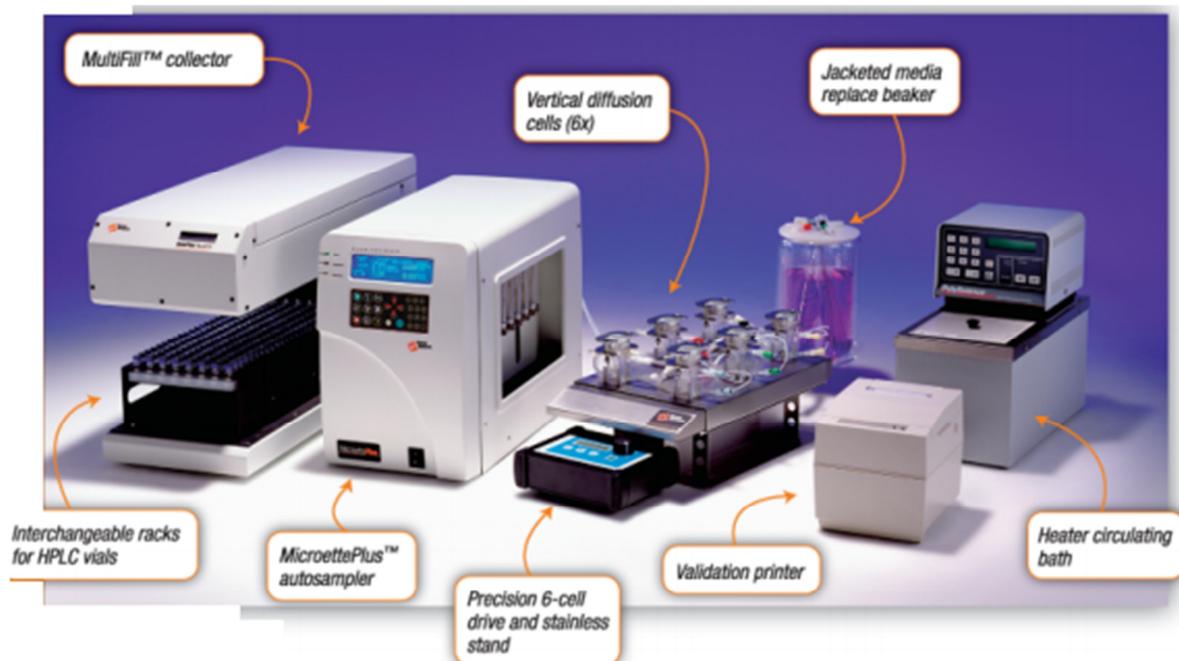


FIGURA 14 - EQUIPAMENTO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA (HANSON RESEARCH®)

FONTE: HANSON RESEARCH, 2014

#### 4.7.1 Solução Receptora

Com base em estudo de (GOMARA, 2003) estabeleceu-se o tampão fosfato pH 7,4 como solução receptora, a qual foi preparado conforme a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010). Com a finalidade de conhecer a *sink-condition* para o fármaco na solução receptora de escolha, realizou-se teste de solubilidade do ácido kójico em tampão fosfato pH 7,4.

##### 4.7.1.1 Teste de Solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado por meio do método de equilíbrio, empregando a técnica do *shake-flask*, no equipamento *shaker* (MA 830 Marconi, São Paulo, Brasil), com temperatura controlada de  $32^{\circ}\text{C}$  e agitação de 150 rpm. O fármaco foi acondicionado em um frasco com tampa com capacidade de 50 mL, contendo 10 mL de tampão fosfato pH 7,4 em

uma dispersão supersaturada. Após 72 horas, as amostras realizadas em triplicata, foram filtradas, diluídas e quantificadas em UV-visível em 269nm.

#### 4.7.2 Preparo da amostra

As amostras de 400mg foram pesadas e aplicadas sobre a membrana com o auxílio de uma seringa.

#### 4.7.3 Preparo das membranas

Utilizaram-se membranas artificiais de acetato de celulose e polietersulfona, ambas com 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro e 25mm de diâmetro.

#### 4.7.4 Preparo do aparato

O teste foi realizado em triplicata para cada amostra e membrana. Como controle, utilizaram-se formulações sem o fármaco as quais foram procedidas os testes de liberação nas mesmas condições que nas formulações analisadas.

#### 4.7.5 Execução do ensaio

As células de difusão foram encaixadas nas respectivas posições do suporte, obedecendo a ordem, Figura 15.

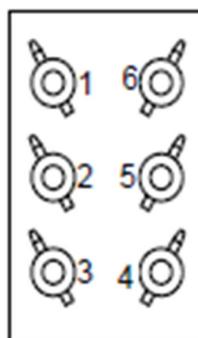


FIGURA 15 - DESENHO EXPERIMENTAL DA DISPOSIÇÃO DAS CÉLULAS NO TESTE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

FONTE: HANSON RESEARCH, 2012

Conectaram-se às células os canais para entrada de água para aquecimento na temperatura de 32°C. As bolhas foram retiradas das células de liberação e se conectaram os canais para entrada e coleta da solução receptora.

Programou-se o equipamento para a execução do teste, com rotação de 500rpm e volume de coleta de 0,5mL. Realizaram-se oito coletas, nos intervalos de tempo de 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos.

Acionou-se o preenchimento das células com a solução receptora e com o auxílio de uma seringa, manualmente, completou-se o volume até a formação de um menisco positivo na parte superior da célula, as bolhas foram retiradas cuidadosamente. A membrana, previamente saturada por 30 minutos no meio receptor, foi delicadamente colocada sobre a célula, evitando a formação de bolhas e sobre a mesma colocou-se o anel dosador, *wafer*.

A amostra, com o auxílio da seringa, foi aplicada dentro da cavidade do anel e espalhada uniformemente com uma espátula. Colocou-se o disco oclusivo sobre a amostra e após, a tampa metálica e a trava, Figura 16.

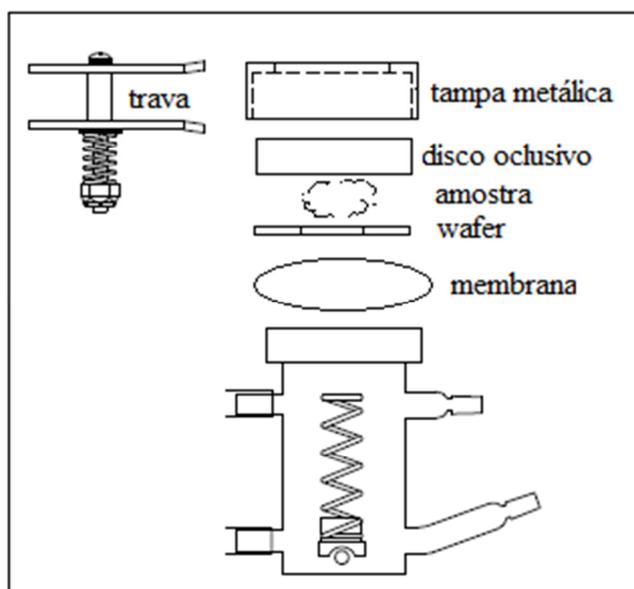


FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MONTAGEM DA CÉLULA DE LIBERAÇÃO

FONTE: ADAPTADO HANSON RESEARCH, 2012

As amostras coletadas foram diluídas em tampão fosfato pH 7,4 e realizou-se a leitura em espectrofotômetro de UV-vis em 269nm, utilizando como branco a solução receptora.

#### 4.7.6 Cálculo da velocidade de liberação *in vitro*

A velocidade de liberação dos produtos foi obtida através de gráfico da quantidade liberada de fármaco por unidade de área de membrana ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) em função da raiz quadrada do tempo (horas).

#### 4.7.7 Comparação das velocidades de liberação *in vitro* entre as membranas

Com o objetivo de comparar a similaridade de liberação *in vitro* entre a membrana de polietersulfona e acetato de celulose, utilizou-se um teste estatístico de comparação de 2 médias (teste t) com variâncias desconhecidas e diferentes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 FORMULAÇÕES

As quatro formulações preparadas apresentaram aspectos visuais distintos, as manipulações com a base comercial C apresentaram uma coloração mais amarelada, enquanto com a base A e base B a coloração ficou mais próxima ao branco. Esta coloração das formulações corresponde à mesma da base isenta do fármaco, visto que a adição de ácido kójico não alterou o aspecto visual do veículo.

Os veículos foram adquiridos na forma de bases comerciais de uma farmácia de manipulação. O creme base Lanette N<sup>®</sup> e o não iônico são bases auto-emulsionantes utilizadas em uma grande variedade de formulações e suportam a adição de diferentes ativos, sendo uns dos principais veículos de escolha na prescrição e no momento da manipulação. Enquanto a base comercial C está disponível como veículo funcional e a incorporação de ácido kójico nesta base foi testada e indicada pelo fornecedor, sendo que este veículo permanece estável com até 80% de água, podendo-se manipular cremes de diferentes consistências. A composição qualitativa das bases está descrito na Tabela 6.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO QUALITATIVA DOS VEÍCULOS

Base A	Base B	Base C
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aqua</li> <li>- Sorbitol</li> <li>- Mineral oil</li> <li>- Cetearyl alcohol</li> <li>- Cetearyl Sulfate</li> <li>- Acid etilenodiaminatetracético</li> <li>- Phenoxyethanol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aqua</li> <li>- Glycerin</li> <li>- Phenoxyethanol</li> <li>- Cearyl Alcohol</li> <li>- Cetareth 20</li> <li>- Mineral Oil</li> <li>- Lanolin Alcohol</li> <li>- Acid etilenodiaminatetracético</li> <li>- PEG 75 Lanolin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Glyceryl Stearate</li> <li>- PEG 100 Stearate</li> <li>- Hydrogenated ethylhexyl olivate</li> <li>- Isopropyl myristate</li> <li>- Sodium acrylates copolymer</li> <li>- Hydrogenated polyisobutene</li> <li>- Phospholipids</li> <li>- Polyglyceril- 10 stearate</li> <li>- Helianthus annus seed oil</li> <li>- Lecthin</li> <li>Phenoxyethanol</li> <li>- Aqua</li> <li>- EDTA disodium</li> <li>- Hydroxypropyl methylcellulose</li> </ul>

Basicamente a base A e B apresentam em suas composições umectantes e emolientes, enquanto a base C apresenta uma variedade maior de umectantes e emolientes, além de ser composta por fosfolipídios e lecitina que atuam nas membranas celulares proporcionando

maior hidratação. Todas as bases apresentam característica de emulsão O/A e como conservante o fenoxietanol, um éter álcool aromático também com ação bactericida.

Conforme a ficha de informação de segurança de produto (VIAFARMA, 2014) referente ao fármaco em estudo, as formulações foram ajustadas para permanecer no pH em torno de 4, sendo o pH ideal de estabilidade para preparações contendo o ácido kójico, Tabela 16. A F3 e F4 foram manipuladas com a base comercial C e se diferem apenas pela quantidade de água adicionada, atribuindo uma consistência visual mais líquida à F4. Entre as formulações, a F1 apresentou-se visualmente mais pesada.

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES

<b>Formulação</b>	<b>pH</b>	<b>Características Organolépticas</b>
<b>1</b>	4,19	Branca, brilhante, inodora, homogênea
<b>2</b>	4,20	Branca, brilhante, inodora, homogênea
<b>3</b>	4,20	Amarelada, brilhante, inodora, homogênea
<b>4</b>	4,20	Amarelada, brilhante, inodora, homogênea

\*n=3

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE

A espalhabilidade tem como objetivo avaliar a expansão de uma formulação semissólida sobre uma superfície após um determinado período de tempo é uma característica fundamental em preparações semissólidas, pois reflete na aplicação da formulação e conseqüentemente na absorção pela pele (MUENZEL, 1959).

Os valores de espalhabilidade obtidos para as formulações em função do peso adicionado, revelam o mesmo comportamento em todas as formulações. Observou-se o acréscimo na espalhabilidade com o aumento do peso adicionado, porém cada formulação apresentou valores distintos, Tabela 8.

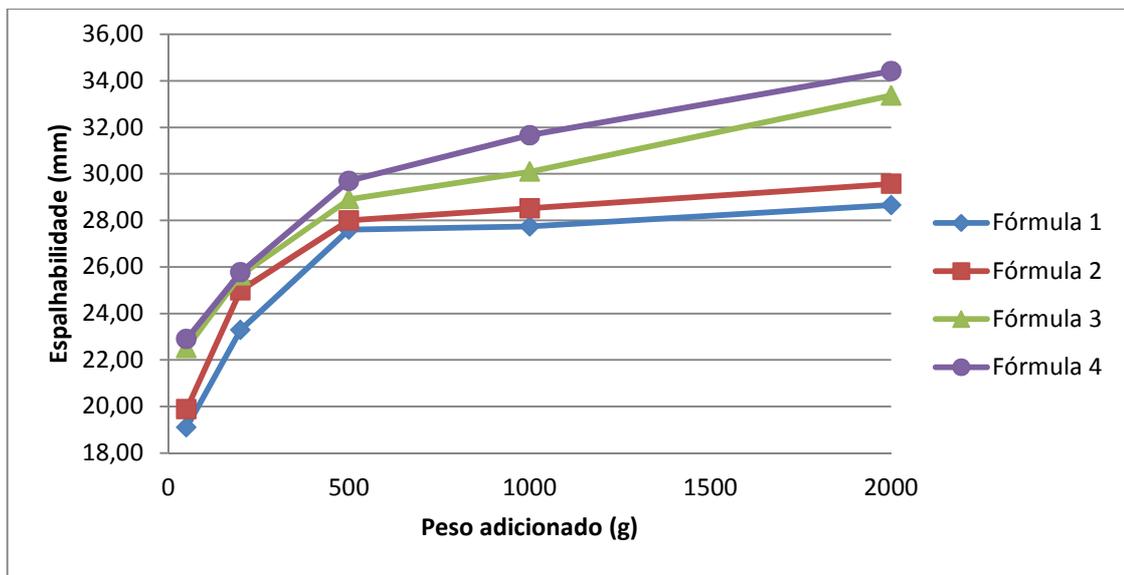
TABELA 8- VALORES DE ESPALHABILIDADE EM FUNÇÃO DO PESO APLICADO

	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>
<b>Ei (mm<sup>2</sup>)</b>				
<b>Peso de 50g</b>	19,102 ± 1,1	19,887 ± 1,1	22,503 ± 1,0	22,896 ± 0,9
<b>Ei (mm<sup>2</sup>)</b>				
<b>Peso de 200g</b>	23,288 ± 0,9	24,989 ± 0,9	25,643 ± 0,8	25,774 ± 0,8

<b>Ei (mm<sup>2</sup>)</b>				
<b>Peso de 500g</b>	27,606 ± 0,8	27,998 ± 0,8	28,914 ± 0,7	29,699 ± 0,7
<b>Ei (mm<sup>2</sup>)</b>				
<b>Peso de 1000g</b>	27,737 ± 0,8	28,522 ± 1,5	30,092 ± 1,9	31,662 ± 1,4
<b>Ei (mm<sup>2</sup>)</b>				
<b>Peso de 2000g</b>	28,653 ± 1,3	29,568 ± 0,7	33,363 ± 0,1	34,409 ± 0,6

\*n=3 ± DP

A F4 apresentou a maior espalhabilidade, justificado pelo teor de água superior e o aspecto mais líquido entre as formulações. A maior espalhabilidade confere maior facilidade de distribuição da formulação sobre a pele.



\*n=3

FIGURA 17- ESPALHABILIDADE MÉDIA DAS FORMULAÇÕES EM FUNÇÃO DO PESO ADICIONADO

A espalhabilidade está estreitamente relacionada com as características reológicas, contribuindo significativamente na viscosidade. A avaliação das características reológicas de produtos semissólidos é utilizada no prognóstico dos efeitos da formulação e do processamento, nas características do produto, na avaliação da qualidade e estabilidade (BORGHETTI, KNORST, 2006).

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

#### 5.3.1 Varredura de tensão

A varredura de tensão foi realizada com o objetivo de determinar a região viscoelástica linear das formulações, nesta região os valores de  $G'$  (módulo de armazenamento) e  $G''$  (módulo de perda) permanecem constantes com o aumento da amplitude da tensão aplicada.

Na viscoelasticidade, o material comporta-se com propriedades viscosas e elásticas simultaneamente, resistindo ao escoamento, como os líquidos, e sofre deformação quando submetido a uma força, como nos sólidos, sendo essa deformação removida quando a força atuante é retirada do sistema.

Frequências distintas de 0,05 Hz e 10 Hz foram aplicadas e a tensão de 1Pa foi selecionada para análise de varredura de frequência, pois nesta tensão todas as formulações permaneceram com a estrutura íntegra,  $G'$  e  $G''$  constantes. É de fundamental importância realizar a análise do regime oscilatório nesta região, pois a rede péctica, a estrutura da emulsão, encontra-se íntegra, caso contrário os valores dos módulos seriam muito menores devido ao cisalhamento e à destruição da rede péctica, Figura 18 e 19.

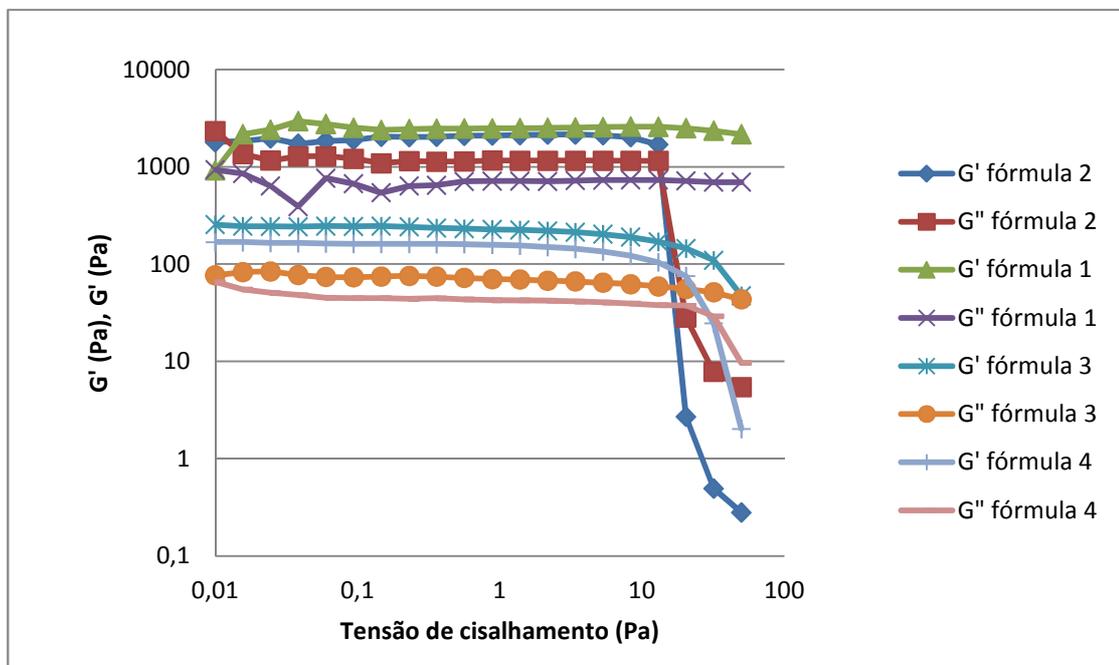


FIGURA 18 - VARREDURA DE TENSÃO NA FREQUÊNCIA DE 0,05HZ.

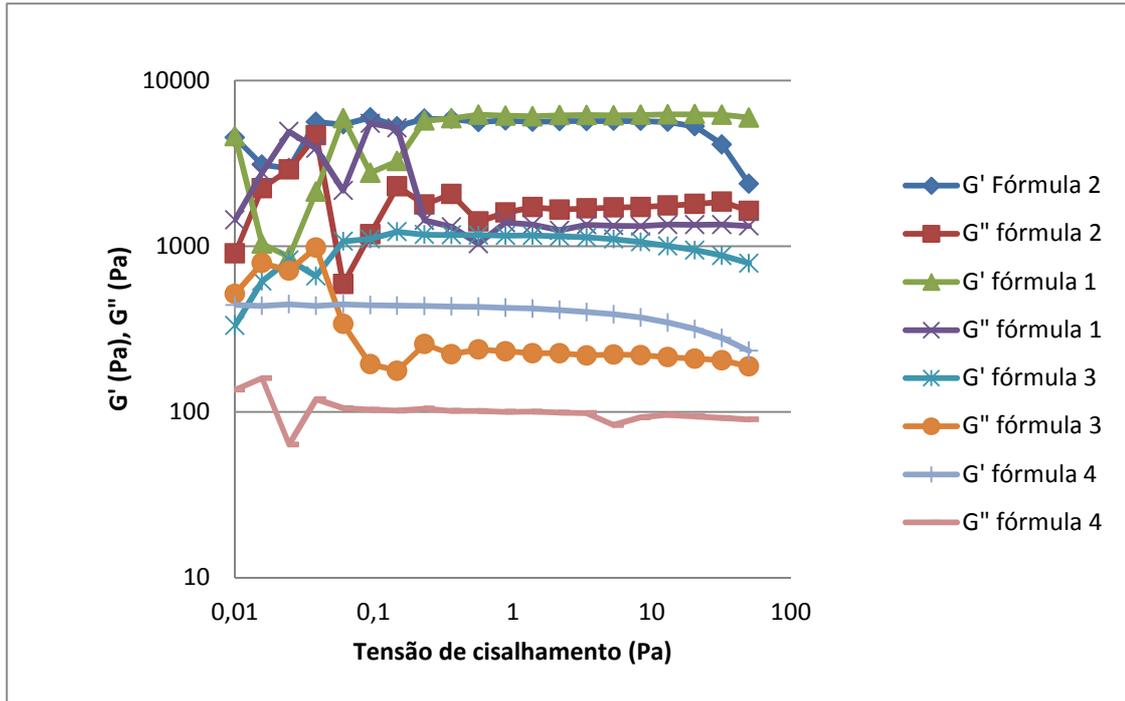


FIGURA 19 - VARREDURA DE TENSÃO NA FREQUÊNCIA DE 10 Hz.

### 5.3.2 Varredura de frequência

A varredura de frequência demonstrou que o módulo  $G'$  (armazenamento) apresentou, de maneira geral, um valor superior ao  $G''$  (módulo elástico) em todas as formulações, refletindo na aparência semissólida das formulações.

Valores de  $G' > G''$  demonstram a predominância da propriedade elástica, sendo que formulações semissólidas devem apresentar altos valores de  $G'$  após estresse, demonstrando que se deformam durante a aplicação, tornando-se mais fluídas, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra (NAGELREITER, *et al.*, 2013).

Todas as formulações apresentaram  $G' > G''$  (Figura 20 a 23) em todas as frequências aplicadas, sendo a tangente de delta próximo a 0 e evidenciado o maior caráter elástico das formulações e comportamento pseudoplástico. Estas características reológicas refletem no enchimento e retirada do material de acondicionamento, espalhabilidade e aderência sobre a pele e aceitabilidade pelo paciente.

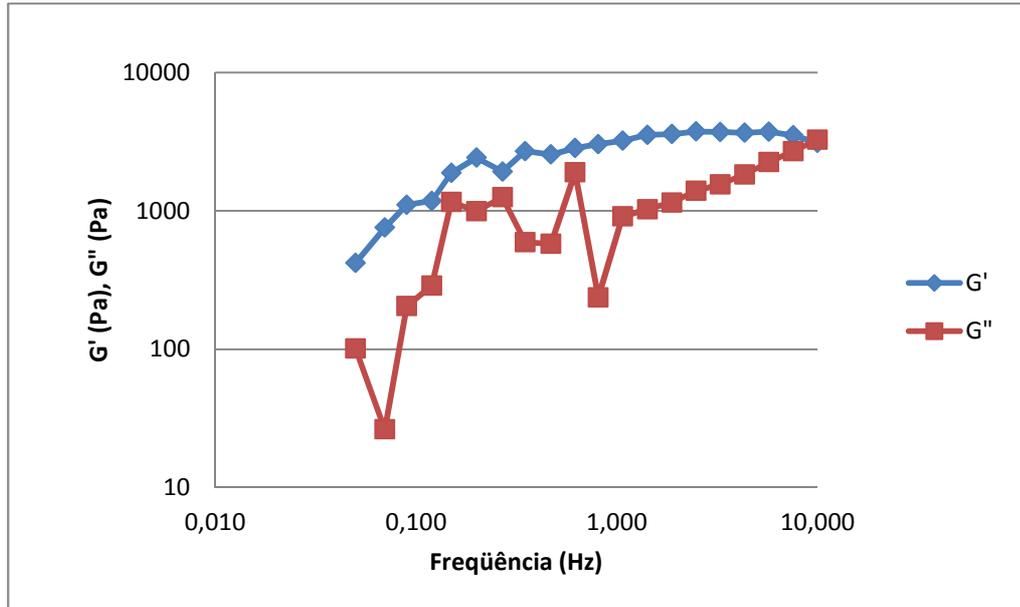


FIGURA 20- VARREDURA DE FREQUÊNCIA F 1

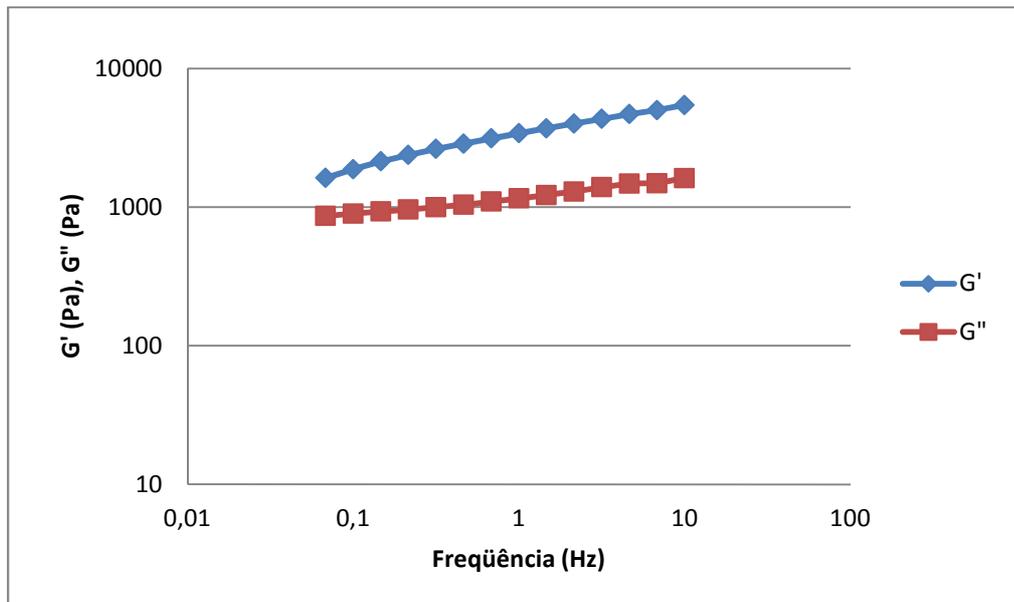


FIGURA 21 - VARREDURA DE FREQUÊNCIA DA F2

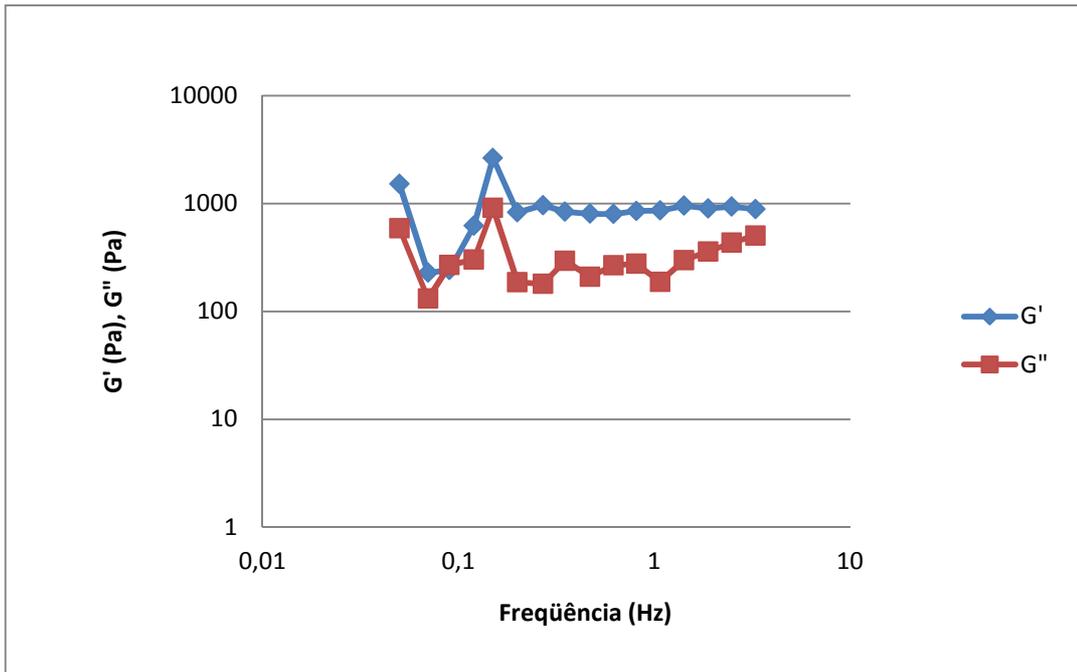


FIGURA 22 - VARREDURA DE FREQUÊNCIA F3

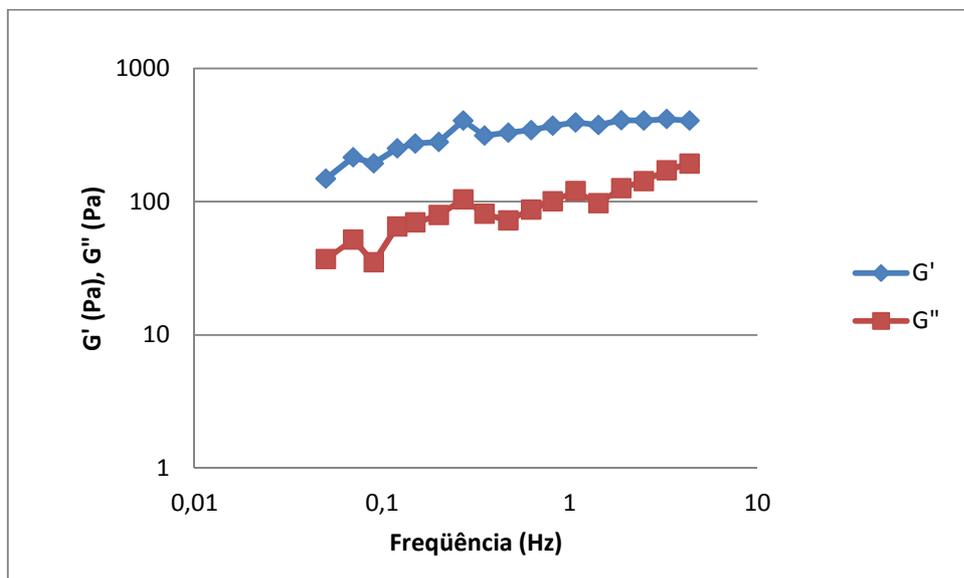


FIGURA 23 - VARREDURA DE FREQUÊNCIA F4

Cada componente de uma emulsão contribui para a reologia do sistema; a fase dispersa, a fase contínua e o emulsificante, justificando os comportamentos reológicos distintos nas formulações testadas.

O comportamento reológico é de fundamental importância na manipulação e desenvolvimento de produtos tópicos, pois um fluxo adequado do sistema é exigido para que a atividade terapêutica seja assegurada.

### 5.3.2.1 Viscosidade Absoluta

Através da varredura de frequência (Figura 24) obteve-se a viscosidade absoluta das formulações, observando-se uma diminuição da viscosidade com o aumento da frequência. Este resultado revela uma estrutura formada pela interação dos componentes da formulação, sendo gradualmente quebrada pelo aumento da frequência e consequentemente diminuindo a viscosidade.

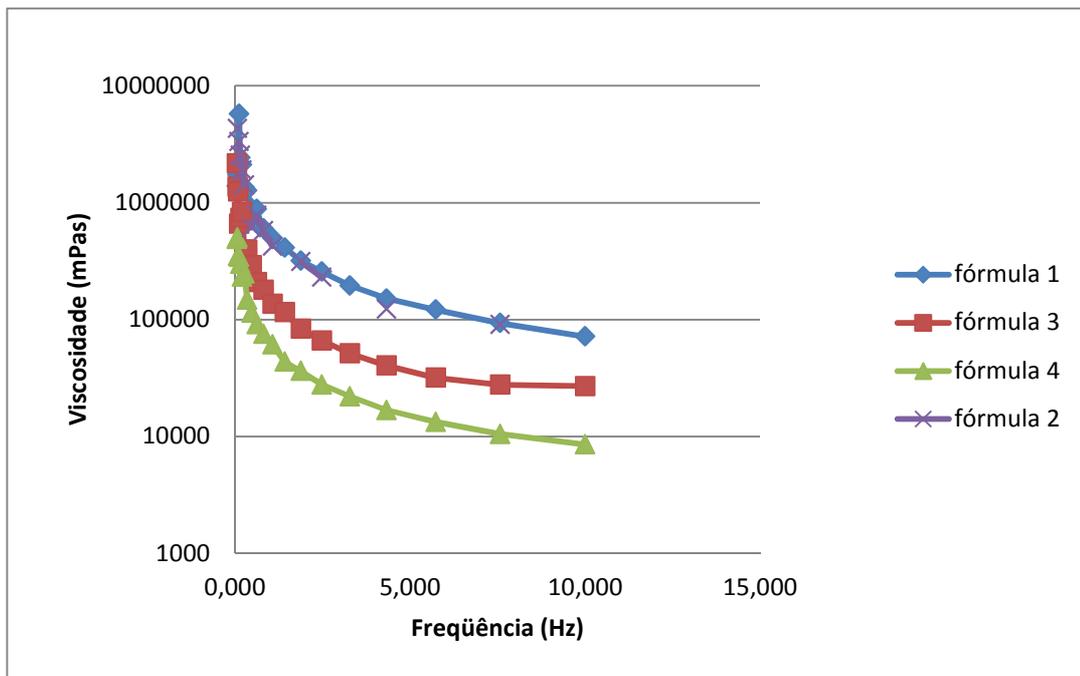


FIGURA 24 - VISCOSIDADE ABSOLUTA DAS FORMULAÇÕES

Segundo LACHMAN *et al.* (2001), a viscosidade de uma emulsão pode ser alterada pela composição de lipídios, fato que pode ter contribuído para a viscosidade absoluta inferior da F3 e F4 é a composição do veículo, pois apresenta em sua constituição fosfolipídios.

A viscosidade de emulsões depende da viscosidade da fase contínua e dispersa; do tamanho médio e distribuição das gotículas; taxa de deformação; temperatura; natureza e concentração do agente emulsificante (MENDONÇA, *et al.*, 2009).

A taxa de liberação de um fármaco depende diretamente das características físico-químicas do veículo e do fármaco. A viscosidade é um fator fundamental, sendo que quanto maior a viscosidade da formulação, maior é a probabilidade do fármaco ser liberado lentamente (MENDONÇA, *et al.*, 2009).

#### 5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método foi desenvolvido e validado levando-se em consideração o comprimento de onda utilizado por Gomara (2003) para a quantificação da matéria-prima, ácido kójico, em especialidades farmacêuticas semissólidas. Os parâmetros analisados foram linearidade, precisão, exatidão e robustez.

##### 5.4.1 Linearidade

Através de espectrofotometria no ultravioleta obteve-se a curva padrão do ácido kójico, a qual apresenta linearidade entre as concentrações de 0,75 a 20  $\mu\text{g/mL}$ .

Obteve-se um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9996, valor satisfatório que atende o valor exigido pelo Inmetro de 0,9 e pela Anvisa (BRASIL, 2003), a qual exige um coeficiente de 0,99. O coeficiente de correlação, próximo a 1, demonstra que há correlação linear entre as concentrações e os valores de absorbância na faixa analisada. A curva padrão obtida assim como a equação da reta e o coeficiente de correlação estão representados na Figura 25.

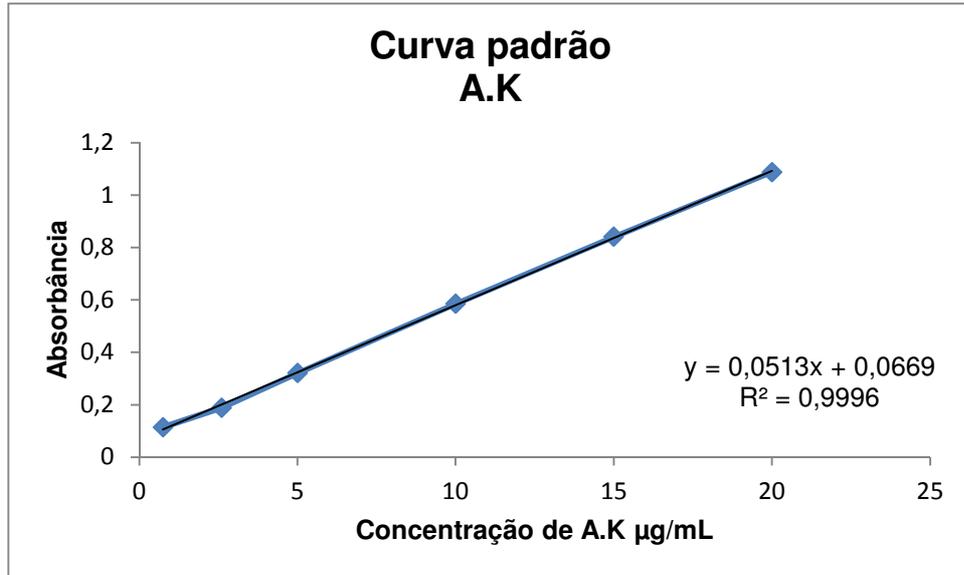


FIGURA 25- CURVA PADRÃO DE A.K.

#### 5.4.2 Precisão

A precisão foi avaliada através da repetitividade e da precisão intermediária

##### 5.4.2.1 Repetitividade

O ensaio de repetitividade apresentou valores de desvios padrão relativo igual ou inferiores a 1%, valor dentro do aceitável para teste intra-dia, comprovando a precisão do método (CHASIN, 1998), Tabela 9.

TABELA 9- CONCENTRAÇÕES OBTIDAS NA AVALIAÇÃO INTRA-DIA

<b>Conc. Teórica A.K</b>	<b>Concentração média (µg/mL)</b>			<b>Média ± DP</b>	<b>DPR %</b>
5 µg/mL	4,64	4,65	4,68	4,65 ± 0,02	0,44
10 µg/mL	9,08	8,98	9,09	9,09 ± 0,06	0,67
15 µg/mL	15,10	15,40	15,18	15,23 ± 0,15	0,99

\*n=3

#### 5.4.2.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada em dois dias distintos, obtendo-se valores de DPR abaixo de 2,0%, o qual é considerado aceitável para análises realizadas em diferentes dias (CHASIN, 1998). Demonstrou-se que o procedimento é estável para a quantificação do ácido kójico, Tabela 10.

TABELA 10- CONCENTRAÇÕES OBTIDAS NA AVALIAÇÃO INTER-DIAS

Conc. teórica A.K	Concentração Dia 1 (µg/mL)			Concentração Dia 2 (µg/mL)			Média ± DP	DPR %
	5 µg/mL	4,972	4,992	4,914	5,070	5,031		
10 µg/mL	10,216	10,313	10,450	10,548	10,684	10,743	10,492 ± 0,20	1,96
15 µg/mL	15,109	15,323	15,050	15,167	15,245	14,992	15,148 ± 0,12	0,81

\*n=3

#### 5.4.3 Exatidão

Com a finalidade de avaliar se os veículos utilizados interferiam na quantificação do ácido kójico realizou-se o teste de exatidão através da recuperação incorporando-se as bases pré-elaboradas industrialmente.

Segundo Gomara (2003) o conservante metilparabeno possui semelhança eletrônica com o ácido kójico e apresenta uma banda de absorção na faixa espectral de 250 a 300nm, interferindo diretamente na quantificação do ácido kójico. As bases comerciais utilizadas como veículo, apresentam em sua composição o conservante fenoxietanol e com o objetivo de verificar se o mesmo poderia interferir no ensaio de recuperação, realizou-se um espectro de varredura de 200 a 400nm, Figura 26.

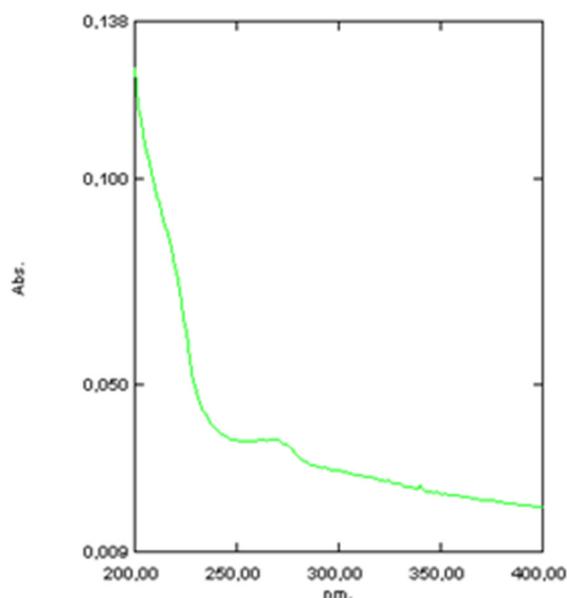


FIGURA 26 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA DA SOLUÇÃO DE 1 µg/mL DA BASE EM TAMPÃO FOSFATO pH 7,4

Apesar do espectro de absorção do ultravioleta da solução contendo somente o creme apresentar uma pequena absorção na faixa de 250 a 300 nm, não ocorreu interferência do creme no ensaio de exatidão.

Para todos os níveis de concentração de ácido kójico (5,0; 10,0 e 15,0 µg/mL), a solução final (c1) foi preparada a partir de 2,5mL da solução c2 e 2,5mL da solução c3 respectiva. As soluções c2 e c3 para os 3 níveis de concentração de ácido kójico foram preparadas com diferentes concentrações a fim de se obter a solução final de ácido kójico correspondente ao proposto: 5,0; 10,0 e 15,0 µg/mL .

As porcentagens de recuperação obtidas com todas as bases estão próximas a 100 % e dentro do limite considerado aceitável por Leite Jr (2002) de 98 a 102 % e Anvisa (BRASIL, 2003) que admite um desvio de até 15%. Sendo assim, o método de quantificação do ácido kójico por espectrofotometria no ultravioleta mostrou-se exato, Tabela 11.

TABELA 11 – TESTE DE RECUPERAÇÃO

Conc. teórica (µg/mL)	Recuperação (%)		
	Base A	Base B	Base C
5,0	98,98	98,83	99,37
10,0	99,51	99,51	100,68
15,0	99,16	99,16	100,72

\*n=3

A exatidão também foi avaliada através do teste de significância (*t-Student*), através da média de recuperação e do desvio padrão da média obteve-se o valor de  $t_{exp} \leq 1,55$ , sendo o valor *t* tabelado de 2,776 com 95% de confiança e *n-1* graus de liberdade. Como  $t_{exp} \leq t_{tab}$  se aceita a hipótese nula ( $H_0$ ), ou seja, não se pode afirmar que existam diferenças significativas entre os valores esperados e encontrados para todos os veículos estudados com 95% de confiança, mostrando que o método proposto é suficientemente exato, Tabela 12.

TABELA 12- VALOR DE *t* CALCULADO PARA O TESTE DE EXATIDÃO

<b>Veículo</b>	$\bar{x}_{Rec} (\%)*$	<b>S<sub>Rec</sub>**</b>	<b><i>t</i><sub>exp</sub>***</b>
<b>Base A</b>	99,53	0,925	1,136
<b>Base B</b>	99,47	0,766	1,547
<b>Base C</b>	100,25	1,268	0,440

\*média de recuperação do método

\*\*desvio padrão da média das recuperações

\*\*\* *t* de *Student* calculado

#### 5.4.4 Robustez

Através da robustez avaliou-se a capacidade do método resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos como o tempo de leitura.

##### 5.4.4.1 Influência do tempo de leitura na intensidade de absorção

O teste de liberação *in vitro*, utilizando as células de Franz, foi realizado por um período de 6 horas, justificando-se a necessidade de avaliar se o método resistiria a esta variação do tempo de leitura.

Aplicou-se o teste *t-Student* para verificar a igualdade das médias das variáveis no tempo zero e tempo 6 . Em todas as concentrações (1; 7,6 e 15  $\mu\text{g/mL}$ ) obteve-se valores de “*p*” > 0,05 não se devendo rejeitar a hipótese nula e que os valores são estatisticamente iguais aos “verdadeiros”, assumindo assim que as variáveis são iguais e demonstrando que há estabilidade da leitura da absorbância do ácido kójico em 6 horas.

TABELA 13 – CONCENTRAÇÕES OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DO TEMPO DE LEITURA

Conc. teórica A.K	Concentração obtida Tempo 0 (µg/mL)			Concentração obtida Tempo 6 (µg/mL)			“p-value”
	1 µg/mL	0,996	0,665	0,489	1,250	0,899	
7,6 µg/mL	6,474	7,273	7,370	6,844	7,565	7,663	0,450
15 µg/mL	15,109	15,402	14,797	15,363	15,869	15,090	0,305

\*n=3

### 5.5 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O ensaio de liberação *in vitro* foi conduzido com célula de difusão do tipo Franz, com temperatura controlada de 32°C e agitação magnética de 500rpm para evitar a obtenção de concentrações localizadas de fármaco e para minimizar as camadas de difusão na interface da membrana.

A seleção da solução receptora é um fator crítico no teste de liberação *in vitro* pois depende da solubilidade do fármaco, além da necessidade em se manter a *sink-condition*. Como o ácido kójico é solúvel em água, as soluções receptoras mais indicadas são soluções tampão isotônicas com valores de pH em torno de 7,4.

Avaliou-se a solubilidade do ácido kójico em tampão fosfato pH 7,4 obtendo-se uma saturação média de 24942,13µg de ácido kójico em 1mL de solução tampão fosfato pH 7,4.

A quantidade de ácido kójico liberada foi determinada a partir de curva padrão do fármaco em tampão fosfato pH 7,4, obtida em comprimento de onda de 269nm.

#### 5.5.1 Liberação *in vitro* com membrana de polietersulfona

As porcentagens de ácido kójico liberadas em cada formulação, através da membrana de polietersulfona, em cada tempo de coleta estão apresentadas na Tabela 14 a 17.

TABELA 14 - QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F1, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

TEMPO (horas)	Taxa de liberação (%)	DPR (%)
0,25	4,02	2,42
0,5	6,60	7,54

1	9,50	5,43
2	12,60	4,36
3	13,46	2,26
4	15,28	2,40
5	15,75	0,60
6	14,49	2,94

\*n=3

TABELA 15 - QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F2, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

<b>TEMPO</b> <b>(horas)</b>	<b>Taxa de liberação</b> <b>(%)</b>	<b>DPR</b> <b>(%)</b>
0,25	5,47	4,39
0,5	9,89	0,54
1	13,25	1,41
2	16,46	2,44
3	20,65	1,43
4	21,59	0,56
5	20,65	1,07
6	18,43	0,94

\*n=3

TABELA 16 - QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F3, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

<b>TEMPO</b> <b>(horas)</b>	<b>Taxa de liberação</b> <b>(%)</b>	<b>DPR</b> <b>(%)</b>
0,25	10,87	6,17
0,5	15,16	1,13
1	21,20	4,14
2	25,72	2,51
3	27,61	3,00
4	24,69	4,35
5	23,72	5,00
6	21,34	2,94

\*n=3

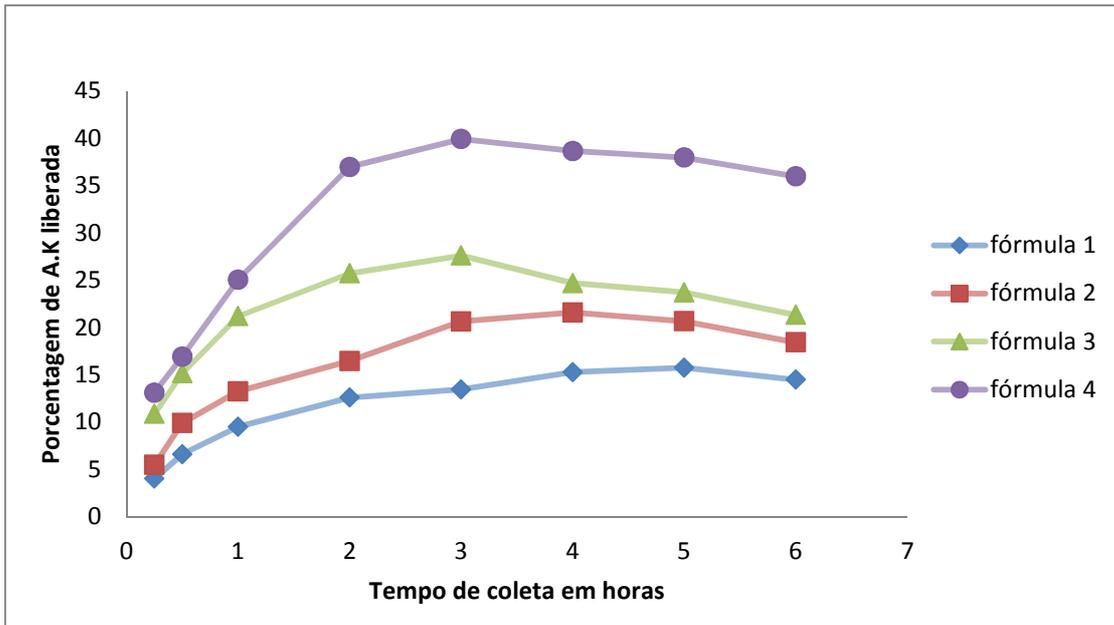
TABELA 17 - QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F4, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

<b>TEMPO</b> <b>(horas)</b>	<b>Taxa de liberação</b> <b>(%)</b>	<b>DPR</b> <b>(%)</b>
0,25	13,12	1,03
0,5	16,91	2,18
1	25,06	3,48
2	36,99	4,58
3	39,94	2,10
4	38,67	4,69
5	37,98	2,28
6	35,99	1,53

\*n=3

O desvio padrão relativo entre as seis células de cada experimento foi menor que 10% para todas as amostras, apresentando baixa variabilidade entre as réplicas dos ensaios de liberação, demonstrando boa precisão do método.

Em um produto dermatológico, à medida que a concentração do ativo diminui, o fluxo através da membrana também tende a diminuir, fato observado no perfil de liberação. A F3 e F4 liberaram em maior porcentagem o ácido kójico e atingiram um pico de liberação mais rápido (5<sup>a</sup> coleta) que as demais formulações que liberaram porcentagens menores e atingiram a liberação máxima entre a 6<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> coleta, Figura 27.



\*n=3

FIGURA 27 - PORCENTAGEM DE A.K. LIBERADA EM CADA COLETA, ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

Através do perfil de liberação e da quantificação da amostra que restou sobre a membrana após o teste de liberação, Tabela 18, observa-se que não foi liberada a totalidade do fármaco e que a solução receptora obedece a *sink-condition*, sendo que o valor permeado não ultrapassa 10% da concentração de saturação do ácido kójico em tampão fosfato pH 7,4 .

TABELA 18- QUANTIDADE DE A.K. RETIDA SOBRE A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA APÓS O TESTE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Fórmula	Quantidade retida (%)
1	49,86
2	39,68
3	29,41
4	20,49

\*n=3

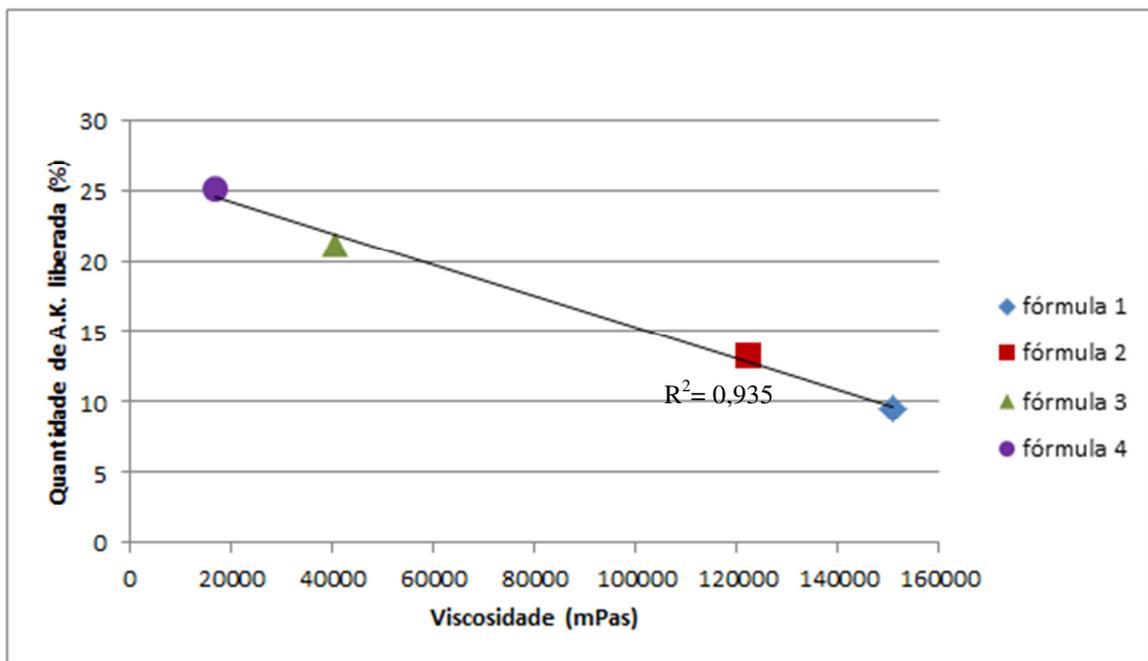
A alteração no fluxo, com picos de liberação seguidos por queda, possivelmente esteja ocorrendo devido à diferença na cedência do ativo. Há uma liberação superior do fármaco que está em contato direto com a membrana e liberação menor e diferenciada do fármaco que não está em contato com a mesma.

A liberação superior de ácido kójico na F4 e F3, as quais apresentavam o mesmo veículo diferindo apenas na quantidade de água, pode ser explicada pela composição fosfolipídica da base (comercial C) que reconhecidamente são agentes promotores de liberação (KATO *et.al.*, 1987). A seleção do veículo desempenha um efeito sinérgico com os fosfolipídios no aumento da liberação, sendo que o veículo é o fator determinante para o desempenho deste promotor (YOKOMIZO, SAGITANI, 1996).

Através da viscosidade e teor de água é possível explicar os diferentes comportamentos das formulações, influenciados pelos excipientes, e conseqüentemente a diferença de liberação do ácido kójico entre as fórmulas.

Segundo MENDONÇA *et al.* (2009) uma viscosidade menor da formulação é um indicativo de liberação mais rápida do fármaco, fato também observado no presente trabalho comprovado pelo coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,9935$ ) muito próximo da correlação perfeita, Figura 28.

BARRY (1983) correlacionou inversamente os valores de viscosidade com a taxa de liberação, MARRIOT (1996) observou que a absorção de agentes ativos pela pele diminuía com o aumento da viscosidade do veículo. WALKOW, MCGINITY (1987), CHORILLI *et al.*, (2007) E BRUSCHI *et al.*, (2007) também constataram esta relação inversa entre viscosidade e quantidade liberada de fármaco.



\*Porcentagem de A.K liberada com membrana de polietersulfona, coleta 3

\*\* Viscosidade na freqüência de 4,33 Hz

FIGURA 28 - RELAÇÃO ENTRE PORCENTAGEM DE A.K LIBERADA COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA (COLETA 3) E VISCOSIDADE DAS FORMULAÇÕES

### 5.5.1.1 Cálculo da velocidade de liberação com a membrana de polietersulfona

Segundo Guy e Hadgraft (1990) os dados obtidos de um teste de liberação *in vitro* deveriam ser analisados empregando-se a raiz quadrada do tempo, esse procedimento seria necessário para linearizar os dados e para um melhor aproveitamento dos pontos do perfil (HIGUCHI, 1962; GUY, HADGRAFT, 1990).

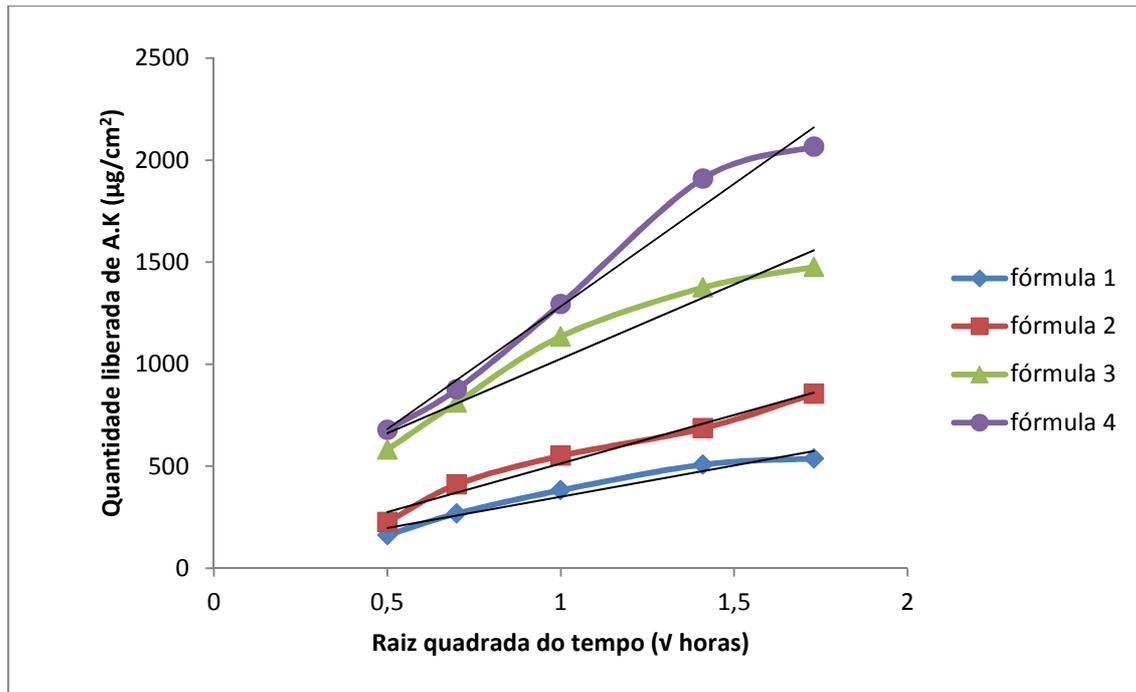
Segundo Higuchi (1962) a relação da quantidade liberada com a raiz quadrada do tempo se demonstra linear e válida para formulações tópicas, enquanto a porcentagem do fármaco liberada é menor que aproximadamente 30% da quantidade aplicada sobre a membrana (HIGUCHI, 1962; GUY, HADGRAFT, 1990). Fato observado no perfil de liberação, até 3 horas de ensaio, a liberação do ácido kójico para todas as formulações foi crescente e inferior a 30% da quantidade aplicada sobre a membrana.

Quando a liberação excede aproximadamente 35 a 45% do conteúdo inicial de fármaco, o pressuposto que há uma relação linear entre a quantidade liberada e a raiz quadrada do tempo não é mais válida (ZATZ, SEGERS, 1998).

Zatz e Segers (1998) afirmam que há um intervalo de tempo em que os experimentos devem ser realizados, sendo que a coleta de dados deve ser realizada somente após o

equilíbrio da difusão, porém, antes de ocorrer um esgotamento excessivo do fármaco no semissólido.

Levando em consideração o exposto, o fluxo de ácido kójico das formulações foi calculado por regressão linear e corresponde à inclinação dos 5 primeiros pontos experimentais, a partir de 0,25h até 3 horas.



\*n=3

FIGURA 29 - QUANTIDADE LIBERADA EM FUNÇÃO DA  $\sqrt{t}$  COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA UTILIZANDO OS PONTOS DE COLETA DE 0,25h A 3 HORAS.

### 5.5.2 Liberação *in vitro* com membrana de acetato de celulose

As porcentagens de ácido kójico liberadas em cada formulação através da membrana de acetato de celulose, em cada tempo de coleta estão apresentadas na Tabela 19 a 22.

TABELA 19 - QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F1 UTILIZANDO MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

<b>TEMPO</b> <b>(horas)</b>	<b>Taxa de liberação</b> <b>(%)</b>	<b>DPR</b> <b>(%)</b>
0,25	4,00	5,13

0,5	6,71	3,19
1	9,05	0,18
2	12,37	3,09
3	13,58	1,35
4	15,26	5,3
5	15,69	3,00
6	14,76	2,55

\*n=3

TABELA 20- QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F2 UTILIZANDO MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

<b>TEMPO</b> <b>(horas)</b>	<b>Taxa de liberação</b> <b>(%)</b>	<b>DPR</b> <b>(%)</b>
0,25	5,49	2,04
0,5	9,45	3,91
1	13,79	2,05
2	16,39	2,00
3	20,07	0,50
4	21,23	1,55
5	20,60	0,48
6	18,69	0,81

\*n=3

TABELA 21 - QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F3 UTILIZANDO MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

<b>TEMPO</b> <b>(horas)</b>	<b>Taxa de liberação</b> <b>(%)</b>	<b>DPR</b> <b>(%)</b>
0,25	11,19	2,41
0,5	14,81	5,66
1	20,17	0,34
2	24,81	0,43
3	25,77	0,59
4	22,42	1,33

5	22,61	1,32
6	20,64	2,40

\*n=3

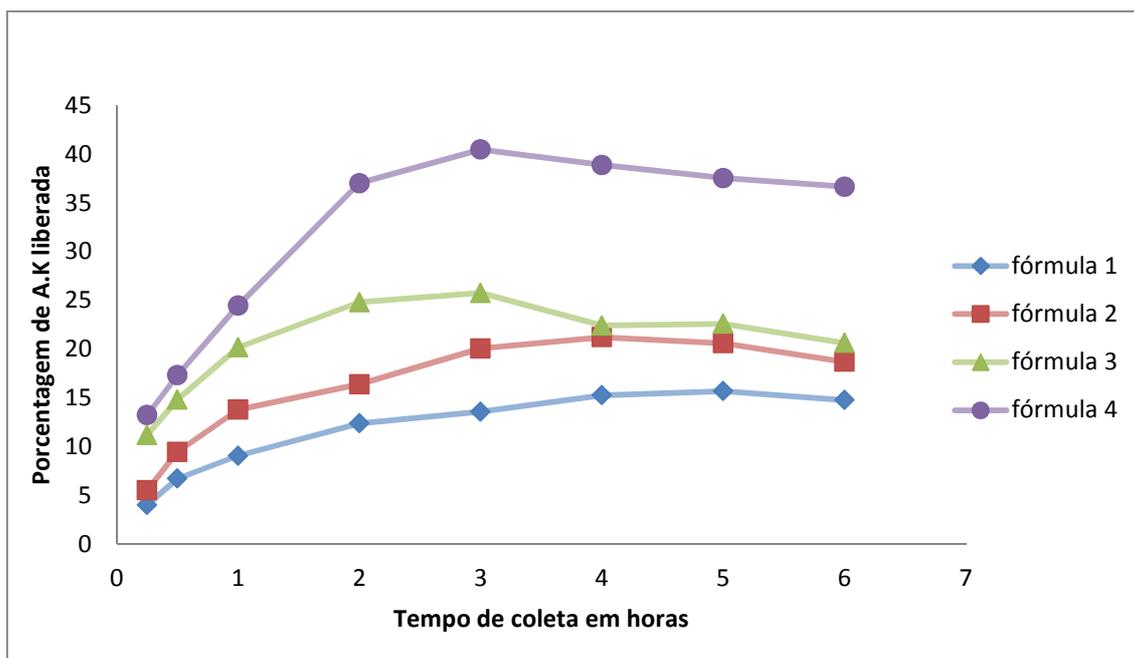
TABELA 22 - QUANTIDADE LIBERADA DE A.K. NA F4 UTILIZANDO MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

<b>TEMPO</b> <b>(horas)</b>	<b>Taxa de liberação</b> <b>(%)</b>	<b>DPR</b> <b>(%)</b>
0,25	13,23	0,35
0,5	17,33	2,46
1	24,47	2,23
2	37,04	4,59
3	40,50	1,06
4	38,91	1,62
5	37,56	3,58
6	36,68	2,93

\*n=3

O DPR entre as seis células de cada experimento foi menor que 10% para todas as amostras, apresentando baixa variabilidade entre as réplicas dos ensaios de liberação, ou seja, boa precisão do método.

O teste de liberação utilizando a membrana de acetato de celulose apresentou comportamento semelhante ao da membrana de polietersulfona. As F3 e F4 liberaram em maior porcentagem o ácido kójico e atingiram um pico de liberação mais rápido (5ª coleta) que as demais formulações que liberaram porcentagens menores e atingiram a liberação máxima entre a 6ª e 7ª coleta, Figura 30.



\*n=3

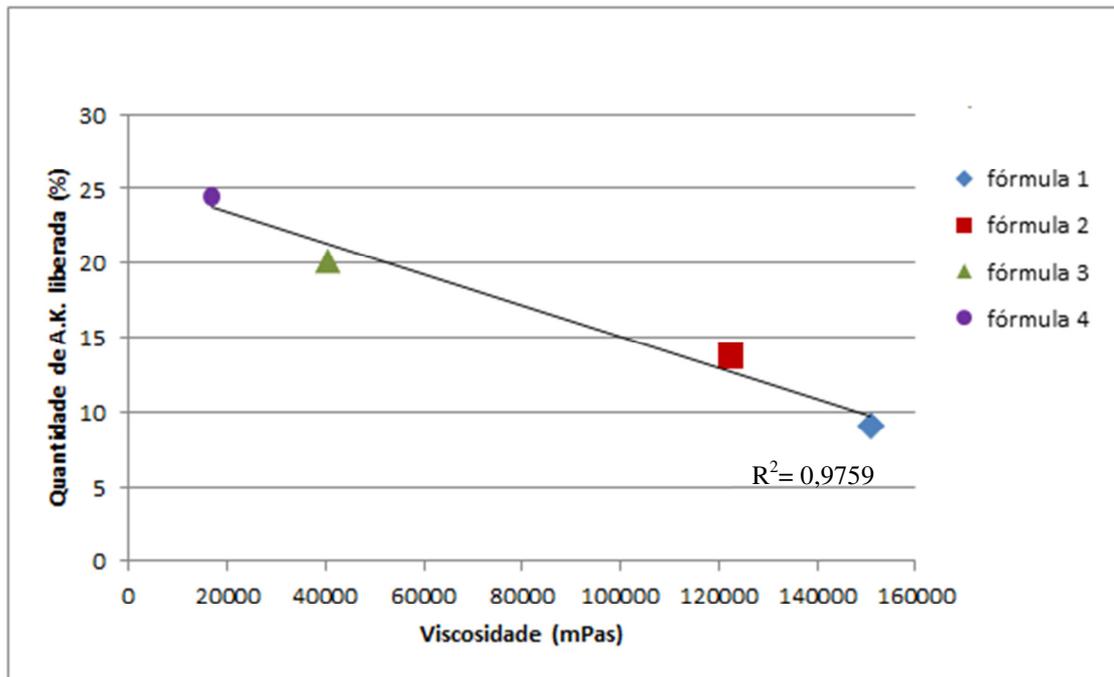
FIGURA 30 - PORCENTAGEM DE A.K. LIBERADA EM CADA COLETA, UTILIZANDO MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

Através do teste estatístico *t-Student*, comprova-se que após o teste de liberação *in vitro* não ocorreu diferenças significativas em relação a quantidade de amostra retida sobre as membranas (polietersulfona e acetato de celulose). Obteve-se um *p-value* > 0,05 para todas as formulações, ou seja, não há diferença significativa na quantidade de ácido kójico retida na membrana de acetato de celulose e na membrana de polietersulfona, Tabela 23.

TABELA 23 - QUANTIDADE RETIDA, APÓS O TESTE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*, COM CADA MEMBRANA

Fórmula	Quantidade retida (%) Polietersulfona	Quantidade retida (%) Acetato de Celulose	<i>p-value</i>
1	49,86	49,73	0,828
2	39,68	40,22	0,218
3	29,41	29,73	0,673
4	20,29	20,83	0,516

\*n=3



\*Porcentagem de A.K liberada com membrana de acetato de celulose, coleta 3

\*\* Viscosidade na frequência de 4,33 Hz

FIGURA 31 - RELAÇÃO ENTRE PORCENTAGEM DE A.K LIBERADA COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE (COLETA 3) E VISCOSIDADE DAS FORMULAÇÕES

#### 5.5.2.1 Cálculo da velocidade de liberação com a membrana de acetato de celulose

O cálculo da velocidade de liberação utilizando a membrana de acetato de celulose levou em consideração os mesmos aspectos relacionados à membrana de polietersulfona, pois o mesmo comportamento de liberação foi observado.

O fluxo de ácido kójico das formulações foi calculado por regressão linear e corresponde à inclinação dos 5 primeiros pontos experimentais, a partir de 0,25h até 3 horas.

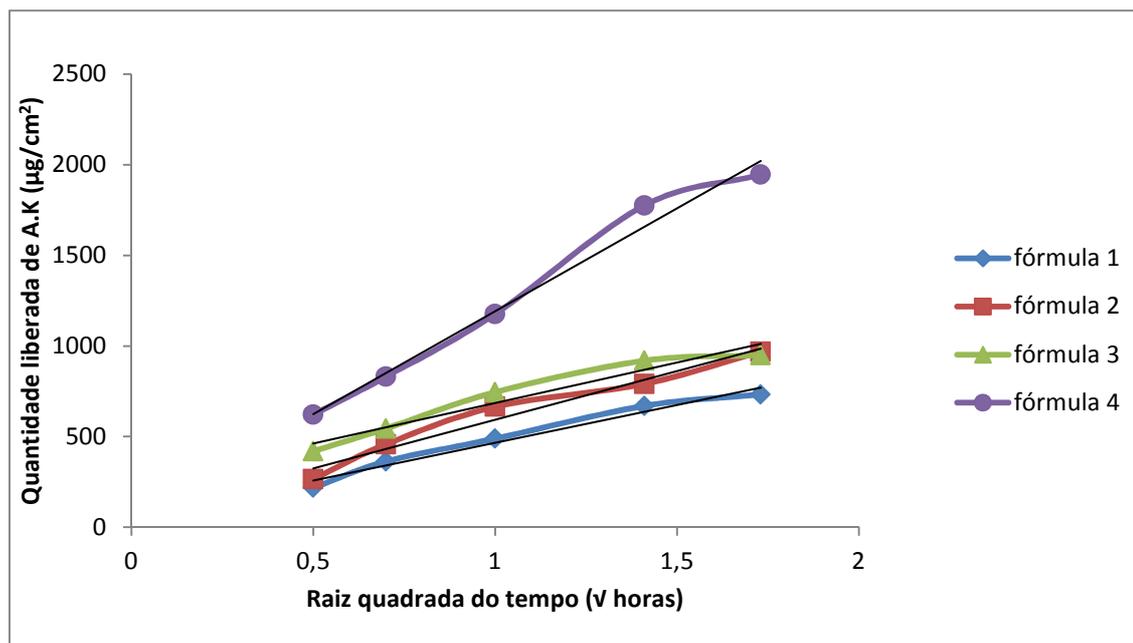


FIGURA 32 - QUANTIDADE LIBERADA EM FUNÇÃO DA  $\sqrt{t}$  COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE UTILIZANDO OS PONTOS DE COLETA DE 0,25h A 3 HORAS.

### 5.5.3 Comparação das velocidades de liberação *in vitro* entre a membrana de polietersulfona e acetato de celulose

A porcentagem de ácido fólico liberada com a membrana de polietersulfona foi semelhante à membrana de acetato de celulose. As porcentagens de liberação correspondentes a cada coleta com as duas membranas foram avaliados estatisticamente através do teste para comparação de 2 médias (teste t) com variâncias desconhecidas e diferentes.

Para todos os tempos de coleta obteve-se um *p-value* > 0,05, podendo-se considerar as porcentagens de liberação, do fármaco em estudo, relativas à membrana de polietersulfona semelhantes à acetato de celulose. Não há diferenças significativas entre as membranas utilizadas quanto à liberação de ácido fólico nas formulações analisadas.

TABELA 24- TESTE ESTATÍSTICO (TESTE T) ENTRE A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA E DE ACETATO DE CELULOSE

Coleta (horas)	p-value F1	p-value F2	p-value F3	p-value F4
0,25	0,913	0,891	0,525	0,324
0,5	0,755	0,179	0,559	0,293

1	0,269	0,071	0,179	0,393
2	0,592	0,823	0,139	0,974
3	0,600	0,084	0,063	0,412
4	0,968	0,217	0,071	0,844
5	0,853	0,733	0,257	0,684
6	0,460	0,140	0,225	0,425

Segundo a literatura (SHAH *et al.*, 1989; SHAH, ELKINS, 1995; SHAH *et al.*, 1999; NG *et al.*, 2010) não há um padrão de comportamento das membranas, pois podem ocorrer variações de acordo com o fármaco, veículo e solução receptora utilizados. SHAH, 1989, SHAH, 1995 e BEMVINDO, 2006 obtiveram resultados semelhantes na comparação entre membranas de acetato de celulose e polietersulfona.

Alta porosidade, espessura mínima e não ocorrer ligação do fármaco à membrana são características que oferecem a menor resistência difusional (ZATZ,1995), objetivo das membranas sintéticas, pois permitem identificar a taxa de interferência do veículo na liberação do ativo.

## 6 CONCLUSÃO

- As quatro formulações foram preparadas com bases magistrais muito utilizadas em farmácias magistrais, compostas por diferentes excipientes proporcionando preparações com características físico-químicas distintas.
- A caracterização reológica, através da varredura de frequência, evidenciou características pseudoplásticas nas formulações com módulo  $G'$  (módulo de armazenamento) superior a  $G''$  (módulo de perda) nas frequências aplicadas, comportamento esperado para preparações semissólidas.
- As formulações apresentaram comportamentos semelhantes de espalhabilidade com o aumento do peso adicionado.
- A metodologia validada em espectrofotometria em UV-vis em 269nm apresentou linearidade, precisão, exatidão e robustez para o ácido kójico em solução tampão fosfato pH 7,4, em 269nm.
- O teste de liberação demonstrou que a escolha do veículo pode interferir na atividade terapêutica, sendo que a F4 liberou a maior quantidade de ácido kójico, seguida pela F3, F2 e F1. As fórmulas que apresentaram a maior taxa de liberação foram preparadas com veículo composto por fosfolipídios.
- A taxa de liberação foi influenciada pela viscosidade das formulações, sendo que quanto menor a viscosidade maior a taxa de liberação do ácido kójico observada.
- Não ocorreram diferenças significativas de liberação *in vitro* de ácido kójico com as membranas de acetato de celulose e polietersulfona, sugerindo que as membranas são intercambiáveis para a análise do fármaco.

## REFERÊNCIAS

ALLEN JR., L.V.; ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ARCHIPRE, B. Os glicocitratos: sua utilização em estética. **Up to Date**, São Paulo, v.2, n.8, p.36-37, 1996.

ARNOLD, H.L.; ODOM, R.B.; JAMES, W.D. **Doenças da Pele de Andrews: Dermatologia Clínica**. 8 ed. São Paulo, 1994.

AULTON M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2 ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 504-536, 2005.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARUFI, F.D.; *et al.* Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n.2, abri/jun, 2008.

BATISTUZZO, J.A.O.; ITAYA, M.; ETO, Y. **Formulário médico farmacêutico**. 2 ed. São Paulo, 2002.

BARRY, B.W. **Transdermal drugs delivery**. *Dermatological Formulations. Percutaneous absorption*. New York, p. 1-233, 351-407, 1983.

BARRY, B.W. *et al.* **Penetration enhancers**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.603-618, 2004.

BAUMANN, L. **The Skin Type Solution**. New York: Beauty e Groming Bantam Hardcover, 2006.

BEMVINDO, C. S. Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais. 2006.110p. (Dissertação Mestrado). **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro.

BENTLEY, R. From miso, saké and shoyu to cosmetics:a century of science for kojic acid. **Nat.Prod.Rep.**, p.1046-1062, 2006.

BEZARRA, S.V.; REBELLO, T. **Guia de Produtos Cosméticos**. 3 ed.. São Paulo: Editora SENAC, 2001.

BOISSY, R.E. The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes, and hair. **Dermatol Clin.**1988.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A. **ver. bras. de ciênc. farm.** v. 42, n. 4, p. 531-537, out./dez. 2006.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RE nº 893 de 29 de maio de 2003. Guia para realização de ensaios de equivalência farmacêutica com perfil de dissolução para FFSO.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopéia Brasileira, 5 ed. Brasília, Anvisa: 546 p., volume 1, 2010.

BRUSCHI, M.L.; JONES, D.S.; PANZERI, H.; GREMIAO, M.P.; DE FREITAS, O.; LARA, E.H. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontaldisease: *In vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, andmucoadhesive properties.**Braz. j. pharm. sci.**, 2007.

CAMPOS, P.M.B.G.M.; RICCI, G.; SEMPRINI, M.; LOPES, R. Histopathological, morphometric, and stereologic studies of dermocosmetic skin formulations containing vitamin A and/or glycolic acid. **J. Cosmet. Sci.**, 50, p. 159-170. Maio/Junho 1999.

CATEC. Câmara Técnica de Cosméticos. Parecer Técnico n° 7 de 28 de setembro de 2001.  
**Utilização de alfa-hidroxiácidos em produtos cosméticos, 2001**

CHARLET, E. **Cosmética para farmacêuticos**. Zaragoza:Acribia, p.119-123, 1996.

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; *et al.* Validação de métodos analíticos em análises toxicológicas:uma abordagem geral. **Rev Bras Toxicol**, v. 11, n.1, p. 1-6, 1998.

CHI, S. C., PARK, E. S., KIM, H. Effect of penetration enhancers on flubiprofen permeation through rat skin.**Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.126, p. 267-274, 1995.

CHIEN, Y.W. Transdermal controlled systemic medications. **Marcel Dekker**, p. 127-158, 1987.

CHORILLI, M.; PERUCH, N.M.O.; LEONARDI, G.R.; CAVALLINI, M.E.; STURION, M.C. Estudo comparativo da dispensação de medicamentos tópicos nos setores primário e terciário da saúde, no município de Piracicaba (SP).Curso de Farmácia, **Faculdade da Saúde – UNIMEPV**, v.15, 2004.

CHORILLI, M.; ZAGUE, V.; SCARPA, M.V.; LEONARDI, G.R. Influência da viscosidade do veículo na liberação *in vitro* da cafeína. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p. 52-60, 2007.

CHOWDARY, K.P.R., RAJYALAKSHMI,Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharmaceutics New Delhi**, v. 30, p. 51-54, 1987.

CORBO, M., *et al.* Development and Validation of *in vitro* release testing methods for semisolid formulations. **Pharmaceutical Technology**, v. 19, n. 9, p. 112-128, 1993.

COSTIN, G.E.; HEARING, V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **Faseb J.** 2007.

DANGELO, J.G. *et al.* **Anatomia Básica dos Sistemas Orgânicos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2000.

DERMAGE. Disponível em: <http://www.dermage.com.br/dermage/paginas/Estudo-Acido-Fitico.pdf>. Acessado em : 04/03/2014.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M. *In vitro* release of diclofenacdiethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. **Int. j. pharm.**, v. 295, p. 73-79, 2005.

FAGRON, informativo técnico ácido salicílico. Disponível em: [http://cdn.fagron.com.br/doc\\_prod/docs\\_10/doc\\_901.pdf](http://cdn.fagron.com.br/doc_prod/docs_10/doc_901.pdf). Acessado em: 14 de outubro de 2014.

FDA – Guidance for industry: SUPAC-SS Nonsterile Semisolid Dosage forms. Scale-up and Post approval changes: Chemistry, manufacturing and controls: *in vitro* release testing and *in vivo* Bioequivalence Documentation, may 1997.

FITTON, A., GOA, K. L. Azelaic acid. **A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in acne and hyperpigmentary skin disorders**. *Drugs*, v.41, n.5, p.780-798, 1991.

FITZPATRICK, T.B.; MOSHER, D.B. Pigmentação cutânea e distúrbios do metabolismo da melanina. **Medicina interna**. 9 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983.

FLORENCE, A.T. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. São Paulo: Edusp, 2003.

FONSECA, A. SOUZA, E.M. **Dermatologia Clínica**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1986.

FREITAS, R.A. Estrutura e interações entre galactoxiloglucanas e amidos. (Tese de doutorado). **Universidade Federal do Paraná**, 2003.

GOMARA, F. Estudo de permeação cutânea *in vitro* de ácido kójico. (Dissertação Mestrado). **Universidade Federal do Paraná**, 2003.

GOODMAN, L.S; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill, 1996.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; LOPEZ, R.F.V. **Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos**. Química Nova, vol. 31, nº. 6, p. 1490-1498, 2008.

GUEVARA IL, PANDYA AG. Melasma treated with hydroquinone, tretinoin, and a fluorinated steroid. **Int. j.dermatol**. 2001.

GUY, R. H.; HADGRAFT, J.O.N. The determination of drug release rates from topical dosage forms. **Int. j. pharm.**, v. 60, p. R1-R3, 1990.

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

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 5 ed. Rio de Janeiro, 1999.

HANSON RESEARCH. Topical and Transdermal Diffusion Cell Systems. **Featuring the Hanson Microetteplus**. Disponível em:

[http://www.flowscience.com.br/catalogos/hanson/microette\\_plus.pdf](http://www.flowscience.com.br/catalogos/hanson/microette_plus.pdf). Acessado em: 20/05/2014

HERMANN, J.F.; PETIT, L.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C.; PAQUET, P.; PIÉRARD, G.E. Assessment of topical hypopigmenting agents on solar lentigines of Asian women. **Dermatology**, v.204, p. 281-286, 2002.

HIGUCHI, T. J. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 11, p. 85-97, 1960.

HIGUCHI, W. I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 8, p. 802-804, 1962.

HILL, A. R. C; Reynolds, S. L.; **Analyst**, 1999.

ICH. GUIDANCE FOR INDUSTRY. Q2B – **Validation of analytical procedures: Methodology. International Conference on Harmonization**, 06 nov.1996.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008, revisão jul/2011. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf). Acessado em: 17/12/2014.

ITO S. A chemist's view of melanogenesis. **Pigment Cell** , 16:230-6, 2003..

JABLONSKI NG, CHAPLIN G. The evolution of human skin coloration. **J. hum. evol.** 2000

JENKE, D. R. **Instrument. Sci. Technol.** v.26, p.19, 1998.

JONES, L.; ATKINS,P. **Princípios de química – questionando a vida moderna e o meio ambiente.** Bookman. 3 ed. 2006.

JIMBOW K, QUEVEDO JR WC, FITZPATRICK TB *et al.* **Biology of Melanocytes.** Dermatology in General Medicine. v. 1. New York: Mcgraw-Hill; 1999. p.192-220.

KATO, A., ISHIBASHI, Y., MIYAKE, Y. Effect of egg yolklecithin on transdermal delivery of bunazosin hydrochloride.**J. Pharm. Pharmacol.**v. 39. P. 399-400, 1987

KNORST, M.T. Desenvolvimento Tecnológico de Forma Farmacêutica Plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. COMPOSITAE. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

LACHMAN, L. LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: **Fundação Calouse Gulben Bian**, 2001.

LEITE JR, A.C. Desenvolvimento de Bases Cosméticas. **Revista Racine.** São Paulo, n.10, jul-ago, 2000.

LENHINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. Guanabara Koogan. 3 ed. Rio de Janeiro, 1992.

LIPPACHER, A.; MULLER, R. H.; MADER, K. Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: rheological characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 561–567, 2004.

LOURENÇO, A.R.N. Administração tópica de fármacos – das restrições aos desafios. (Dissertação Mestrado). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2013.

LU, H.; EDWARDS, C.; GASKELL, S.; PEARSE, A.; MARKS, R. Melanin content and distribution in the surface corneocyte with skin phototypes. **British Journal of Dermatology**, 1996.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 38, n 4, p. 375-399, 2002.

MAPRIC, ácido salicílico. Disponível em: [http://www.mapric.com.br/anexos/boletim21\\_15042008\\_110607.pdf](http://www.mapric.com.br/anexos/boletim21_15042008_110607.pdf). Acessado em: 14 de outubro de 2014.

MARCOLONGO, R., STORPIRTIS, S. Dissolução de medicamentos fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. In press. (Dissertação de Mestrado) **Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP**, 2003.

MARRIOT, C. Rheology and the flow of fluids. In: AULTON, M.E. *Pharmaceutics: the science of dosage form design*. Churchill Livingstone, 1996.

MARTINS, M.R.F.M.M; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, jan./mar., 2002.

MENDONÇA, C.C.; SILVA, I.C.L.; RODRIGUES, K.A. ; CAMPOS, M.A.L. ; MEDEIROS, M.C.M.; CASTELI, V.C.; FERRARI, M.; MUSIS, C.R.; MACHADO, S.R.P. Emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%: avaliação da estabilidade acelerada e estudos de liberação *in vitro*. **Rev. Ciên. Farm Básica Apli.** v.30, n1, p.26-37, 2009.

MILAN, A.L.K.; MILÃO, D.; SOUTO, A.A.; CORTE, T.W.F. Estudo de hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. *Rev. bras. ciêc. Farm.*v.43, n.4, out/dez., 2007.

MINER, P.E. Emulsion Rheology: Creams and Lotions. *Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries*. Edited by Dennis Laba, New Jersey, 1993.

MOHAMED, R. ; MOHAMED, M.S.; SUHAILI, N.; SALLEH, M.M.; ARIFF, A. Kojic acid: applications and development of fermentation process for production. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**; v. 5; p. 24-37; abril, 2010.

MUENZEL, K., BUECHI, J., SCHULTZ, O.E. **GalenichesPraktium**. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1959.

NAÉ, H.N. Introduction to Rheology. **Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries**. New Jersey, Dennis Laba, 1993.

NAGELREITER, C.; RAFFEINER, S.; GEYERHOFER, C.; KLANG, V.; VALENTA, C. Influence of drug content, type of semi-solid vehicle and rheological properties on the skin penetration of the model drug fludrocortisones acetate. **Int. J. Pharmaceut.**, 2013.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. Fundamentos de Físico-Química: uma abordagem conceitual para as Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed, 2002.

NG, S. F.; ROUSE, J.; SANDERSON, D.; ECCLESTON, G. A comparative study of transmembrane diffusion and permeation of ibuprofen across synthetic membranes using Franz diffusion cells. **Pharmaceutics**, v. 2, p. 209-223, 2010.

NORLUND, J.J. et al. Pigment cell biology: an historical review. **J. Invest. Dermatol.**v.92, n.4, 1989.

ORDIZ, I. Melanina e agentes despigmentantes.**Rev.cosm.med.estet.**, n.10, ago-set, 2003.

PETIT, L. PIERARD, G.E. Skin-lightening products revisited. **Inter J Cosmetic Sci**, v.25, p.169-181, 2003.

PIANTAVINI, M.S. Desenvolvimento e validação de um método espectrofotométrico para a quantificação de ácido kójico por complexação com alumínio e caracterização do complexo.(Dissertação Mestrado). **Universidade Federal do Paraná**, 2010.

PONZIO HAS, CRUZ MF. Acuracia do exame sob a lâmpada de Wood na classificacao dos cloasmas. **An Bras Dermatol**. 1993.

PRISTA, L. N. *et al.* Tecnologia Farmacêutica, 6a ed. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian**, v. 1, 2003.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. **TecnologiaFarmacêutica**, 6a ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 2008.

RAFFIN, R.P. Entendendo nanopartículas lipofílicas em cosméticos. 03/11/2010. Disponível em:[www.ativosdermatologicos.com.br/site/informe/mostra.php?id=59](http://www.ativosdermatologicos.com.br/site/informe/mostra.php?id=59). Acessado em: 22/05/2013.

RENDON M, BERNEBURG M, ARELLANO I, PICARDO M.Treatment of melasma. **J Am Acad Dermatol**.2006.

SAINI, S. Synthesis and QSAR studies of some Quinazoline derivatives: an approach towards development of antimicrobial formulation. **Pharmaceutical Sciences**, 2010.

SAMPAIO, S.A.P. RIVITTI,E.A. **Dermatologia**. 1 ed. São Paulo:Artes Médicas, 1998.

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

SHAH, J.C. Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method. **International Journal of Pharmaceutics**. Amsterdam, v.90, p. 161-169, 1993.

SHAH, V. P.; ELKIN, J. S. *In-vitro* release from corticosteroid ointments. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 9, p. 1139-1140, 1995.

SHAH, V. P.; ELKINS, J. S.; LAM, S. Y.; SKELLY, J. P. Determination of *in vitro* drug release from hydrocortisone creams. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 53, p. 53-59, 1989

SARUNO, R., KATO, F., IKENO, T. **Agric. Biol. Chem.**, p. 1337-1338, 1979.

SULEM P, GUDBJARTSSON DF, STACEY SN, HELGASON A, RAFNAR T, MAGNUSSON KP, et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. **Nat Genet**. 2007.

SULAIMON SS, KITCHELL BE. The biology of melanocytes. **Vet Dermatol**. 2003.

THODY AJ, GRAHAM A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? **Pigment Cell**. 1998.

THOMPSON, J.E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TOSCANO, C.; CAMPOS, R.; BICA, A.; FARINHA, A.R. Sensibilidade dos ensaios de difusão *in vitro* na detecção de alterações induzidas pelo efeito da temperatura em formulações semissólidas de cetoconazol. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v.67, n. 4, Lisboa, 1997.

TOSCANO, C.; CAMPOS, R.; BICA, A.; FARINHA, A.R. Desenvolvimento e validação de um sistema de avaliação da liberação *in vitro* do peróxido de benzoíla veiculado em géis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3,set./dez., 2001.

UEDA, C.T *et al.* Topical and Transdermal Drug Products. **The United States Pharmacopeial Convention, Inc.** Pharmacopeial Forum, v. 35, p. 750–764, 2009.

USP. The Official Compendia of Standards. The **United States Pharmacopeial Convention**, vol. 2, 2008.

USP. “Topical and transdermal drug products – Product quality tests”. Pharmacopeial Forum, 35: June, 2009.

VIAFARMA. Fispq ácido kójico. Disponível em:  
<http://www.viafarmanet.com.br/site/downloads/fispqs/%C3%81CIDO%20K%C3%93JICO.pdf>. Acessado em : 22/05/2014

VIGLIOGLIA, P.A., RUBIN, J. **Cosmetria II**. Buenos Aires: A P Americana, 1989.

ZATZ, J. L. Drug release from semisolids: Effect of membrane permeability on sensitivity to product parameters. **Pharm.res.**, v. 12, n. 5, 1995.

ZATZ, J. L.; SEGERS, J. D. Techniques for measuring *in vitro* release from semisolids. **Dissolution Technologies**, v. 5(1), p. 3-13, 1998.

YABUTA, T. International Congress of Applied Chemistry. **Original Communications**. Vol. 25, p.455-462, 1912.

YOKOMIZO, Y.; SAGITANI, H. Effects of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of the guinea pig, *in vitro*. **J. Controlled Release**, v.38, p. 267-274, 1996.

YOUN, J.I.; OH, J.K.; KIM, B.K.; SUH, D.H.; CHUNG, J.H.; OH, S.J.; KIM, J.J.; KANG, S.H. Relationship between skin phototype and MED in Korean brown skin. **Photodermatology, Photoimmunology, Photomedicine**, 1997.

WAGNER, H.; KOSTKA, K.H.; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U.F. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from *in vitro* experiments with human skin and skin equivalents. **J. control. release.**, v. 75, p. 283-295, 2001.

WALKOW, J. C.; MCGINITY, J. W. The effect of physicochemical properties on the diffusion of drug *in vitro* through synthetic membranes and pig skin I. Methylsalicylate. **Int. J. pharm.**, v. 35. p. 91-102, 1987.