

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**KARIN GOEBEL**

**ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO DICLOFENACO DIETILAMÔNIO EM  
ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS**

**CURITIBA**

**2012**

**KARIN GOEBEL**

**ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO DICLOFENACO DIETILAMÔNIO EM  
ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS**

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 a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Itamar Francisco Andrezza  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mayumi Eliza Otsuka Sato

**CURITIBA  
2012**

Goebel, Karin

Estudo de liberação *in vitro* do diclofenaco dietilamônio em especialidades farmacêuticas / Karin Goebel – Curitiba, 2012. 96 f.: il. (algumas color.); 30 cm

Orientador: Professor Dr. Itamar Francisco Andreazza  
Coorientadora: Professora Dra. Mayumi Eliza Otsuka Sato  
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2012.

Inclui bibliografia

1. Teste de liberação *in vitro*. 2. Diclofenaco dietilamônio. 3. Membranas sintéticas. 4. Medicamentos genéricos. I. Andreazza, Itamar Francisco. II. Sato, Mayumi Eliza Otsuka. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1

# TERMO DE APROVAÇÃO

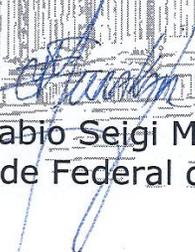
**KARIN GOEBEL**

**Título: ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO DICLOFENACO  
DIETILAMÔNIO EM ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS**

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. Leticia Norma Carpentieri Rodrigues  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof. Dr. Fabio Seigi Murakami  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 30 de março de 2012.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Itamar Andreazza, por ter aceitado o desafio de orientar nessa nova área, pela oportunidade, ensinamentos, compreensão, confiança e liberdade na condução desse trabalho.

À Professora Mayumi Sato pela coorientação essencial, sugestões, conhecimentos compartilhados, discussões, conselhos e momentos alegres dos quais sentirei muita saudade.

À Dayse Fernanda de Souza, minha querida colega, amiga, irmã. Obrigada pelas palavras de incentivo, amizade e companheirismo durante toda essa jornada: minha parceira perfeita!

Ao Professor Fabio Murakami pela ajuda nas discussões. À Maria da Graça pelo auxílio nas análises, sua amizade e presteza. Ao colega Marco André Cardoso pelo empréstimo da coluna cromatográfica, ao Volnei Tondo, à Inêz Maria e a todos outros colegas dos laboratórios pelo suporte na realização desse projeto. Ao Programa REUNI pela bolsa de estudos concedida.

Aos amigos Simone Braga da Silva, Juliana Schulte Haas, Carolina Seffrin Custodio, Rafael Luiz Roratto, Sirlei Sayomi Hayashi, Citeli Giongo, Vanessa Rossi, Fernanda Michely Nicoli, Camila Bugnotto e a todos outros amigos pela força, alguns mesmo distantes fisicamente, mas sempre presentes em minha vida, vocês moram no meu coração.

Aos amigos Adriana Ramirez Peña, Cynthia Imada, Sergio Machado (Nuno), Alessandra Nunez e Thais Hipolito, por fazerem de Curitiba meu novo lar.

A minha família pelo incentivo, especialmente aos meus pais Milton e Diva Goebel e a minha irmã Kerly Goebel, pelo apoio e segurança que me proporcionaram nessa etapa da vida.

## EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

## RESUMO

Para exercer efeito terapêutico, medicamentos tópicos de aplicação cutânea precisam primeiramente liberar o fármaco do veículo, para que desta forma ele se torne disponível para penetração nas camadas da pele, até atingir seu local de ação. A liberação do fármaco do veículo depende principalmente das características da formulação. Até a presente data, para registrar um medicamento genérico ou similar no Brasil não é exigido testes de desempenho para produtos tópicos de ação local. Tem se popularizado o teste de liberação *in vitro* que emprega o sistema de célula de difusão vertical, com membranas sintéticas, para avaliação do desempenho de produtos semissólidos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a liberação *in vitro* de especialidades farmacêuticas de diclofenaco dietilamônio gel do mercado farmacêutico brasileiro. Fatores que influenciam o teste como o tipo de membrana usada nos ensaios de liberação e características da formulação que impactam a velocidade de difusão foram avaliadas. A legislação vigente no país permite que medicamentos genéricos contenham excipientes diferentes do medicamento referência. Esta diferença afetou a liberação do fármaco do veículo, assim como suas viscosidades e tamanho de gotículas. Dos quatro medicamentos genéricos testados apenas um seria considerado equivalente ao medicamento referência Cataflam Emulgel®. As membranas de acetato de celulose e polietersulfona testadas apresentaram-se intercambiáveis nos estudos de liberação desse produto.

Palavras-chave: Teste de liberação *in vitro*. Diclofenaco dietilamônio. Membranas sintéticas. Medicamentos genéricos.

## ABSTRACT

In order to carry therapeutic effect, topical dermal dosage forms must at first release the drug from the vehicle, so that this way it becomes available to penetrate skin layers to reach its site of action. The release of drug from the vehicle depends mainly on the features of the formulation. So far, to register a generic or a similar medicine in Brazil is not required performance tests to topical drug products for local action. The *in vitro* release test which employs the vertical diffusion cell with synthetic membranes, to assess the performance of semisolid products, has been popularized. This study aimed to evaluate the *in vitro* release of commercial products of diclofenac diethylamine gel from Brazilian pharmaceutical market. Factors that influence the test like the type of membrane used and impact of the formulation characteristics on the diffusion rate were evaluated. The current law in the country allows generic drug products containing excipients other than the reference drug. This difference affected the drug release from the vehicle as well as their viscosity and droplet size. Only one of the four generic drug products tested would be considered equivalent to the reference Cataflam Emulgel®. The cellulose acetate and polyethersulfone membranes tested showed to be interchangeable in the *in vitro* release studies of this product.

Keywords: *In vitro* release test. Diclofenac diethylamine. Synthetic membranes. Generic drug products.

.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CAMADAS DA PELE HUMANA E SUAS ESTRUTURAS LOCAIS .....	20
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PELE - “PAREDE DE TIJOLOS” – E AS ROTAS DE PENETRAÇÃO .....	22
FIGURA 3 – AÇÃO DOS PROMOTORES DE PENETRAÇÃO NOS LIPÍDEOS INTERCELULARES .....	26
FIGURA 4 – CÉLULA DE DIFUSÃO DE FRANZ .....	28
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO DDA .....	39
FIGURA 6 – COMPONENTES DO APARATO .....	47
FIGURA 7 – DESENHO EXPERIMENTAL DA DISPOSIÇÃO DAS CÉLULAS NO TESTE DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	49
FIGURA 8 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE DICLOFENACO SÓDICO 125 µg/mL EM SOLUÇÃO RECEPTORA .....	53
FIGURA 9 – CURVA ANALÍTICA DO DICLOFENACO SÓDICO NA SOLUÇÃO RECEPTORA .....	54
FIGURA 10 – ANÁLISE DA PUREZA DOS PICOS .....	55
FIGURA 11 – CORRELAÇÃO ENTRE O FLUXO DE LIBERAÇÃO DO DDA COM O TEOR DE ÁGUA DAS FORMULAÇÕES .....	57
FIGURA 12 – VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA VELOCIDADE DE CISALHAMENTO .....	58
FIGURA 13 – CURVA DE FLUXO DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA DE 5 a 40 RPM (3,4 a 27,1 1/seg) .....	59
FIGURA 14 – CORRELAÇÃO ENTRE O FLUXO DE LIBERAÇÃO DO DDA COM A VISCOSIDADE DAS FORMULAÇÕES .....	62
FIGURA 15 – HISTOGRAMAS DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE GOTÍCULA .....	63
FIGURA 16 – ANÁLISE POR IMAGEM DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA COM AUMENTO DE 400X .....	64
FIGURA 17 – ANÁLISE POR IMAGEM DO GENÉRICO “C” COM AUMENTO DE 400X .....	64

FIGURA 18 – ANÁLISE POR IMAGEM DO GENÉRICO “C” COM AUMENTO DE 1000X.....	65
FIGURA 19 – CORRELAÇÃO ENTRE O FLUXO DE LIBERAÇÃO DO DDA COM O TAMANHO DE GOTÍCULA DAS FORMULAÇÕES .....	66
FIGURA 20 – PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA.....	70
FIGURA 21 – PADRÃO DE LIBERAÇÃO ESPERADO PARA DOIS SISTEMAS: 1 – GEL DE LIBERAÇÃO RÁPIDA E 2 – POMADA DE LIBERAÇÃO LENTA.....	72
FIGURA 22 – QUANTIDADE LIBERADA EM FUNÇÃO DA $\sqrt{t}$ COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA USANDO OS PONTOS DE COLETA DE 0,5 ATÉ 6h .....	74
FIGURA 23 – QUANTIDADE LIBERADA EM FUNÇÃO DA $\sqrt{t}$ COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA USANDO OS PONTOS DE COLETA ESCOLHIDOS PARA CADA PRODUTO .....	75
FIGURA 24 – EXTRAPOLAÇÃO ATÉ O EIXO X DA RETA DE REGRESSÃO LINEAR PARA VISUALIZAÇÃO DO <i>LAG TIME</i> .....	76
FIGURA 25 – PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE .....	82
FIGURA 26 – QUANTIDADE LIBERADA EM FUNÇÃO DA $\sqrt{t}$ COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE USANDO OS PONTOS DE COLETA ESCOLHIDOS PARA CADA PRODUTO .....	82

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – COMPOSIÇÃO QUALITATIVA DAS FORMULAÇÕES.....	42
TABELA 1 – COMPARATIVO DOS RESULTADOS DE LIBERAÇÃO E DOS TESTES FÍSICO-QUÍMICOS .....	56
TABELA 2 – ESTUDO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA .....	59
TABELA 3 – VISCOSIDADE APARENTE .....	60
TABELA 4 – DIÂMETRO DAS GOTÍCULAS .....	63
TABELA 5 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA .....	68
TABELA 6 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA DO GENÉRICO A COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA .....	69
TABELA 7 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA DO GENÉRICO B COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA .....	69
TABELA 8 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA DO GENÉRICO C COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA .....	69
TABELA 9 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA DO GENÉRICO D COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA .....	70
TABELA 10 – FLUXOS, COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO E <i>LAG TIME</i> DOS PRODUTOS ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA ..	74
TABELA 11 – TESTE ESTATÍSTICO ENTRE GENÉRICOS E O REFERÊNCIA COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA.....	77
TABELA 12 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA PARA O MEDICAMENTO REFERÊNCIA COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE ..	80
TABELA 13 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA PARA O GENÉRICO A COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE .....	80
TABELA 14 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA PARA O GENÉRICO B COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE .....	80
TABELA 15 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA PARA O GENÉRICO C COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE .....	81

TABELA 16 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA PARA O GENÉRICO D COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE .....	81
TABELA 17 – FLUXOS, COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO E <i>LAG TIME</i> DOS PRODUTOS COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE .....	83
TABELA 18 – TESTE ESTATÍSTICO ENTRE GENÉRICOS E O REFERÊNCIA COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE .....	83
TABELA 19 – TESTE ESTATÍSTICO: MEMBRANA DE POLIETERSULFONA X MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE .....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINE – Anti-inflamatório não-esteroidal

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA - Análise de variância

A/O – Água-óleo

BHT – Butil-hidroxi-tolueno

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COX – Cicloxigenase

DAD – Detector de arranjo de fotodiodos

DDA – Diclofenaco dietilamônio

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

D<sub>10</sub> - Diâmetro equivalente ao percentil 10 % da distribuição

D<sub>50</sub> - Diâmetro equivalente ao percentil 50 % da distribuição

D<sub>90</sub> - Diâmetro equivalente ao percentil 90 % da distribuição

EDTA – Edetato dissódico

FDA – *Food and Drug Administration*

O/A – Óleo-água

RDC – Resolução da Diretora Colegiada

SUPAC – SS - *Guidance for Industry on Scale Up and Post Approval Changes for Semisolids*

USP – United States Pharmacopoeia

VDC – *Vertical Diffusion Cell* (Célula de difusão vertical)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
3.1 Pele .....	20
3.1.1 Penetração de fármacos na pele.....	22
3.2 Produtos farmacêuticos administrados por via tópica .....	26
3.3 Teste de liberação <i>in vitro</i> .....	27
3.3.1 Aspectos regulatórios.....	31
3.4 Reologia .....	33
3.4.1 Viscosidade x liberação.....	34
3.5 Tamanho de gotícula.....	35
3.5.1 Tamanho de gotícula x liberação.....	37
3.6 DDA gel: fármaco/formulação modelo.....	38
3.6.1 Formas farmacêuticas do tipo emulgel.....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
4.1 Materiais.....	41
4.1.1 Especialidades farmacêuticas em estudo .....	41
4.1.2 Membranas sintéticas a serem testadas .....	41
4.1.3 Reagentes .....	42
4.1.4 Equipamentos e utensílios .....	43
4.2 Métodos.....	44

4.2.1 Método para quantificação do teor das especialidades farmacêuticas de DDA .....	44
4.2.1.1 Condições cromatográficas do método de teor .....	44
4.2.1.2 Cálculo do teor .....	45
4.2.2 Método para quantificação do DDA nas amostras do ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	45
4.2.2.1 Condições cromatográficas do método de quantificação das amostras no ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	45
4.2.2.2 Curva de calibração.....	46
4.2.2.3 Análise da pureza dos picos cromatográficos .....	46
4.2.3 Realização do ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	47
4.2.3.1 Solução receptora .....	48
4.2.3.2 Preparo do aparato.....	48
4.2.3.3 Preparo da amostra.....	49
4.2.3.4 Execução do ensaio .....	49
4.2.3.5 Cálculo da velocidade de liberação <i>in vitro</i> .....	50
4.2.3.6 Comparação das velocidades de liberação <i>in vitro</i> .....	50
4.2.4 Tamanho das gotículas .....	50
4.2.5 Determinação do pH.....	51
4.2.6 Teor de água nas formulações.....	51
4.2.7 Caracterização reológica.....	52
<b>5 RESULTADOS e DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
5.1 Método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência.....	53
5.1.1 Curva Analítica .....	54
5.1.2 Análise da Pureza dos Picos.....	55
5.2 Avaliação dos testes de qualidade .....	56
5.2.1 Caracterização reológica.....	58

5.2.1.1 Viscosidade x liberação.....	61
5.2.2 Tamanho de Gotícula.....	62
5.2.2.1 Tamanho de gotícula X liberação.....	66
5.3 Resultados do ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	68
5.3.1 Liberação <i>in vitro</i> com a membrana de polietersulfona .....	68
5.3.1.1 Cálculo da velocidade de liberação (Fluxo).....	71
5.3.1.1.1 Escolha dos pontos para cálculo da velocidade de liberação .....	72
5.3.1.2 Comparação das velocidades de liberação <i>in vitro</i> .....	76
5.3.2 Liberação <i>in vitro</i> com a membrana de acetato de celulose.....	79
5.3.3 Comparação dos resultados obtidos com a membrana de polietersulfona e de acetato de celulose.....	84
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>86</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Um aspecto fundamental para a qualidade de qualquer medicamento é a sua eficácia demonstrada em testes clínicos. O tempo e os custos associados a esses ensaios os tornam impraticáveis como método de controle de qualidade na rotina. Por isso, neste caso, testes *in vitro* são frequentemente usados para verificar se a qualidade e desempenho lote-a-lote dos produtos são mantidas ao longo do tempo (FDA, 1997; SHAH, 2005).

Existem duas categorias de testes *in vitro* que são realizados com produtos farmacêuticos para garantir sua confiabilidade: 1 - Testes de qualidade: geralmente fazem parte da monografia do produto no compêndio oficial e são realizados para garantir atributos como teor, identificação, uniformidade de conteúdo, pH, limites microbianos e volume de envase mínimo. 2 - Testes de desempenho: são conduzidos para avaliar a liberação do fármaco do produto acabado (UEDA *et al.*, 2009).

Testes de desempenho *in vitro* para produtos sólidos como o ensaio de dissolução há muito tempo vêm sendo usados como ferramenta de desenvolvimento de formulações, controle de qualidade na rotina, em alterações de processo e de fórmula e para prever o desempenho *in vivo* do produto. Um teste que avalie o desempenho de produtos semissólidos pelos mesmos motivos do ensaio de dissolução para sólidos tem sido objeto de muitas discussões (SHAH, 2005).

No momento, tem se popularizado o teste de desempenho que emprega o sistema de célula de difusão vertical (*Vertical Diffusion Cell – VDC*) para produtos semissólidos, especificamente cremes, loções, pomadas e géis. Este quantifica o fármaco liberado da formulação que irá se difundir através de uma membrana para uma solução receptora. Em 2009, o fórum da Farmacopéia Americana sugeriu o uso da VDC para ensaios de desempenho de produtos tópicos (UEDA *et al.*, 2009).

Quando o produto é aplicado topicamente, o fármaco precisa ser liberado de seu veículo antes de entrar em contato com a superfície da epiderme e estar disponível para penetração no estrato córneo e camadas mais profundas da pele (GUY *et al.*, 1986). Dentro deste conceito é importante distinguir dois tipos de teste, o de liberação e o de permeação, ambos utilizando a VDC. Testes de permeação são realizados para quantificar o quanto do produto permeou ou ficou retido nas

camadas da pele. Geralmente é feito com a pele humana ou de animais. Teste de liberação irá avaliar se o veículo é capaz e em que velocidade libera o fármaco da formulação para posteriormente penetrar na pele, é realizado com membranas sintéticas, sendo este o foco do presente trabalho.

Os medicamentos genéricos na forma semissólida são anualmente lançados em grande número no mercado brasileiro, sendo que até o momento não existe legislação específica regulando os testes de desempenho para estes produtos, suscitando dúvidas em relação a sua eficácia.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os medicamentos genéricos de aplicação tópica estão dispensados de estudos de bioequivalência, conforme consta no Guia para isenção e substituição de estudos de bioequivalência, exigindo-se apenas a comprovação da equivalência farmacêutica para manter a intercambialidade destes com o medicamento de referência. Até então, no Brasil, para semissólidos nenhum teste de desempenho era solicitado tanto para registro como para fazer alteração pós-registro de um medicamento. A resolução vigente exigia para registro apenas a equivalência farmacêutica através de testes de qualidade e o emprego de excipientes com a mesma função (BRASIL, 2003a).

Porém, a ANVISA publicou no final do ano de 2009 a RDC Nº 48 (BRASIL, 2009), que dispõe sobre alterações pós-registro de medicamentos, na qual solicita, pela primeira vez, um teste de desempenho (permeação cutânea) para produtos semissólidos, tornando-se objeto de discussões a respeito de como proceder o teste. Além disso, discussões atuais apontam para a criação de uma nova legislação no país regulamentando os testes de desempenho que podem ser aplicáveis não somente para pós-registro como para o registro de novos medicamentos genéricos e similares. Uma possível exigência de testes de liberação como um dos requisitos para isentar produtos semissólidos de ensaios de bioequivalência pode ser implantada no país, reforçando a necessidade de estudar o teste de liberação *in vitro* como ferramenta de desenvolvimento de produtos.

O ensaio de liberação pode detectar diferenças na liberação do fármaco de formulações semissólidas submetidas às alterações pós-registro, entre lotes da mesma formulação com desvios e também na etapa de desenvolvimento, entre o medicamento referência e os candidatos à genérico. Deste modo, o presente

trabalho justifica-se pelo fato de auxiliar na execução deste tipo de análise e avaliar a situação dos medicamentos genéricos nacionais para esta forma farmacêutica.

Além disso, como não existe padronização dos parâmetros do teste, como o tipo de membrana artificial a ser utilizada, será discutido também este item para o desenvolvimento de metodologias de liberação através do estudo de formulações do mercado de diclofenaco dietilamônio gel que será a fórmula/fármaco modelo. Este tem como medicamento referência o Cataflam Emulgel<sup>®</sup>, um anti-inflamatório tópico amplamente utilizado, o qual atualmente possui muitos equivalentes genéricos, além dos similares.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a equivalência farmacêutica das especialidades farmacêuticas contendo diclofenaco dietilamônio gel, por meio de ensaios de qualidade e de liberação *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade do medicamento de referência e dos medicamentos genéricos disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro por meio de ensaios físico-químicos;
- Avaliar o desempenho de liberação *in vitro* das especialidades farmacêuticas;
- Avaliar a intercambialidade das membranas empregadas no ensaios de liberação *in vitro*;
- Correlacionar os resultados dos ensaios de qualidade com o desempenho de liberação *in vitro*;
- Avaliar a influência dos componentes das formulações nos resultados de qualidade e de liberação *in vitro*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Pele

A pele é o órgão mais complexo do corpo humano, a julgar pelo número de tipos de células que ela contém e é uma barreira à absorção de fármacos administrados por via tópica (BARRY, 1983; SHAH *et al.*, 1991).

A pele pode ser dividida histologicamente em duas camadas (epiderme e derme) com um tecido gorduroso subjacente (Figura 1). Essas camadas formam uma barreira laminada de proteção tanto contra a permeação de agentes externos como à perda de água interna do organismo (BRONAUGH, MAIBACH, 2005; ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007).

A epiderme é formada pelo estrato córneo, que é a camada mais externa, e a epiderme viável. O estrato córneo, com espessura de somente 15 a 20  $\mu\text{m}$  é considerado a principal barreira à permeação dos fármacos na pele, por isso merece atenção especial (HADGRAFT, 2001; BRONAUGH, MAIBACH, 2005).

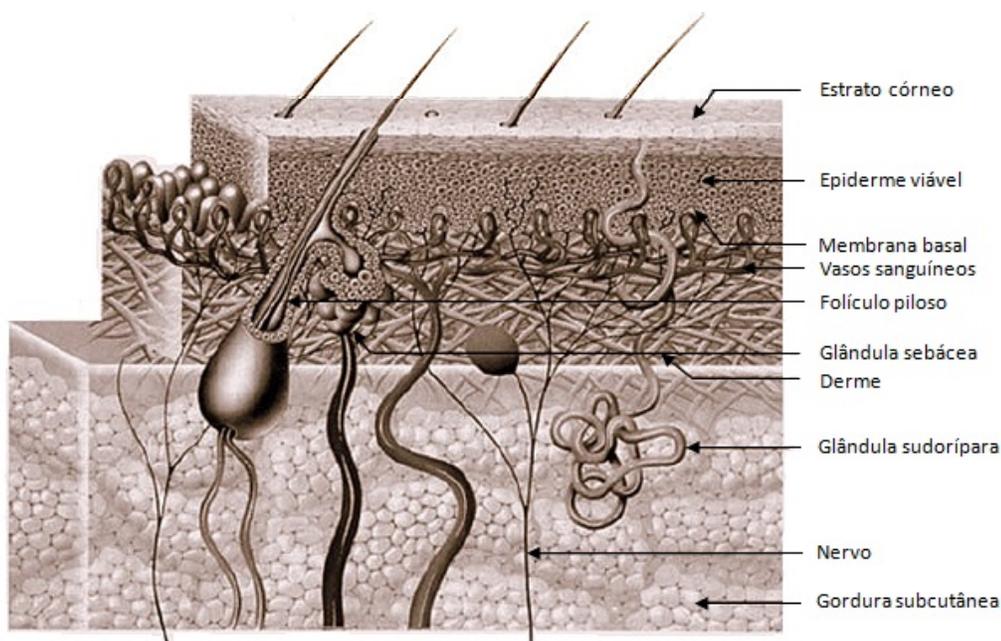


FIGURA 1 – CAMADAS DA PELE HUMANA E SUAS ESTRUTURAS LOCAIS  
FONTE: ADAPTADO DE BRONAUGH, MAIBACH (2005)

O estrato córneo é uma camada descamativa, constituída de células epidérmicas mortas ou em via de degeneração, ricas em queratina, parcialmente dessecadas, chamadas de corneócitos e são produto final da diferenciação das células da epiderme viável. Sua composição é de aproximadamente 40% de proteína e 40 % de água, sendo o restante formado por lipídeos, principalmente triglicérides, ácidos graxos livres, colesterol e fosfolipídeos (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007). Michaels, Chandrasekaran e Shaw (1975) fizeram uma analogia comparando a estrutura do estrato córneo com uma “parede de tijolos” (Figura 2). Os corneócitos repletos de queratina seriam os tijolos hidrofílicos, enquanto os lipídios intercelulares seriam o cimento hidrofóbico.

A superfície do estrato córneo é recoberto por um filme composto de uma mistura de sebo, suor e células epidérmicas e oferece pequena resistência à penetração de fármacos devido a sua composição variável e falta de continuidade (PRISTA *et al.*, 2003; ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007).

A derme está localizada abaixo da epiderme e é separada desta por uma fina membrana basal. Na superfície de contato com a epiderme há interpenetração, formando pequenas saliências chamadas de “papilas”. A derme é constituída de tecido conjuntivo denso fibroso. Ela é responsável pelas propriedades elásticas da pele e dá suporte para a epiderme e estruturas locais como os vasos sanguíneos e fibras nervosas, que emergem da camada adiposa subcutânea e atravessam a derme. As glândulas sebáceas, as glândulas sudoríparas e os folículos pilosos (chamados de apêndices da pele) originam-se na derme e nas camadas subcutâneas e atingem a superfície da pele. Ao contrário da epiderme este tecido é bastante vascularizado (PRISTA *et al.*, 2003; BARRY, 2005).

O tecido subcutâneo, também chamado de hipoderme, é formado por células adiposas unidas por fibras de colágeno e funciona como amortecedor mecânico, barreira térmica e estoque de energia (BARRY, 2005; BRONAUGH, MAIBACH, 2005).

O pH de uma pele sadia varia conforme a região do corpo, mas oscila, de forma geral, entre 5,5 e 7 e é mantido por um sistema tampão de ácido láctico/lactato, pelos ácidos do suor, sebo e pelos elementos ácidos da queratina. O filme gorduroso que recobre o estrato córneo tem pH 5-5,5 (PRISTA *et al.*, 2003).

### 3.1.1 Penetração de fármacos na pele

A liberação de fármacos através da complexa estrutura da pele humana promove um grande desafio científico nessa importante área terapêutica (BARRY, 1999). A pele normal e íntegra atua como uma barreira natural, limitando o grau e a velocidade de penetração do fármaco. Essa barreira se deve ao estrato córneo. Uma vez atravessado o estrato córneo, a molécula pode permear as camadas mais profundas da epiderme e atingir a derme. Se o fármaco atingir a camada vascularizada da derme, torna-se disponível para ser absorvido pela circulação geral (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007). A camada córnea da pele impede que os fármacos a atravessem prontamente, mas quase todas as moléculas de baixo peso molecular a penetram em algum nível (BARRY, 2005).

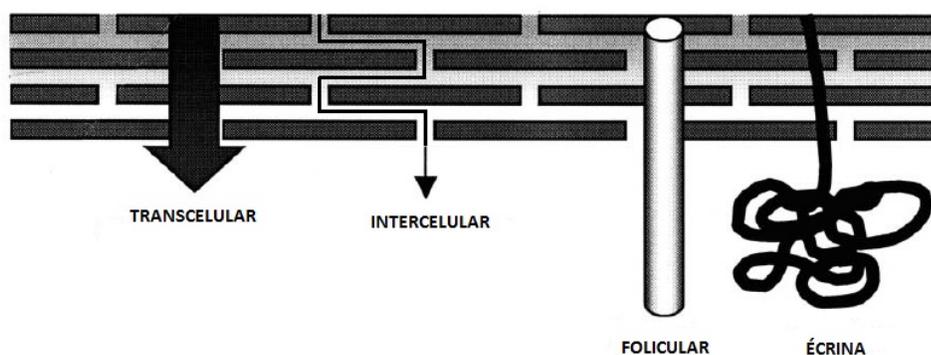


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PELE - “PAREDE DE TIJOLOS” – E AS ROTAS DE PENETRAÇÃO  
 FONTE: ADAPTADO DE HADGRAFT (2001)

Existem três tipos de rotas (Figura 2) pelas quais uma molécula pode atravessar o estrato córneo:

- (1) Intercelular: penetração entre as células, ao longo do tortuoso caminho da camada lipídica;
- (2) Transcelular: penetração através das células do estrato córneo, alternando com a camada lipídica;
- (3) Via apêndices da pele (glândulas sudoríparas écrinas e folículos pilosos com suas glândulas sebáceas associadas): sob condições normais essa rota não é muito

significante, em parte devido a pequena área de superfície ocupada por esses elementos. A área folicular representa aproximadamente 0,1 % e a écrina 0,001 % da superfície total da pele (HADGRAFT, 2001). Entretanto, alguns autores apontam a importância da rota anexial na fase inicial da difusão, sendo esta contribuição subestimada muitas vezes. Esta rota pode ser de grande interesse para fármacos usados no tratamento de doenças de pele relacionadas com a área folicular (BRONAUGH, MAIBACH, 2005).

As células do estrato córneo ligam-se umas às outras por uma espécie de “cimento” rico em lipídeos dispostos em bicamadas. Por isso, a via intercelular representa um bom acesso para as substâncias com características apolares (PRISTA *et al.*, 2008). Geralmente, é aceito que a rota dominante de penetração do estrato córneo é a rota intercelular. Isto é causado principalmente pela dificuldade em transpor a barreira de corneócitos ricos em queratina. Entretanto, esta é uma barreira hidrofílica, por isso o transporte transcelular para pequenas moléculas hidrofílicas como a água não pode ser completamente excluído (BRONAUGH, MAIBACH, 2005). Para eletrólitos e moléculas grandes com baixo coeficiente de difusão, como esteróides apolares e antibióticos, e algumas partículas coloidais, os apêndices podem funcionar como a principal entrada (BARRY, 2005).

A penetração de um fármaco na pele depende de um grande número de fatores, incluindo as propriedades físico-químicas do fármaco (particularmente seu tamanho e forma, solubilidade, coeficiente de partição e da constante de dissociação - pKa), as características do veículo farmacêutico e a condição da pele em que será aplicado o produto (BARRY, 2005). Os fármacos penetram com mais facilidade na forma não-ionizada, fármacos com peso molecular entre 100 e 800 podem permear a pele, sendo ideal o tamanho inferior a 400. A hidratação da pele favorece a absorção percutânea (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007).

Substâncias com características de solubilidade tanto em água como em óleo são boas candidatas à difusão através do estrato córneo (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007). Um exemplo é o diclofenaco dietilamônio (DDA), fármaco anfifílico, que apresenta a capacidade de interagir com os fosfolipídeos da pele, aumentando sua fluidez no estrato córneo e sua permeabilidade cutânea, pois faz com que os lipídeos passem de uma forma cristalina ordenada para uma forma líquida desordenada (KRIWET, MUELLER-GOYMANN, 1995; DJORDJEVIC, PRIMORAC, STUPAR, 2005; SILVA *et al.*, 2009).

Há poucas evidências sugerindo que existe algum processo ativo envolvido na permeação cutânea, sendo o processo de transporte controlado por difusão passiva simples. Apesar de complexidade da pele, a lei de difusão proposta por Fick, geralmente pode ser usada para analisar e prever dados de permeação (BARRY, 1999). A primeira lei de Fick é usada para descrever o estado de equilíbrio de difusão e pode ser simplificada em (HADGRAFT, 2001):

$$J = \frac{DK\Delta c}{h} \quad (1)$$

Onde:

J: é o fluxo 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 ( $S_v$ ):

$$K = \frac{S_p}{S_v} \quad (2)$$

Assim, o fluxo de fármaco através da pele, J, aumenta com (MARTINS, VEIGA, 2002):

- O incremento do coeficiente de difusão do fármaco na pele (D) e com a solubilidade do fármaco na pele ( $S_p$ );
- O aumento de concentração de fármaco no veículo ( $\Delta c$ ) ou com o decréscimo da sua solubilidade no veículo ( $S_v$ ).

A força condutora da difusão através da pele é o gradiente químico potencial (HADRGRAFT, 2001). Para que velocidade de liberação seja aumentada, deve-se usar o fármaco em altas concentrações efetivas, na sua atividade termodinâmica máxima. Nesse contexto, entende-se atividade termodinâmica como a “tendência a escapar”, ou seja, a força para que o fármaco seja liberado do veículo e penetre na pele. Assim um fármaco que estiver em concentração próxima da saturação no veículo, será mais facilmente liberado deste. A saturação é o limite máximo da atividade termodinâmica. A alta concentração efetiva é adquirida por meio de modulação da formulação visto que a concentração terapêutica da forma farmacêutica geralmente não pode ser alterada. Os formuladores podem otimizar a solubilidade de um fármaco, por meio do controle da composição do veículo. Podem modificar, por exemplo, o pH da formulação ou adicionando excipientes de forma a diminuir a solubilidade do fármaco no veículo e desta forma, aumentar sua atividade termodinâmica e o seu coeficiente de partição para a pele (BARRY, 2005).

A penetração pode ser incrementada, quando necessário, também através do uso de promotores químicos de absorção ou, mais recentemente, por métodos físicos como a eletroporação, iontoforese e a aplicação de ultrassom (sonoforese) (BARRY, 2005; BRONAUGH, MAIBACH, 2005).

Uma gama de produtos químicos têm sido usada nas formulações como indutores da penetração, eles interagem com os constituintes da pele promovendo o aumento do fluxo do fármaco. Williams e Barry (2004) citam alguns como os sulfóxidos, azonas, pirrolidonas, terpenos, ácidos graxos e ésteres, fosfolipídeos, alcoóis e alcoóis graxos, glicóis, surfactantes e excipientes que aumentem a hidratação do estrato córneo como derivados da uréia.

Embora os mecanismos de ação dos promotores de absorção ainda não tenham sido totalmente esclarecidos presume-se, baseando-se na lei de Fick, que eles podem aumentar o coeficiente de difusão do fármaco no estrato córneo ao romper a barreira natural dessa camada, por exemplo agindo na bicamada lipídica intercelular (Figura 3), como no caso dos surfactantes ao desorganizar a matriz de lipídeos ou dos solventes orgânicos que fazem uma extração dos lipídeos, entre outras formas (WILLIAMS, BARRY, 2004).

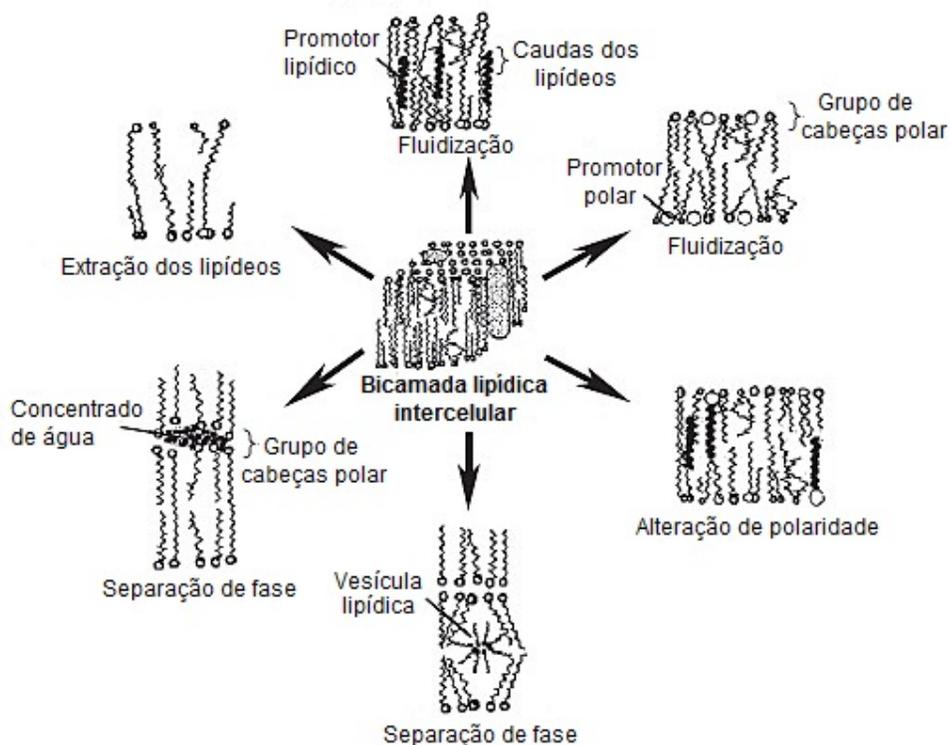


FIGURA 3 – AÇÃO DOS PROMOTORES DE PENETRAÇÃO NOS LIPÍDEOS INTERCELULARES

FONTE: ADAPTADO DE WILLIAMS, BARRY (2004)

### 3.2 Produtos farmacêuticos administrados por via tópica

A aplicação cutânea de fármacos tem adquirido um crescente interesse nos últimos anos, tornando-se uma alternativa atrativa para a terapia oral convencional, devido às suas vantagens, como a possibilidade de um tratamento mais eficiente baseado na ação local do fármaco, evitando o efeito do metabolismo de primeira passagem, além de promover uma maior adesão do paciente e a redução dos efeitos colaterais (WAGNER *et al.*, 2001; AKOMEAH, MARTIN, BROWN, 2007).

Medicamentos administrados por via tópica na pele enquadram-se em duas categorias gerais: os aplicados para ação local e os de efeitos sistêmicos. É importante distinguir as diferenças farmacocinéticas e no desempenho clínico entre eles. Os transdérmicos são desenvolvidos para liberar o fármaco através da pele (absorção percutânea) para a circulação geral objetivando atingir efeitos sistêmicos,

com um mínimo de retenção cutânea. Em contraste, um produto tópico de ação local é desenvolvido para liberar o fármaco na pele a fim de tratar distúrbios dérmicos, sendo a pele o órgão-alvo (SHAH *et al.*, 1992). Ação local incluem os cremes, géis, pomadas, pastas, suspensões, loções, espumas, sprays, aerossóis e soluções. Semissólidos são os cremes, as pomadas e os géis. Os medicamentos mais comuns aplicados à pele para efeitos sistêmicos são os sistemas de liberação de fármacos transdermais auto-adesivos ou *patches* (UEDA *et al.*, 2009).

A capacidade de um fármaco em uma formulação tópica permeiar a pele e exercer seus efeitos é dependente de dois eventos consecutivos: inicialmente é necessário ocorrer uma difusão do fármaco do veículo em direção à superfície da pele (liberação) e em seguida passar esta barreira em direção ao local de ação (permeação). Ambas as etapas são dependentes das propriedades físico-químicas do fármaco, do veículo e da barreira da pele (OSTRENGA, STEINMETZ, POULSEN, 1971; NISHIHATA *et al.*, 1988).

A velocidade de liberação de um fármaco a partir de determinada formulação depende diretamente das características físico-químicas do veículo e do fármaco. As principais características da formulação que irão comandar essa etapa são a solubilidade do fármaco no veículo, atividade termodinâmica e interações do fármaco com componentes do veículo que irão afetar no seu coeficiente de partição. Uma vez disponível para penetração na superfície da pele, a penetração e permeação irão depender da capacidade do fármaco de atravessar a camada córnea, lipofilicidade e tamanho da molécula, além de modulação da formulação por meio da adição de promotores de penetração (BEMVINDO, 2006).

### **3.3 Teste de liberação *in vitro***

Ensaio de qualidade provém pouca ou nenhuma informação a cerca da liberação do fármaco, estabilidade ou efeitos das variáveis do processo na fabricação de um medicamento. Assim como o teste de dissolução há anos vem sendo usado para formas farmacêuticas sólidas, as discussões recentes reforçam que o ensaio de liberação de produtos tópicos, que embora não tenha a intenção de mimetizar o comportamento *in vivo*, deve ser capaz de detectar o efeito das

mudanças da formulação e processo que afetam seu desempenho (SHAH, 2005; UEDA *et al.*, 2009).

A liberação *in vitro* de medicamentos de uso tópico tem sido investigada extensivamente usando a VDC, conhecida comumente por célula de Franz (Figura 4) (SIEWERT *et al.*, 2003), a qual tem sido a mais empregada no desenvolvimento farmacotécnico, caracterização biofarmacêutica e controle de qualidade, tanto para adesivos transdérmicos como para formas farmacêuticas semissólidas (PRAÇA, 2010).

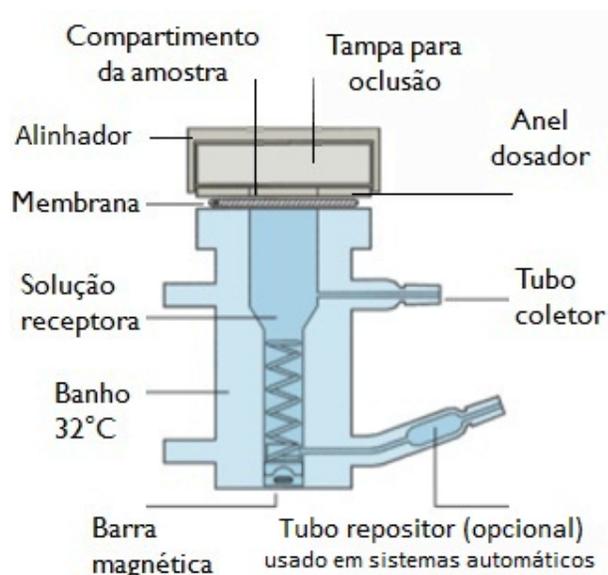


FIGURA 4 – CÉLULA DE DIFUSÃO DE FRANZ  
 FONTE: ADAPTADO DE HANSON RESEARCH CORPORATION (2012)

Uma célula de difusão típica é composta de dois compartimentos, um deles contém a amostra do fármaco (em média 300 mg) e o outro, uma solução receptora. A temperatura do sistema é controlada em 32°C refletindo a temperatura normal da pele. Exceções são feitas a produtos em outros locais de aplicação, como os vaginais que podem ser realizados a temperatura de 37°C. Uma membrana sintética separa os dois compartimentos. A difusão do fármaco é determinada pela quantificação do mesmo no compartimento receptor. Coletas são realizadas em diferentes tempos através de um tubo coletor existente na célula de vidro.

Geralmente estudos de 6 horas com no mínimo 5 coletas são adequados. O sistema pode ser completamente automatizado (FDA, 1997; SHAH, 2005; UEDA *et al.*, 2009).

Após um curto *lag time*, onde o fluxo não é constante, a liberação do fármaco de um semissólido na VDC, é cineticamente descrita pela difusão de um composto para fora de uma matriz em direção a um líquido receptor. A velocidade de liberação depende da profundidade de penetração do gradiente que está sendo formado dentro do semissólido. Somente quando a difusão do fármaco através da matriz do semissólido começar a controlar a cinética da liberação, a massa liberada  $M$ , torna-se proporcional à  $\sqrt{t}$  o que reflete a diminuição da liberação ao longo do tempo (UEDA *et al.*, 2009).

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:

$$M = \sqrt{2 \times C_0 \times C_s \times D \times t} , C_s \ll C_0 \quad (3)$$

Ou se o fármaco estiver totalmente dissolvido no veículo:

$$M = 2 \times C_0 \times \sqrt{\frac{D \times t}{\pi}} \quad (4)$$

Onde:

$M$  = quantidade de fármaco liberado no meio por  $\text{cm}^2$

$C_0$  = Concentração do fármaco na matriz

$C_s$  = Solubilidade da droga na matriz

$D$  = Coeficiente de difusão do fármaco através da matriz

$t$  = tempo

Variáveis chave no processo de difusão na VDC incluem a escolha do meio/solução receptor(a) e a membrana usada no teste. O meio receptor deve

solubilizar o fármaco o suficiente para garantir as condições *sink*. Também, não deve alterar a forma farmacêutica por uma difusão reversa do meio. O meio selecionado deve ser compatível com o método analítico para que as análises sejam executadas por injeção direta da amostra, evitando diluições (SHAH, ELKINS, WILLIAMS, 1999).

Membranas biológicas são difíceis de preparar e apresentam muitas variabilidades, por isso seu uso na rotina do controle de qualidade é complicado. As membranas sintéticas usadas no teste de liberação *in vitro* evitam as variáveis experimentais associadas com o uso de tecidos biológicos excisados (SHAH *et al.*, 1989; SHAH, ELKINS, WILLIAMS, 1993).

As membranas sintéticas devem ser inertes, não interagir com o fármaco, veículo ou solução receptora. Sua função na análise é apenas servir como suporte para a amostra separando-a do meio receptor, desta forma não pode interferir na cinética de difusão (SHAH, ELKINS, WILLIAMS, 1999; SHAH *et al.*, 2003). O fármaco que atinge a membrana deve ser rapidamente removido para a fase receptora, por isso as membranas devem ter permeabilidade suficiente para garantir uma resistência mínima à difusão, resultando em tempos de latência baixos (CORBO *et al.*, 1993; TOSCANO *et al.*, 1997).

O ideal é que o transporte pela membrana seja muito mais rápido que a difusão do fármaco que sai do veículo, mas podem existir situações que isso não acontece e a resistência da membrana contribui na velocidade de difusão. Isto porque as membranas apresentam poros que no momento do ensaio são preenchidos com o meio receptor, assim a transferência do fármaco do semissólido para a membrana envolve a partição para o líquido que está dentro destes poros, para então chegar até o compartimento receptor. Fatores físicos influenciam a cinética do processo incluindo a espessura, porosidade e tortuosidade da membrana, a viscosidade do meio receptor e o coeficiente de partição do veículo/meio receptor (ZATZ, 1995). A velocidade de difusão pode ser afetada quando, por exemplo, a membrana não tem porosidade suficiente, o fármaco interage com a membrana, meios receptores viscosos são usados ou o coeficiente de partição veículo/receptor não é alto (SHAH, ELKINS, WILLIAMS, 1993; ZATZ, 1995).

Nas últimas duas décadas uma gama de membranas sintéticas têm sido usadas nos testes de liberação *in vitro*, com diversos materiais, tamanho de poro e espessura. Incluem as de nylon, celulose, acetato de celulose, nitrato/acetato

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. O tamanho de poro das membranas é geralmente 0,45 µm, mas podem variar (ZATZ, SEGERS, 1998; TOSCANO *et al.*, 2001, NG *et al.*, 2010).

Com o intuito de verificar se as membranas influenciam na velocidade de difusão do DDA neste estudo foram avaliadas as membranas de acetato de celulose e polietersulfona, recomendadas para teste de liberação *in vitro* (FDA, 1997; ZATZ, SEGERS, 1998; SHAH, 2005; NG *et al.*, 2010) e comumente disponibilizadas para comercialização.

### 3.3.1 Aspectos regulatórios

Enquanto para os *patches* transdérmicos diversos aparatos têm sido descritos nas farmacopéias, incluindo a pá sobre o disco (aparato 5 USP), cilindros rotatórios (aparato 6 USP) e os cilindros recíprocos (aparato 7 USP), a Farmacopéia Brasileira e nenhum compêndio oficial tem descrito, até a presente data, algum aparato, procedimento ou exigências do teste de liberação *in vitro* para semissólidos de aplicação tópica e ação local.

Porém em 1997, o *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulador americano, lançou o *Guidance for Industry on Scale Up and Post Approval Changes for Semisolids* (SUPAC-SS), descrevendo estudos de liberação com a VDC. Este solicita a comparação das velocidades de liberação entre lotes de produtos semissólidos que sofreram certos tipos de alterações pós-registro, como mudança de equipamentos, aumento de escala, fornecedor de matéria-prima e outros. O perfil de liberação *in vitro* do biolote serve como base para comparação das formulações (FDA, 1997).

Em setembro de 2009, o fórum da Farmacopéia Americana sugeriu o uso da VDC para ensaios de desempenho de produtos tópicos (UEDA *et al.*, 2009). Embora este não seja um guia oficial ele mostra a tendência da farmacopéia americana em publicar um capítulo geral sobre testes de desempenho para este tipo de forma farmacêutica.

Nos Estados Unidos, produtos de uso tópico de ação local candidatos a medicamento genérico podem ser registrados somente com a apresentação de estudos que comprovem a bioequivalência entre estes medicamentos e seu respectivo medicamento de referência. Isenção é feita apenas para soluções tópicas quando os excipientes das formulação forem qualitativamente idênticos e quantitativamente semelhantes ao medicamento referência, dentre outros critérios. Neste conceito, quantitativamente semelhante significa que a quantidade/concentração de excipiente(s) do medicamento genérico não difere mais que 5 % da quantidade/concentração do excipiente no medicamento de referência (FDA, 1998).

A comprovação da biodisponibilidade/ bioequivalência dos medicamentos de aplicação tópica de ação local pode ser feita através de ensaios clínicos, dermatofarmacocinética (incluindo nesta o *tape stripping*) e estudos farmacodinâmicos. Segundo o *Guidance for Industry topical dermatological drug product bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies* o ensaio de liberação *in vitro* pode ser usado para isentar as menores dosagens de um produto que já tenha comprovado bioequivalência (FDA, 1998).

No Brasil, as legislações vigentes para registro de medicamentos genéricos e similares de uso tópico cutâneo não solicitam a apresentação de estudos de bioequivalência ou estudos clínicos para candidatos à genérico. A bioequivalência pode ser substituída pela equivalência farmacêutica para medicamentos de aplicação tópica sem absorção sistêmica desde que apresentem mesma concentração em relação ao medicamento de referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis (BRASIL, 2003a).

Em 2009, com a publicação da Resolução RDC nº 48, a ANVISA passou a solicitar estudo de permeação cutânea *in vitro* para comparar as formulações semissólidas antes e após as alterações pós-registro (BRASIL, 2009). Porém, esses produtos não foram comparados com o medicamento referência no momento do registro. Apesar dessa exigência, não existe nenhum guia oficial brasileiro orientando as indústrias de como executar o teste ou delimitando especificações.

### 3.4 Reologia

A reologia consiste no estudo do escoamento ou, deformação do material em estudo, quando submetido a uma tensão. O estudo do comportamento reológico de produtos semissólidos permite caracterizar a facilidade com que o material seja retirado de um recipiente, avaliar a influência na espalhabilidade de preparações tópicas e controla a qualidade de matérias-primas e produtos acabados (WOOD, 2001). Além disso, verifica o efeito da consistência do produto na liberação e penetração cutânea de substâncias ativas (BARRY, 1983; CHORILLI *et al.*, 2007).

A viscosidade depende das características físico-químicas e das condições de temperatura do material. Com o aumento da temperatura, aumenta a energia cinética média das moléculas, diminui (em média) o intervalo de tempo que as moléculas passam umas junto das outras, menos efetivas se tornam as forças intermoleculares e menor é a viscosidade (BRASIL, 2007; BRASIL, 2010).

A natureza química e a concentração de um agente emulsificante podem afetar a viscosidade das emulsões. Emulsificantes iônicos causam efeitos eletroviscosos aumentando a viscosidade da emulsão. O tamanho da gotícula também é uma variável muito importante, tendo sido relacionada um aumento da viscosidade com a redução de seu diâmetro. Os fatores tecnológicos que influenciam diretamente este tamanho são a temperatura, a característica de tensoativo e o tipo de agitador e velocidade utilizada (VAUTER-GIONGO, PASTORE, 2000; FLORENCE, ATWOOD, 2003; OLIVEIRA, 2010).

O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar o comportamento reológico da formulação, influenciando na estabilidade física e no seu comportamento sobre a pele (CORRÊA *et al.*, 2005). Além do tipo, a concentração do polímero formador do gel nas formulações tem relação direta com a viscosidade. Chorilli *et al.* (2007) verificaram que o aumento da concentração do polímero em géis de Carbopol® 940 resultou em aumento de viscosidade. Ricci *et al.* (2002) comprovaram em géis de Poloxamer® 407, que o aumento da concentração do polímero também resultou em aumento da viscosidade do gel.

A viscosidade de um semissólido é influenciada também pela técnica de amostragem, temperatura da amostra, tamanho e forma do recipiente e a metodologia para medida da viscosidade (UEDA *et al.*, 2009). Para semissólidos a

viscosidade é feita usando viscosímetros rotativos, sendo um dos mais usuais o viscosímetro de Brookfield, que mede a viscosidade pela força necessária para girar o *spindle* no produto que está sendo testado (PRISTA *et al.*, 2008; BRASIL, 2010).

A viscosidade aparente é medida pontualmente, analisando apenas o valor determinado a partir de uma velocidade de cisalhamento constante. O estudo reológico do produto compreende uma avaliação usando um viscosímetro capaz de produzir diferentes velocidades de cisalhamento, mensurando-se a força de cisalhamento correspondente e construindo um gráfico denominado reograma, a partir dos resultados obtidos do qual, podemos avaliar a viscosidade, tipo de fluxo, valor de rendimento e tixotropia do produto (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007; MARTIN<sup>1</sup>, 1993 *apud* CHORILLI, 2007).

Os corpos semissólidos são fluidos não newtonianos e podem ser classificados quanto às suas propriedades reológicas em três grupos fundamentais: plásticos, pseudo-plásticos e dilatantes, podendo estes apresentarem ou não tixotropia (PRISTA *et al.*, 2008). O importante para o controle de qualidade de um produto farmacêutico semissólido é conhecer qual é o histórico de fluxo da amostra que está sendo testada para detectar possíveis alterações não desejadas (UEDA *et al.*, 2009).

### 3.4.1 Viscosidade x liberação

A viscosidade pode influenciar diretamente a velocidade de difusão, ainda que semissólidos de relativa alta viscosidade possam exibir altas velocidades de difusão quando comparadas a produtos de baixa viscosidade (UEDA *et al.*, 2009).

Walkow e McGinity (1987) observaram uma relação inversa entre velocidade de difusão e viscosidade para o salicilato de metila e para o ácido salicílico. Estes autores citam também os trabalhos de DiColo *et al.* (1980); Whitworth and Elsabbagh (1978); Barzegar-Jalali e Richards (1979) e Garrett e Chemburkar (1968), para os quais, também houve uma relação inversa destes parâmetros.

Chorilli *et al.* (2007) comprovou que a viscosidade da formulação de um gel influenciou na liberação *in vitro* da cafeína. O aumento da viscosidade, em função do

---

<sup>1</sup>MARTIN, A. **Physical pharmacy**. 4ª.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

cafeína, podendo este excipiente ser determinante para a produção de uma formulação de "liberação imediata" ou "liberação controlada". O mesmo artigo também cita trabalhos que verificaram esta relação, como:

- Barry (1983), que correlacionou valores de viscosidade com a difusão de princípios ativos para um gel de ágar e verificou que os parâmetros reológicos analisados foram inversamente proporcionais à velocidade de liberação.
- Bruschi, *et al.* (2007), que usou formulações contendo Carbopol 934P<sup>®</sup> acrescidas de extrato de própolis. Os autores observaram que o aumento da concentração do polímero resultou em aumento da viscosidade do sistema, o que interferiu na liberação da substância ativa.
- Marriot (1996), que observou uma relação inversa entre viscosidade e absorção do fármaco pela pele, a absorção diminuiu com o aumento da viscosidade do veículo.

O comportamento reológico de um produto semissólido pode afetar a sua velocidade de liberação no local de tratamento, comprometendo a segurança e eficácia do produto. Desta forma, manter a reprodutibilidade do comportamento reológico é um importante controle para demonstrar a consistência lote-a-lote do produto (UEDA *et al.*, 2009).

### 3.5 Tamanho de gotícula

A RDC nº 48 solicita que sejam apresentados resultados comparativos e uma discussão relativa ao impacto de eventuais alterações da distribuição do tamanho de partícula/gotícula (fármaco disperso/fármaco dissolvido), para certos casos de mudanças pós-registro de semissólidos e líquidos (BRASIL, 2009). A exigência dessa verificação juntamente com a velocidade de permeação cutânea incentiva o estudo do parâmetro neste trabalho.

Um dos requisitos para a formação de uma emulsão é que o sistema deve conter dois líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis na qual um líquido é disperso na forma de pequenas gotas através de outro líquido, sendo estabilizado por um emulsificante (BRASIL, 2010). Todas as características físico-químicas das emulsões como aparência, estabilidade, reologia e reatividade química, dependem

fundamentalmente da natureza a das interações das gotículas que ela contém (MCCLEMENTS, COUPLAND, 1996).

Em uma emulsão existem gotículas de diâmetros variados. A proporção de gotículas fora de limites especificados poderá influenciar no seu desempenho. Por isso, caracterizar a distribuição do tamanho de gotas é fundamental para conhecer as propriedades da emulsão e como controle da produção (OLIVEIRA, 2010).

Em uma formulação semissólida, o tamanho de gotícula ou partícula deve ser determinado e controlado no estágio de desenvolvimento da formulação. Quando aplicável, também no momento da liberação do lote ou como indicador em estudos de estabilidade, para qualquer mudança no tamanho ou hábito cristalino da partícula do fármaco que possam comprometer a integridade e/ou o desempenho do produto (UEDA *et al.*, 2009).

A instabilidade de uma emulsão deriva de qualquer processo que cause um progressivo aumento do tamanho das gotículas e um alargamento na distribuição de tamanhos, de forma que, por fim as gotículas dispersas podem tornar-se tão grandes a ponto de separar-se como líquido livre. Por isso, analisar o tamanho dos glóbulos com o tempo é uma alternativa para avaliar a estabilidade da formulação (AULTON, 2005; FRANGE, GARCIA, 2009).

A distribuição do tamanho das gotas é afetada por diferentes fatores, tanto na formulação como no processo de fabricação, destacando-se os seguintes: o método de preparo, o tipo e a quantidade de emulsionante utilizado, a diferença de viscosidade entre as fases e o cisalhamento imposto no sistema (BRASIL, 2004).

Oliveira (2010), em sua revisão aponta alguns fatores que influenciam no tamanho das gotículas em emulsões:

- **Propriedades do óleo e da água:** a diferença de densidades entre a fase aquosa e oleosa afeta a velocidade de separação, conseqüentemente a estabilidade. Desta forma, a coalescência entre as gotas é afetada, modificando o seu tamanho final.
- **Tempo de agitação:** O tamanho das gotas diminui com o tempo de agitação, até alcançarem um valor de diâmetro de gotas assintótico (próximo do zero).
- **Intensidade de agitação:** O aumento de velocidade de agitação causa a diminuição do tamanho de gotas.
- **Tipos e quantidade de emulsificantes:** A adsorção de tensoativos na interface das gotas determina o seu tamanho, devido à relação com a redução da tensão

interfacial. Com uma quantidade maior de tensoativo absorvido, a estabilidade da emulsão é aumentada, reduzindo a coalescência.

Aulton (2005) ainda destaca o efeito da temperatura, que quando elevada, leva à diminuição da viscosidade aparente e ao aumento da motilidade cinética, tanto da fase dispersa, quanto do próprio agente emulsionante na interface óleo/água, aumentando assim o número de colisões entre as gotículas.

### 3.5.1 Tamanho de gotícula x liberação

O diâmetro das gotículas das emulsões e microemulsões assim como a viscosidade do sistema estão diretamente relacionados com a velocidade de liberação *in vitro* e com o processo de difusão *in vivo*, facilitando ou dificultando a fração disponível de fármaco por unidade de tempo (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Vasiljevic e colaboradores (2006) verificaram que a concentração de um emulsificante lipofílico de uma emulsão múltipla A/O/A de DDA afetou o comportamento reológico e o tamanho das gotículas, o que influenciou na cinética de liberação *in vitro* do fármaco. A emulsão com a maior concentração do emulsificante teve o menor tamanho de gotícula e a maior viscosidade, ocasionando uma menor liberação nos ensaios de difusão.

Resultado diferente foi encontrado por Clément *et al.* (2000) que verificaram que o fluxo da cafeína em emulsões A/O foi influenciado principalmente pela porcentagem da fase dispersa, mas não diretamente pela viscosidade, tamanho de gotícula, tipo de emulsificante ou sua concentração. O aumento da fase dispersa também modificou a estrutura da gotícula (passou de esférica para poliédrica). Uma possível explicação para o aumento do fluxo é que como a área de superfície da fase dispersa se torna maior, o volume da fase contínua passa a ser menor, conseqüentemente encurtando o caminho para a cafeína ser liberada do veículo após ter sido liberado da gotícula. Neste trabalho, o aumento da fase dispersa acelerou o fluxo da cafeína, porém o tamanho das gotículas diminuiu e a viscosidade aumentou.

### 3.6 DDA gel: fármaco/formulação modelo

O diclofenaco é um potente anti-inflamatório da classe dos não-esteroidais (AINEs). Esta classe é uma das mais usadas de todos os fármacos (RANG, 2007), na qual todos são antipiréticos, analgésicos e anti-inflamatórios variando cada um na intensidade desses efeitos. O diclofenaco foi desenvolvido especificamente como agente anti-inflamatório (INSEL, 1996). Ele é usado nas formas livre, de dietilamônio, de sal potássico, de resinato, de sal sódico e associado à colestiramina (KOROLKOVAS, 2007).

Muitos estudos indicam que a inibição da síntese das prostaglandinas é o mecanismo principal das ações terapêuticas do diclofenaco. Este atua inibindo a atividade da enzima cicloxigenase (COX), que catalisa a biossíntese das prostaglandinas, a partir do ácido araquidônico. A cicloxigenase é encontrada em duas isoformas. A ação anti-inflamatória do diclofenaco está relacionada com a inibição da COX-2 (produz prostaglandinas envolvidas com o processo de inflamação), enquanto seus efeitos adversos resultam principalmente da inibição da COX-1 (produz prostaglandinas que participam de funções como secreção de muco para proteção da mucosa gástrica) (SILVA, 2006).

O diclofenaco embora seja um efetivo anti-inflamatório, e assim como outros representantes da classe, quando administrados via oral, pode causar intolerância e sérios efeitos colaterais devido a sua atividade sistêmica (GALER *et al.*, 2000). Produz efeitos colaterais em cerca de 20 % dos pacientes e aproximadamente 2 % interrompem o tratamento por esse motivo. Os efeitos mais comuns são os relacionados com o trato gastrointestinal como sangramento, ulceração ou perfuração da parede intestinal. Os efeitos hepatotóxicos também são freqüentes (INSEL, 1996; SILVA, 2006). Quando administrado via injeção intramuscular pode causar lesões cutâneas (SILVA, 2006; RUBIO *et al.*, 2010).

Para ter um efeito local adequado os AINEs de uso oral e parenteral precisam produzir altos níveis sistêmicos. Em contraste, anti-inflamatórios tópicos podem agir de forma direta no local afetado sem a atividade sistêmica e os efeitos colaterais provenientes dela (GALER *et al.*, 2000).

O DDA (Figura 5) tem sido usado para aplicações dermatológicas mais que os outros sais de diclofenaco devido a sua natureza anfifílica e maior habilidade de

permeação cutânea devido a sua capacidade de interagir com os fosfolípidios da pele, os quais se tornam mais fluidizados no estrato córneo (KRIWET, MUELLER-GOYMAN, 1993, 1995; DJORDJEVIC, PRIMORAC, STUPAR, 2005).

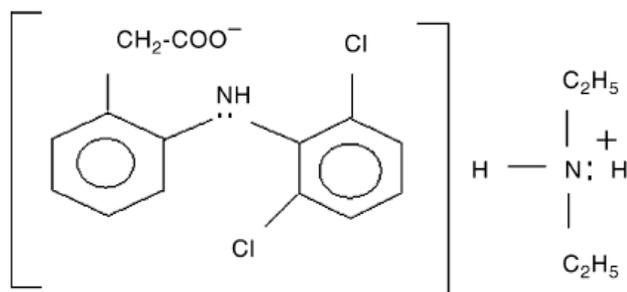


FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO DDA  
 FONTE: DJORDJEVIC, PRIMORAC, STUPAR (2005)

A denominação química do DDA conforme a Farmacopéia Britânica 2005 é *diethylammonium 2-[(2,6-dichloroanilino)phenyl]acetate*. Sua fórmula molecular é  $C_{18}H_{22}Cl_2N_2O_2$  e peso molecular de 369,29 g/mol. Consiste em um pó cristalino branco a levemente bege. Ligeiramente solúvel em água e em acetona; facilmente solúvel em etanol (96%) e em metanol; praticamente insolúvel em hidróxido de sódio 1M (BRITISH PHARMACOPEIA, 2008). O DDA possui baixo  $pK_a$  (4,87) (DJORDJEVIC, PRIMORAC, STUPAR, 2005).

O DDA é comercializado na forma farmacêutica semissólida como gel tópico, especificamente como gel creme (também chamado de emulgel). O medicamento referência no mercado brasileiro é o Cataflam Emulgel<sup>®</sup> da indústria Novartis, cada grama do produto contém 11,6 mg de DDA e possui vários similares e genéricos disponíveis. É indicado para aliviar a dor e reduzir os sintomas da inflamação em lesões de origem traumática ou reumática. Devido à base aquosa-alcoólica, o gel exerce também um efeito suavizante e refrescante (CATAFLAM EMULGEL<sup>®</sup>, 2010).

A quantidade de diclofenaco absorvida sistemicamente a partir do medicamento referência é de cerca de 6 % da dose de diclofenaco declarada, determinada pela eliminação renal total, comparada com Cataflam<sup>®</sup> comprimidos. As concentrações plasmáticas máximas são aproximadamente 100 vezes menores do

que após a administração oral da mesma quantidade do fármaco (CATAFLAM EMULGEL<sup>®</sup>, 2010).

### 3.6.1 Formas farmacêuticas do tipo emulgel

Quando géis e emulsões são usados em forma combinada são chamados de emulgéis (KHULLAR *et al.*, 2012). São emulsões, que podem ser tanto do tipo óleo em água (O/A) como água em óleo (A/O), que são geleificadas pela mistura de um polímero (agente gelificante) como espessante da fase aquosa (MOHAMED, 2004).

A capacidade de geleificação destes compostos permite a formação de emulsões estáveis por diminuição da tensão interfacial e ao mesmo tempo aumento da viscosidade da fase aquosa (KHULLAR *et al.*, 2012).

O Carbopol<sup>®</sup> é um espessante bastante utilizado em emulgéis. A pequena porção lipofílica deste polímero se localiza na interface O/A e a grande porção hidrofílica intumescer em presença de água formando o gel que envolve as gotículas de óleo (GOODRICH<sup>1</sup>, 1997 *apud* LIRA, 2003). Assim, pode-se obter formulações com maior estabilidade e que não necessitam de grande quantidade de fase oleosa para obter boa viscosidade (LIRA, 2003).

As emulsões, devido aos tensoativos necessários para sua formação, podem causar irritação e aumento indesejável da penetração através da pele. Além dessas desvantagens são oxidadas mais facilmente e possuem menor estabilidade. Os géis são preparações agressivas à mucosa, podendo provocar ardência, mas apresentam um tempo de conservação maior. Os emulgéis por serem preparações intermediárias entre géis e emulsões superam algumas dessas desvantagens. Emulgéis não são gordurosos, são de fácil espalhamento e remoção, emolientes, tem prazo de validade longo e aparência agradável (LIRA, 2003, MOHAMED, 2004, KHULLAR *et al.*, 2012).

---

<sup>1</sup>GOODRICH, B. F. Carbopol – High performance polymers for pharmaceuticals. **Bulletin**. 14:24, 1997.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Especialidades farmacêuticas em estudo

Especialidades farmacêuticas contendo como fármaco o DDA:

- Medicamento de referência – Cataflam Emulgel<sup>®</sup>, gel tópico da empresa Novartis Biociências S.A. (BRASIL, 2012);
- Medicamentos genéricos de 4 indústrias farmacêuticas brasileiras, denominados de genéricos (A), (B), (C) e (D).

O Quadro 1 traz a composição qualitativa das especialidades farmacêuticas em estudo e excipientes classificados de acordo com sua função na formulação.

#### 4.1.2 Membranas sintéticas a serem testadas

- Membrana hidrofílica de acetato de celulose com abertura de poro 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro, espessura aproximada de 120  $\mu\text{m}$  - Marca Sartorius<sup>®</sup>;
- Membrana hidrofílica de polietersulfona com abertura de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro, espessura  $\geq 130$  and  $\leq 155$  – Marca Millipore<sup>®</sup>.

<b>Função</b>	<b>Referência</b>	<b>Genérico A</b>	<b>Genérico B</b>	<b>Genérico C</b>	<b>Genérico D</b>
<b>Polímero formador do gel</b>	Carbopol®	Poliacrilamida	Carbopol® 934	Carbopol® 940	Carbopol®
<b>Emulsificante</b>	Cetomacrogol 1000*	Álcool lanolina	Álcool cetosteárilico etoxilado	Álcool cetosteárilico etoxilado 20 O.E.	Cera emulsificante não iônica
<b>Solubilizante</b>	Álcool isopropílico	---	Álcool isopropílico	Álcool isopropílico	Álcool isopropílico
<b>Umectante</b>	Propilenoglicol	Propilenoglicol	Propilenoglicol	Propilenoglicol	Propilenoglicol
<b>Veículo lipofílico/Emoliente</b>	Parafina Líquida**, Coco-caprilato-caprato	Isoparafina, Óleo mineral**, Álcool laurílico	Petrolato Líquido**, Oleato de decila	Vaselina líquida**	---
<b>Agente de consistência</b>	---	---	---	Álcool cetosteárilico	---
<b>Conservantes</b>	---	Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Etilparabeno, 2-fenoxietanol	---	Metilparabeno, Propilparabeno	Metilparabeno, Propilparabeno
<b>Neutralizante</b>	Dietilamina	---	Dietilamina	Hidróxido de Sódio	Hidróxido de Sódio
<b>Outros</b>	Perfume	EDTA	BHT, Essência melody	Fragrância	Essência pentalys

\* Cetomacrogol 1000 é o nome comercial do álcool cetosteárilico etoxilado

\*\* Sinônimos

#### QUADRO 1 – COMPOSIÇÃO QUALITATIVA DAS FORMULAÇÕES FONTE: BULAS DAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS

NOTA: A ÁGUA E O DDA NÃO ESTÃO PRESENTES NA TABELA, MAS SÃO CONSTITUINTES DE TODOS OS FABRICANTES

#### 4.1.3 Reagentes

Acetona

Acetonitrila – grau HPLC

Ácido ortofosfórico

Água destilada

Fosfato de potássio monobásico

Fosfato de sódio monobásico diidratado

Fosfato de sódio monobásico anidro

Hidróxido de sódio

Metanol – grau HPLC

Padrão secundário de diclofenaco sódico - Teor 99,08 %

#### 4.1.4 Equipamentos e utensílios

Agitador magnético - MICROQUÍMICA<sup>®</sup> modelo MQAMA 301

Balança analítica - GEHAKA<sup>®</sup> modelo AG 200

Banho-maria com circulação – MARCONI<sup>®</sup> modelo MA 159

Coluna cromatográfica C8 de fase reversa de 250 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm - VARIAN<sup>®</sup>

Coluna cromatográfica C18 de fase reversa de 150 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm - AGILENT<sup>®</sup>

Câmara de Neubauer - BOECO<sup>®</sup> Germany

Cromatógrafo VARIAN 210 com bomba ternária, três pistões, injetor Rheodyne com loop de 20 µL

Detector UV de arranjo de fotodiodos PROSTAR<sup>®</sup> 320

Filtros de seringas PVDF com porosidade 0,45 µm – ACRODISC LC<sup>®</sup>

Micropipetas automáticas ajustáveis 100µL a 1000 µL- BRAND<sup>®</sup>

Microscópio óptico - OLYMPUS<sup>®</sup> modelo CH30RF100 acoplado com Câmera Digital SONY<sup>®</sup> (Análise dos dados pelo programa IMAGE-PRÓ Plus 6.0 – Media Cybernetics, Inc.)

pHmetro digital - GEHAKA<sup>®</sup> modelo PG 1800

Pipetador volumétrico – Volume variável de 1-5 mL BRAND<sup>®</sup>

Sistema com células de difusão e sistema de agitação mecânica PERMEGEAR<sup>®</sup>

Sistema de filtração a vácuo SCHOTT<sup>®</sup>

Ultra-som – ELMA TRANSSONIC<sup>®</sup> 460/H

Viscosímetro BROOKFIELD<sup>®</sup> DVII+ (análise dos dados pelo programa WINGATHER<sup>®</sup> V1.1 *Engineering Laboratories*)

Titulador Karl Fischer - QUIMIS<sup>®</sup>

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Método para quantificação do teor das especialidades farmacêuticas de DDA

A metodologia empregada para determinação do teor das especialidades farmacêuticas seguiu recomendações da Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2008).

#### 4.2.1.1 Condições cromatográficas do método de teor

- Coluna cromatográfica C8 de fase reversa de 250 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm – VARIAN<sup>®</sup> ;
  - Detecção UV no comprimento de onda de 254 nm;
  - Fase móvel – Mistura de 34 volumes da solução “A” e 66 volumes de “B”:
    - Solução “A”: Mistura de volumes iguais de uma solução de ácido ortofosfórico 0,1% p/v e uma solução de fosfato de sódio monobásico diidratado 0,16% p/v, a mistura é ajustada a ph 2,5.
    - Solução “B”: Metanol
- O tampão foi filtrado e a mistura desgaseificada por sonificação;
- Tempo de retenção – ± 25 minutos;

- Tempo de corrida – 38 minutos (1,5 vezes o tempo de retenção do diclofenaco);
- Fluxo - 1,0 mL min<sup>-1</sup>;
- Injeção – 20 µL

#### **4.2.1.2 Cálculo do teor**

A metodologia farmacopéica descreve o uso do padrão de diclofenaco sódico para comparação das amostras. A porcentagem de DDA (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no gel foi calculada usando a relação de que cada mg de diclofenaco sódico (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>NNaO<sub>2</sub>) equivale a 1,1609 mg de DDA. A tolerância permitida para o teor do produto em questão é de 95 a 105 % da quantidade rotulada (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2008).

#### **4.2.2 Método para quantificação do DDA nas amostras do ensaio de liberação *in vitro***

O método para quantificação das amostras do ensaio de liberação *in vitro* foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) segundo a metodologia validada por Silva e colaboradores (2009) com algumas modificações. Para verificar se o método era adequado ao fim proposto foi avaliada a linearidade no intervalo necessário e a especificidade, através da análise da pureza dos picos.

##### **4.2.2.1 Condições cromatográficas do método de quantificação das amostras no ensaio de liberação *in vitro***

- Coluna cromatográfica C18 de fase reversa de 150 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm – AGILENT;

- Detecção UV no comprimento de onda de 280 nm;
- Fase móvel – Mistura de acetonitrila e tampão fosfato de sódio 20 mM (70:30, v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido fosfórico. O tampão foi filtrado e a mistura desgaseificada por sonicação.
- Tempo de retenção –  $\pm 2,9$  minutos;
- Tempo de corrida – 4,5 minutos;
- Temperatura da análise – Forno da coluna ajustado para 40°C;
- Fluxo - 1,2 mL min<sup>-1</sup>;
- Injeção – 20  $\mu$ L

#### 4.2.2.2 Curva de calibração

A curva de calibração do diclofenaco sódico foi preparada com o meio receptor (tampão fosfato pH 7,4) na faixa de concentração de 10 – 300  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, a qual foi estipulada depois de ensaios prévios com os produtos. Seguiu-se a RE 899 (BRASIL, 2003), que determina que o intervalo de linearidade para ensaios de dissolução (julga-se o ensaio de liberação *in vitro* um teste da mesma categoria, por ser um ensaio de desempenho), deve incluir concentrações -20% do menor valor e +20 % do maior valor obtido no perfil.

A partir de uma solução estoque de diclofenaco sódico de 500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, foram realizadas diluições para obter soluções com concentrações de 10, 20, 60, 125, 175, 250 e 300  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. A linearidade da curva foi avaliada pelo coeficiente de correlação obtido após regressão linear dos dados.

#### 4.2.2.3 Análise da pureza dos picos cromatográficos

Visto que as especialidades farmacêuticas apresentavam muitos excipientes diferentes (Quadro 1), adotou-se a análise da pureza dos picos cromatográficos como alternativa para avaliar a especificidade do método.

A pureza do pico cromatográfico foi determinada em cromatógrafo acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (DAD). Comparou-se o espectro da região central do pico da solução padrão (espectro de referência) com os espectros de 5 regiões diferentes do pico dos cromatogramas das formulações (DA SILVA *et al.*, 2006; RUELA, ARAÚJO, PEREIRA, 2009). Foram investigadas as amostras do início e final do perfil. Os espectros foram sobrepostos e calculou-se o valor de similaridade entre eles.

#### 4.2.3 Realização do ensaio de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* foi conduzido utilizando-se células de difusão tipo Franz, com área difusional de  $1,75 \text{ cm}^2$ , volume de aproximadamente 10,5 mL, membranas artificiais hidrofílicas de acetato de celulose e de polietersulfona, ambas com  $0,45 \mu\text{m}$  de diâmetro de poro. O aparato empregado é o sistema da Permegear. A célula utilizada assim como seus componentes podem ser identificados na Figura 6.



- 1 – CÉLULA DE DIFUSÃO
- 2 – MEMBRANA
- 3 – TAMPA PARA OCLUSÃO
- 4 – ANEL DOSADOR
- 5 – ALINHADOR
- 6 – GARRA

FIGURA 6 – COMPONENTES DO APARATO

O compartimento receptor foi preenchido com a solução receptora em um sistema composto de seis células individuais conectado a um banho termostático a  $32 \pm 1,0$  °C sob agitação constante em agitador magnético.

As membranas foram recortadas num diâmetro de 25 mm e foram previamente saturadas no meio receptor, por 30 minutos, e após depositadas na parte superior do compartimento receptor. Foram aplicados sobre a membrana, no compartimento doador, 300 mg de gel equivalentes a 3,48 mg de DDA. Para caracterizar o perfil cinético de liberação foram coletados 0,4 mL da solução receptora nos seguintes tempos: 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 e 6 horas. Para o medicamento referência e para o genérico A também houve a coleta em 0,25 horas.

#### **4.2.3.1 Solução receptora**

Estudos já foram conduzidos na tentativa de modular a permeação dos produtos tópicos contendo DDA, e em alguns desses foram efetuados testes de liberação e/ou permeação (DJORDJEVIC; PRIMORAC; STUPAR, 2005; SILVA *et al.*, 2009; FERRANTE; ANDREETA; LANDONI, 2009; RUBIO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010). Com base nesses estudos foi determinada a composição química da solução receptora: o tampão fosfato pH 7,4, que foi preparado segundo a Farmacopéia Brasileira (2010). Imediatamente antes do uso, o meio foi degaseificado através de filtração à vácuo e sonificado por 10 minutos.

#### **4.2.3.2 Preparo do aparato**

Para cada corrida no aparato dois produtos foram testados e as células distribuídas alternadamente como demonstrado na Figura 7. Na segunda corrida os produtos tiveram suas posições invertidas. Esta proposta de incluir dois produtos no mesmo teste ajuda a garantir uma comparação imparcial no caso de uma diferença sistemática entre análises (FDA, 1997).



A – FORMULAÇÃO “X” B – FORMULAÇÃO “Y”

FIGURA 7 – DESENHO EXPERIMENTAL DA DISPOSIÇÃO DAS CÉLULAS NO TESTE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*  
FONTE: FDA (1997) ADAPTADO

#### 4.2.3.3 Preparo da amostra

Com o propósito de calcular o quanto de produto foi de fato aplicado na membrana, as amostras foram pesadas com o auxílio de uma seringa de 1 mL. A diferença de peso da seringa após a aplicação da amostra registra a quantidade analisada por célula.

#### 4.2.3.4 Execução do ensaio

O compartimento receptor das células de difusão foi preenchido com a solução receptora até formação de menisco positivo cobrindo o topo de cada célula. A membrana usada no ensaio foi previamente saturada no meio receptor e suavemente colocada sobre a célula de difusão, iniciando o contato da membrana com a solução receptora por um dos lados para facilitar o ajuste sem a formação de bolhas. Sobre esta membrana coloca-se o anel dosador.

A amostra medida na seringa é então aplicada dentro da cavidade do anel sobre a membrana. Com o auxílio de uma espátula o gel é espalhado uniformemente, enchendo todo o orifício do anel (compartimento doador). A tampa de vidro é colocada cuidadosamente sobre a amostra para ocluí-la, e após isso, a tampa alinhadora centralizando todo o conjunto. Com o auxílio da garra o conjunto é fixado. O agitador magnético foi ligado e a partir desse momento iniciou-se a

contagem de tempo para essa célula. A ponta do braço de coleta é vedada para evitar perdas por evaporação. O procedimento foi repetido até finalizar as 6 células.

As coletas foram feitas no centro da célula com auxílio de uma seringa e a reposição feita imediatamente com solução receptora pelas paredes do braço de coleta. As amostras foram submetidas à análise cromatográfica conforme descrito no item 4.2.2.1.

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

Para calcular a velocidade de liberação dos produtos foi construído um gráfico da quantidade liberada de fármaco por unidade de área da membrana ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) em função da raiz quadrada do tempo (horas). A plotagem desses dados produz uma linha reta. O *slope* (coeficiente angular) da regressão linear dessa reta representa a velocidade de liberação do produto (HIGUCHI, 1962).

O *lag time* é calculado através da extrapolação da reta de regressão linear até o eixo do tempo (é o valor de x quando y é substituído por 0 na equação da reta).

#### **4.2.3.6 Comparação das velocidades de liberação *in vitro***

Para comparar a liberação dos produtos será realizado o teste estatístico não-paramétrico Wilcoxon Rank Sum/Mann-Whitney que compara as medianas das velocidades de difusão dos produtos (FDA, 1997).

#### **4.2.4 Tamanho das gotículas**

A determinação do tamanho de gotículas foi efetuada através de análise microscópica empregando-se microscópio óptico com câmera digital acoplada ao

computador usando objetivas de 40 e 100 x de magnitude e ocular de 10 aumentos. As imagens foram capturadas imediatamente após a diluição das amostras e a medição feita com o auxílio do programa Image-Pro Plus<sup>®</sup>.

As amostras foram preparadas diluindo-se 0,5 g do produto em 4,5 mL de solução de propilenoglicol e água (5:95) que simula parcialmente a fase externa da formulação. As lâminas foram preparadas com uma gota da amostra diluída e as imagens capturadas de diferentes regiões da lâmina (URSICA *et al.*, 2005). Foram avaliadas 100 gotículas por amostra e plotados o histograma dos seus diâmetros e calculada a média aritmética, a mediana da distribuição ( $D_{50}$ ) e o *Span*  $[(D_{90} - D_{10})/D_{50}]$  que é usado para avaliar o grau de dispersão das gotículas (OLIVEIRA, 2010).

#### 4.2.5 Determinação do pH

O pH foi avaliado em potenciômetro digital com eletrodo de vidro. Dispersou-se o gel creme na proporção de 10 % (m/v) em água destilada e o eletrodo foi inserido diretamente na dispersão aquosa (PRISTA *et al.*, 2008; BRASIL, 2010).

#### 4.2.6 Teor de água nas formulações

A determinação do teor de água nos produtos foi realizada por método volumétrico, através da titulação com reagente de Karl Fischer (BRASIL, 2010). Por se tratar de produtos semissólidos e com grande quantidade de água inicialmente procedeu-se uma diluição das amostras.

Para a diluição 1 g da amostra foi pesado em erlenmayer e diluída em aproximadamente 25 g de uma mistura de solventes: metanol seco e clorofórmio (70:30). Um branco contendo a mistura de solventes foi preparado em outro frasco. Após titulação de 1 mL da amostra diluída o valor encontrado no branco é subtraído

da quantidade de água encontrada nas amostras. Calculou-se o teor de água em porcentagem do peso do produto (METROHM, 2011).

#### **4.2.7 Caracterização reológica**

O comportamento reológico foi avaliado em viscosímetro rotacional de Brookfield® e análise dos dados com o programa Wingather® (*Engineering Laboratories*).

A viscosidade aparente foi determinada a 40 rpm enquanto as viscosidades relativas foram determinadas num gradiente de cisalhamento crescente e decrescente com velocidade de rotação de 5 a 40 rpm (velocidade de cisalhamento = 3,4 [1/seg] a 27,1 [1/seg]) usando spindle S70 e temperatura 20°C. A partir da construção do gráfico de viscosidade *versus* velocidade de cisalhamento foi identificado o comportamento reológico dos produtos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência

Avaliou-se o método proposto por Silva *et al.* (2009) e testes preliminares do ensaio de liberação *in vitro* efetuados no presente estudo apresentaram concentração mais elevada que a faixa de concentração trabalhada pelos autores do artigo citado, o que conduziu a uma redução do volume de injeção de 30 para 20  $\mu\text{L}$ .

A Figura 8 apresenta o cromatograma de uma solução padrão de diclofenaco sódico, com o seu tempo de retenção característico.

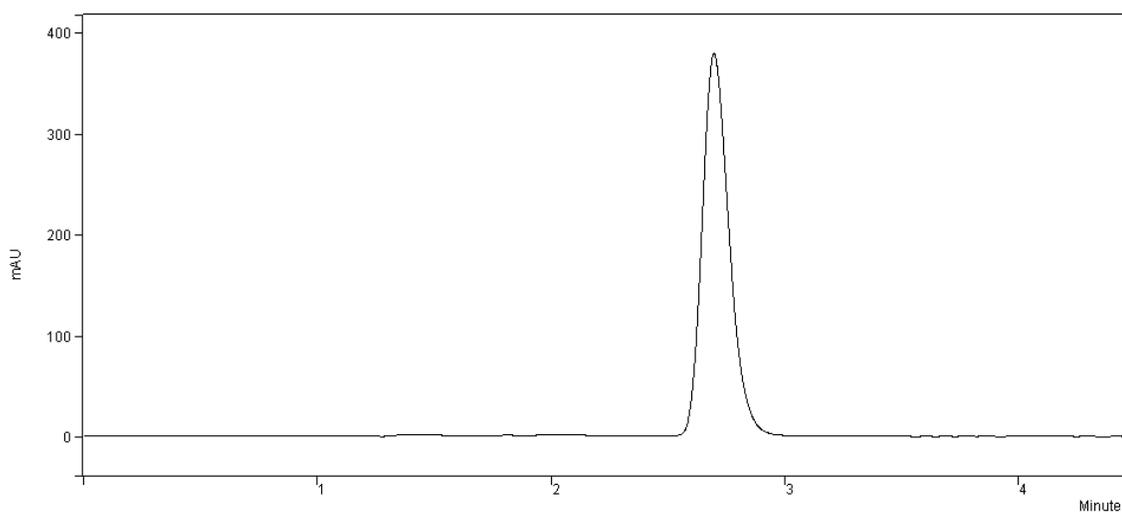


FIGURA 8 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE DICLOFENACO SÓDICO 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EM SOLUÇÃO RECEPTORA

### 5.1.1 Curva Analítica

A curva analítica do diclofenaco sódico está demonstrada na Figura 9. A partir da análise da regressão linear dos dados, o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) 0,9991 e o coeficiente de correlação ( $r$ ) 0,9996 obtidos comprovaram que o método é linear na faixa de concentração empregada neste estudo (10 – 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de diclofenaco sódico) .

A legislação vigente recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes, e que o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser igual a 0,99 (BRASIL, 2003b).

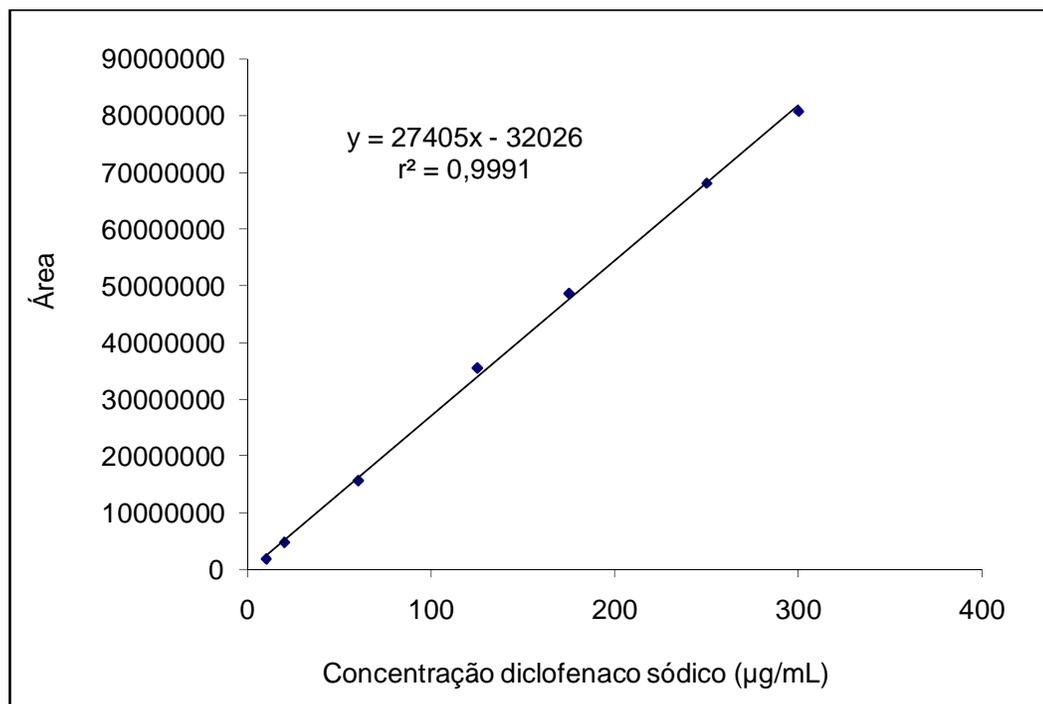
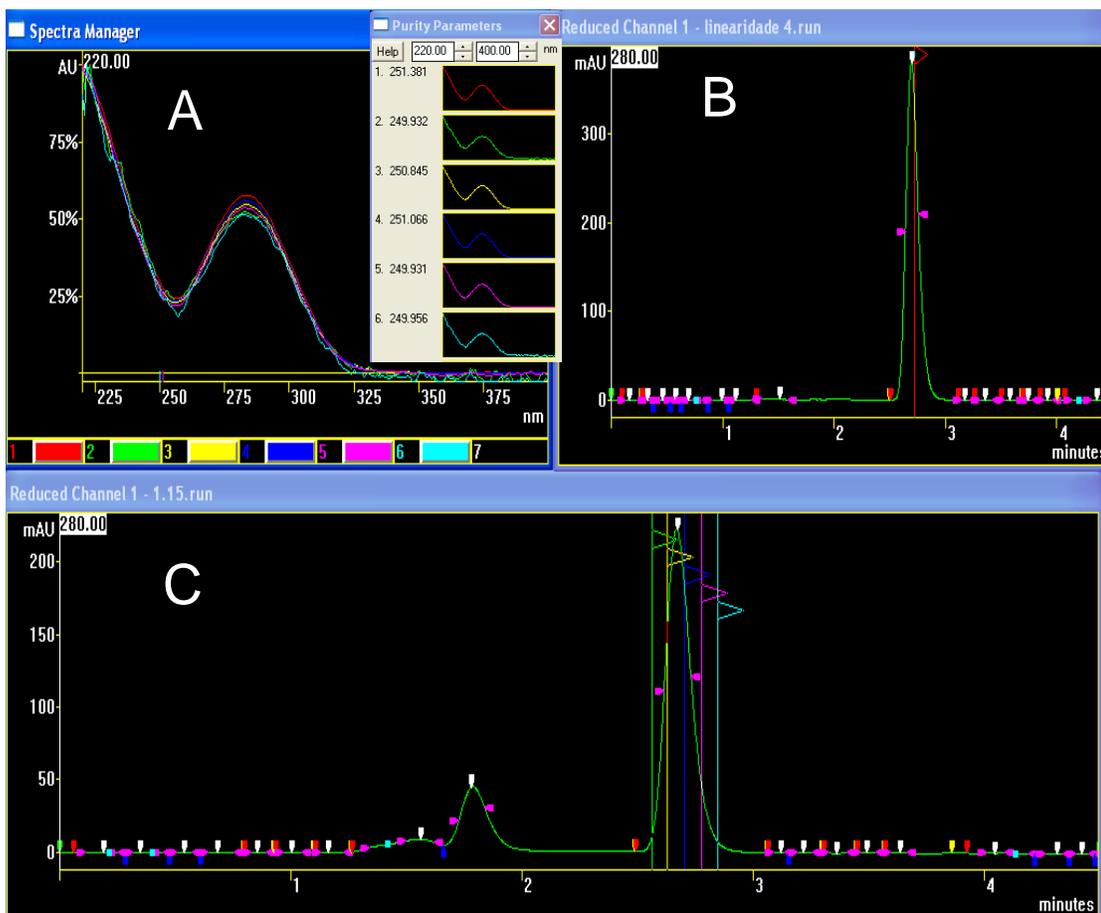


FIGURA 9 – CURVA ANALÍTICA DO DICLOFENACO SÓDICO NA SOLUÇÃO RECEPTORA

### 5.1.2 Análise da Pureza dos Picos

A comparação do espectro do pico do padrão com os espectros do pico do diclofenaco no cromatograma das amostras mostrou que todos se sobrepuseram, como demonstrado na Figura 10.

Foram analisadas os picos de amostras das cinco formulações. O cálculo estatístico de similaridade entre o padrão e as amostras resultou em um mínimo de 99,2 % de pureza. Estes resultados mostraram que os excipientes dos produtos não coeluíram com o fármaco, confirmando a especificidade do método.



A: SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS  
B: CROMATOGRAMA DA SOL. PADRÃO a 125 µg/mL  
C: CROMATOGRAMA DO GENÉRICO "A"

FIGURA 10 – ANÁLISE DA PUREZA DOS PICOS

## 5.2 Avaliação dos testes de qualidade

Para facilitar a discussão e comparação dos resultados dos testes de qualidade e desempenho, os valores obtidos de todas as análises deste estudo, para os cinco produtos, estão inicialmente reunidos na Tabela 1.

TABELA 1 – COMPARATIVO DOS RESULTADOS DE LIBERAÇÃO E DOS TESTES FÍSICO-QUÍMICOS

Parâmetro	Referência	Genérico A	Genérico B	Genérico C	Genérico D
<b>Fluxo membrana polietersulfona (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{h}</math>)*</b>	674,18 $\pm$ 53,53	987,52 $\pm$ 25,75	700,27 $\pm$ 32,52	489,49 $\pm$ 12,76	325,76 $\pm$ 13,37
<b>Fluxo membrana acetato de celulose (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{h}</math>)*</b>	731,63 $\pm$ 35,91	1.032,33 $\pm$ 48,76	676,82 $\pm$ 7,85	478,50 $\pm$ 24,44	326,33 $\pm$ 9,32
<b>Viscosidade aparente (cP)<sup>◇</sup></b>	5001,00 $\pm$ 130,11	4909,00 $\pm$ 36,77	7140,50 $\pm$ 74,25	6418,00 $\pm$ 130,11	4436,50 $\pm$ 74,25
<b>Tamanho de gotícula (<math>\mu\text{m}</math>)**</b>	4,58	4,75	4,61	1,21	Não visualizado
<b>Teor de água (%)<sup>◇</sup></b>	61,95 $\pm$ 1,19	79,87 $\pm$ 0,58	62,85 $\pm$ 1,74	75,91 $\pm$ 0,14	70,56 $\pm$ 0,28
<b>Teor (%)<sup>◇</sup></b>	99,88 $\pm$ 0,20	99,85 $\pm$ 0,92	99,76 $\pm$ 0,57	102,15 $\pm$ 0,59	101,25 $\pm$ 0,55
<b>pH<sup>◇</sup></b>	8,09 $\pm$ 0,01	7,16 $\pm$ 0,01	8,06 $\pm$ 0,03	7,18 $\pm$ 0,01	6,30 $\pm$ 0,03

\*Média  $\pm$  DP (n=6)

\*\*Mediana ( $D_{50}$ ) (n=100)

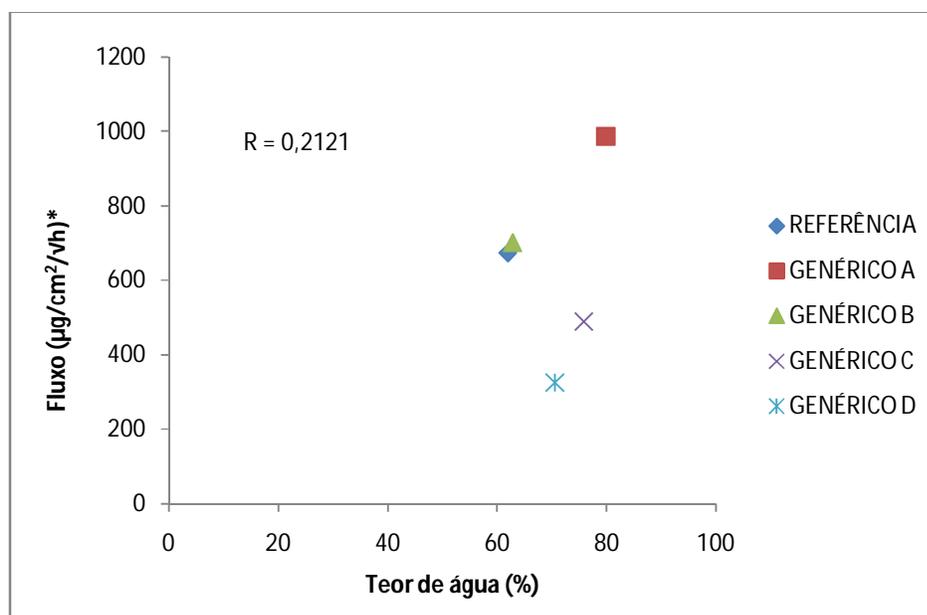
<sup>◇</sup>Média  $\pm$  DP (n=2)

Os produtos apresentaram teor satisfatório de acordo com os limites determinados pela Farmacopéia Britânica de 95-105 % (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2008).

O medicamento genérico B e o medicamento referência apresentaram pHs semelhantes (8,06 e 8,09) e também os maiores valores, o menor pH foi registrado para o genérico D (6,3).

Quanto ao teor de água, o genérico B e o referência apresentaram valores muito próximos e foram os que apresentaram menor teor ( $\pm 60\%$ ). O genérico A apresentou a maior quantidade de água, com valor aproximado de 80% e também a maior liberação.

Em 2005, Djordjevic e colaboradores estudando microemulsões de DDA mostraram que o fluxo aumentou proporcionalmente com a porcentagem de água nas formulações. No presente estudo, se considerarmos as cinco formulações, não podemos afirmar que houve esta relação direta ( $r=0,2121$ ) (Figura 11).



\*Fluxo obtido com a membrana de polietersulfona

FIGURA 11 – CORRELAÇÃO ENTRE O FLUXO DE LIBERAÇÃO DO DDA COM O TEOR DE ÁGUA DAS FORMULAÇÕES

A água pode colaborar com a liberação como no caso do genérico A, mas existem outros fatores que também influenciam, como por exemplo o caso do genérico C, o segundo em teor de água (75,91%), mas com liberação menor que o genérico B e referência (produtos com o menor teor de água  $\pm 60\%$ ).

### 5.2.1 Caracterização reológica

Pela análise dos reogramas obtidos do medicamento referência e dos quatro genéricos em estudo (Figura 12), verificou-se que todas as formulações apresentaram comportamento típico de fluidos não-newtonianos, do tipo pseudoplástico. Para as formas farmacêuticas semissólidas, como géis e cremes o fluxo pseudoplástico é o mais comum. Esses materiais têm sua viscosidade diminuída gradualmente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento (CORRÊA *et al.*, 2005).

Analisando a Tabela 2 e a Figura 13 que compara a variação da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento do medicamento referência, verifica-se que o produto não apresentou tixotropia. A curva ascendente formada pelo aumento do gradiente de cisalhamento ficou sobreposta à curva descendente, formada pela diminuição do gradiente. Os medicamentos genéricos do DDA analisados tiveram o mesmo comportamento do referência, também não apresentaram tixotropia, com suas curvas ascendentes e descendentes sobrepostas.

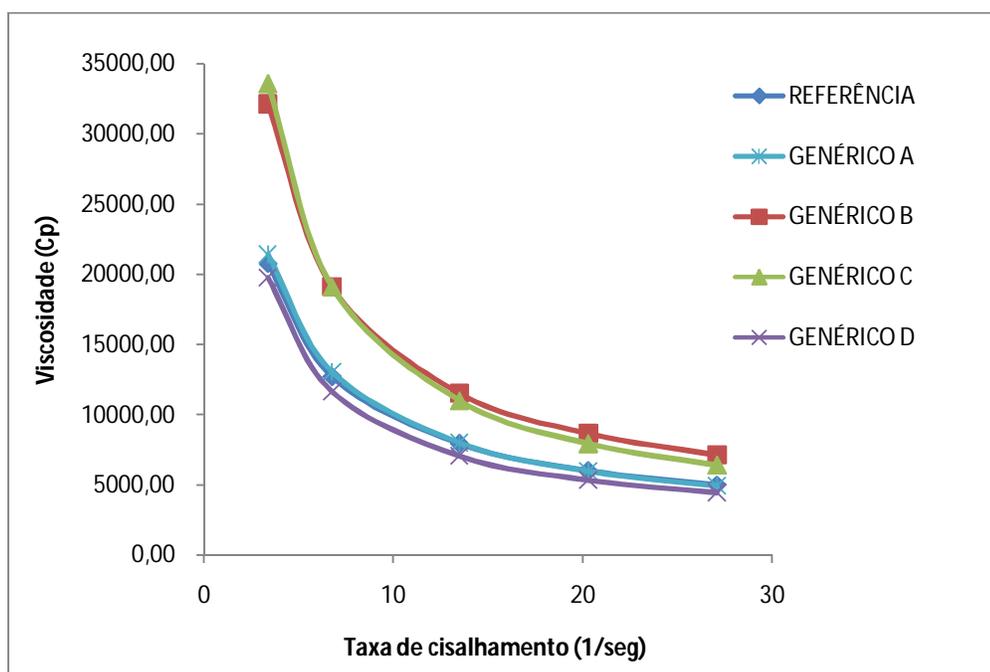


FIGURA 12 – VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA VELOCIDADE DE CISALHAMENTO

TABELA 2 – ESTUDO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA

Velocidade de rotação (rpm)	Velocidade de cisalhamento (1/seg)	Tensão de cisalhamento (Dyn/cm <sup>2</sup> )*	Viscosidade (cP)*
5,0	3,4	703,7 ± 10,04	20790,00 ± 296,98
10,0	6,8	860,1 ± 10,04	12705,00 ± 148,49
20,0	13,5	1073,5 ± 30,41	7927,50 ± 222,74
30,0	20,3	1226,0 ± 35,36	6037,50 ± 173,24
40,0	27,1	1354,0 ± 35,36	5001,00 ± 130,11
30,0	20,3	1226,0 ± 25,46	6037,50 ± 123,74
20,0	13,5	1080,5 ± 20,51	7980,00 ± 148,49
10,0	6,8	863,6 ± 15,06	12757,50 ± 222,74
5,0	3,4	703,7 ± 10,04	20790,00 ± 296,98

\*Média ± DP (n=2)

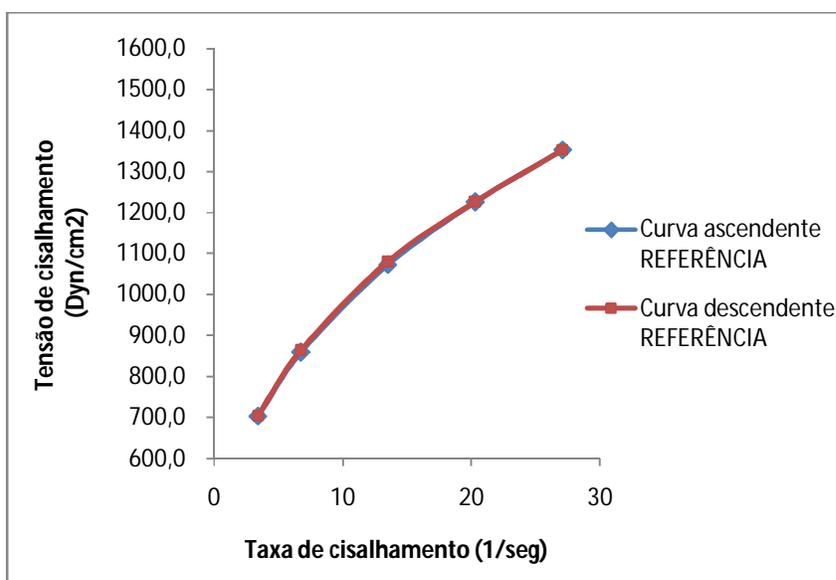


FIGURA 13 – CURVA DE FLUXO DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA DE 5 a 40 RPM (3,4 a 27,1 1/seg)

Schott<sup>1</sup> (1995, citado por Chorilli *et al.*, 2007) diz que: “os géis caracterizam-se principalmente por um relativamente alto grau de elasticidade, sofrendo grandes deformações elásticas sob tensões de cisalhamento, recuperando sua forma com a remoção do estresse”.

O estudo reológico das formulações genéricas e do referência, apesar de demonstrarem o mesmo comportamento pseudoplástico, mostrou algumas diferenças nos valores das viscosidades aparentes (Tabela 3).

TABELA 3 – VISCOSIDADE APARENTE

Produto	Viscosidade* (cP)	Referência x Genérico (Valor de $p$ ) <sup>◇</sup>	Referência x Genérico (Conclusão) <sup>◇</sup>
<b>Referência</b>	5001,00 ± 130,11	---	---
<b>Genérico A</b>	4909,00 ± 36,77	0,864	Semelhante
<b>Genérico B</b>	7140,50 ± 74,25	$2,1 \times 10^{-5}$	Não semelhante
<b>Genérico C</b>	6418,00 ± 130,11	$1,4 \times 10^{-4}$	Não semelhante
<b>Genérico D</b>	4436,50 ± 74,25	0,011	Não semelhante

\*Média ± DP (n = 2)

<sup>◇</sup> ( $p < 0,05$ ) – ANOVA fator único seguido de Tukey

Os produtos foram comparados por análise de variância ANOVA fator único, seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e somente o genérico A foi considerado semelhante ao referência ( $p = 0,864$ ). Embora as formulações do medicamento referência e do genérico B tenham a composição qualitativa mais semelhante dentre os produtos selecionados para este estudo, com excipientes de mesma função (Quadro 1), o genérico B apresentou a maior diferença ( $p = 2,1 \times 10^{-5}$ ) em relação ao medicamento referência, provavelmente devido a diferença quantitativa dos excipientes ou na técnica de preparo.

A literatura reporta vários fatores que afetam o comportamento reológico de semissólidos, que podem ter influenciado neste estudo como:

- Tipo de polímero formador do gel (CORRÊA *et al.*, 2005): o genérico A tem a Poliacrilamida enquanto os outros produtos tem Carbômeros;

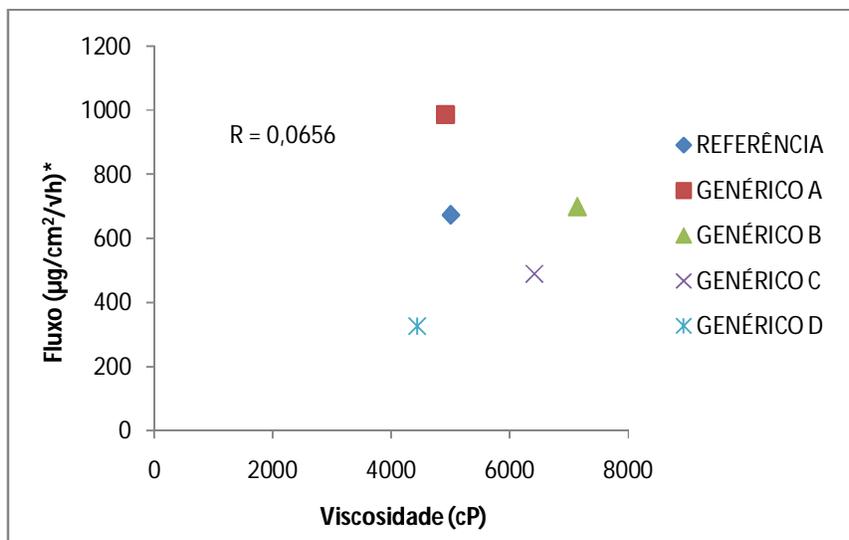
<sup>1</sup> SCHOTT, H. Rheology. In: GENNARO e cols. **The Science and Practice of Pharmacy**. 19 ed., 1995.

- Concentração do polímero (CHORILLI *et al.*, 2007): não conhecemos a porcentagem em cada medicamento;
- A natureza química e a concentração de um agente emulsificante (FLORENCE, ATWOOD, 2003; OLIVEIRA, 2010): Enquanto os outros tem a álcool cetosteárico etoxilado, o genérico A apresenta o álcool lanolina e o genérico D cera emulsificante não-iônica (composição não citada pelo fornecedor). Além disso, não se tem dados sobre a porcentagem empregada em cada medicamento;
- Agentes de consistência (AULTON, 2005; ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009): álcool cetosteárico presente no genérico C.

#### 5.2.1.1 Viscosidade x liberação

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a correlação dos resultados de viscosidade das especialidades farmacêuticas de DDA e a sua liberação, visto que, a viscosidade de um produto pode afetar a liberação da substância ativa (BARRY, 1983; CHORILLI *et al.*, 2007; UEDA *et al.*, 2009). A Figura xx compara os valores obtidos para os cinco produtos.

Percebe-se que não houve uma relação direta entre as viscosidades dos medicamentos e a sua liberação ( $r=0,0656$ ) (Figura 14). Por exemplo, o genérico B com maior viscosidade (7140 cP) não apresentou a menor liberação, ou seja, não houve uma relação inversa como encontrado nos estudos de Barry (1983), Walkow e McGinity (1987), Chorrilli *et al.* (2007) e Bruschi *et al.* (2007). Além disso, o genérico B foi o que mais se assemelhou ao referência no perfil de liberação *in vitro* apesar de ter a maior viscosidade dentre as amostras em estudo.



\*Fluxo obtido com a membrana de polietersulfona

FIGURA 14 – CORRELAÇÃO ENTRE O FLUXO DE LIBERAÇÃO DO DDA COM A VISCOSIDADE DAS FORMULAÇÕES

Porém, não foi possível correlacionar isoladamente a viscosidade com a velocidade de liberação, pois as formulações tiveram outras variáveis, como a diferença qualitativa e quantitativa de excipientes que também afetam o coeficiente de partição do fármaco do veículo para a solução receptora.

Outros fatores, como a afinidade pelo veículo, devem ser considerados conjuntamente com a viscosidade ao se prever o perfil de liberação do fármaco a partir de um veículo, como concluído também por Chorilli *et al.* (2007) ao avaliar a influência da viscosidade na liberação *in vitro* em géis de cafeína.

### 5.2.2 Tamanho de Gotícula

A análise microscópica revelou as diferenças das emulsões em termos de tamanho das gotículas. O diâmetro médio, a mediana e o *span* estão demonstrados na Tabela 4 e o resultado da distribuição do tamanho de gotículas foi plotado em histogramas (Figura 15).

TABELA 4 – DIÂMETRO DAS GOTÍCULAS

Produto	Média** ( $\mu\text{m}$ )	Mediana ( $D_{50}$ ) ( $\mu\text{m}$ )	Span [( $D_{90} - D_{10}$ ) / $D_{50}$ ] ( $\mu\text{m}$ )	Referência x Genérico (Valor de $p$ ) <sup>◇</sup>	Referência x Genérico (Conclusão) <sup>◇</sup>
Referência	4,38 ± 1,62	4,58	1,00	---	---
Genérico A	4,85 ± 2,53	4,75	1,43	0,237	Semelhante
Genérico B	4,76 ± 1,72	4,61	0,93	0,424	Semelhante
Genérico C	1,35 ± 0,64	1,21	1,22	0,000	Não semelhante
Genérico D	*	*	*	---	---

\*Gotículas não foram visualizadas no microscópio óptico com aumento de 1000X

\*\*Média ± DP (n = 100)

<sup>◇</sup> ( $p < 0,05$ ) – ANOVA fator único seguido de Tukey

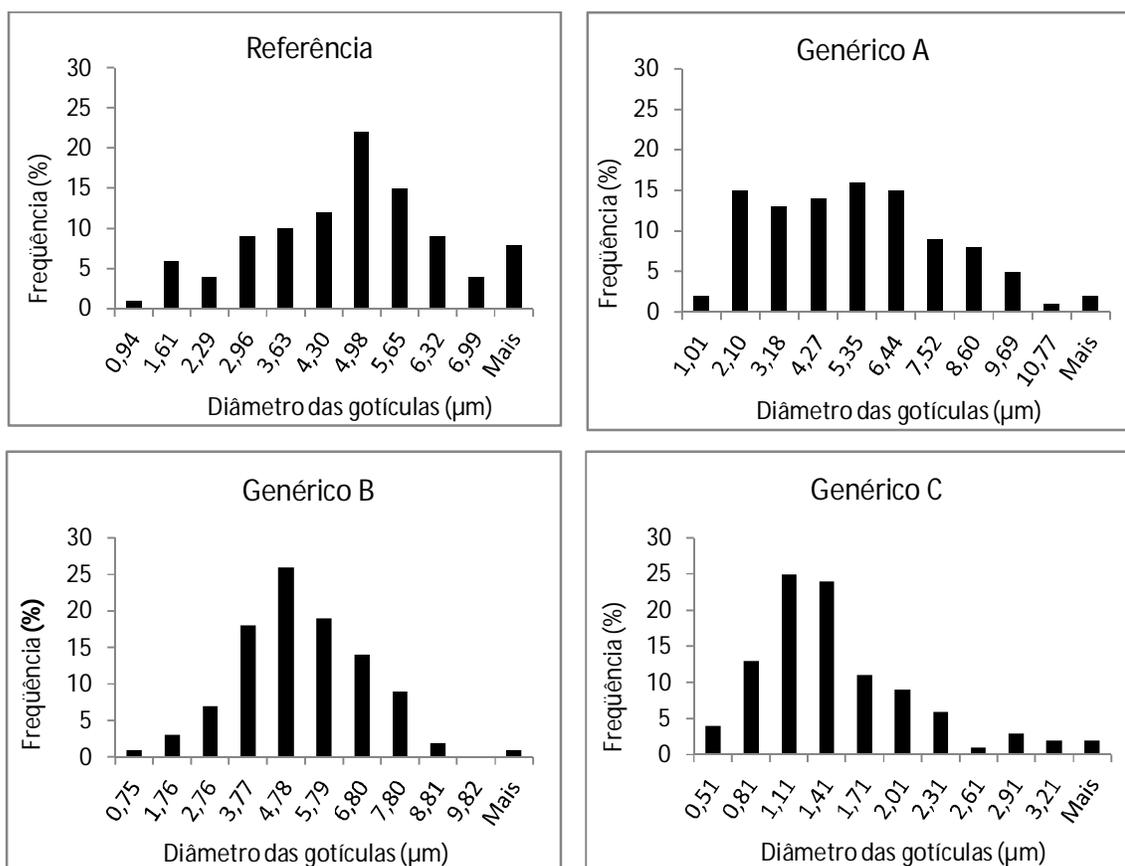


FIGURA 15 – HISTOGRAMAS DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE GOTÍCULA

O medicamento referência (Figura 16) e os genéricos A e B apresentaram gotículas esféricas semelhantes por análise de variância ANOVA fator único,

seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (genérico A x referência  $p = 0,237$ ; genérico B x referência  $p = 0,424$ ).

O Genérico C (Figura 17) apresentou gotículas de diâmetros menores ( $D_{50} = 1,35 \mu\text{m}$ ) que o referência e em maior quantidade. Para esta amostra foi necessário usar a objetiva com aumento de 100 x para mensurar o diâmetro (Figura 18).

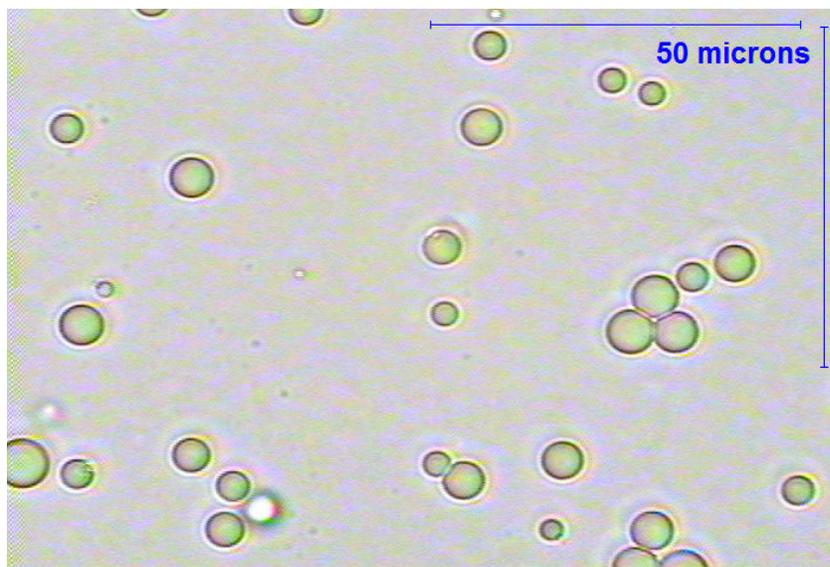


FIGURA 16 – ANÁLISE POR IMAGEM DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA COM AUMENTO DE 400X

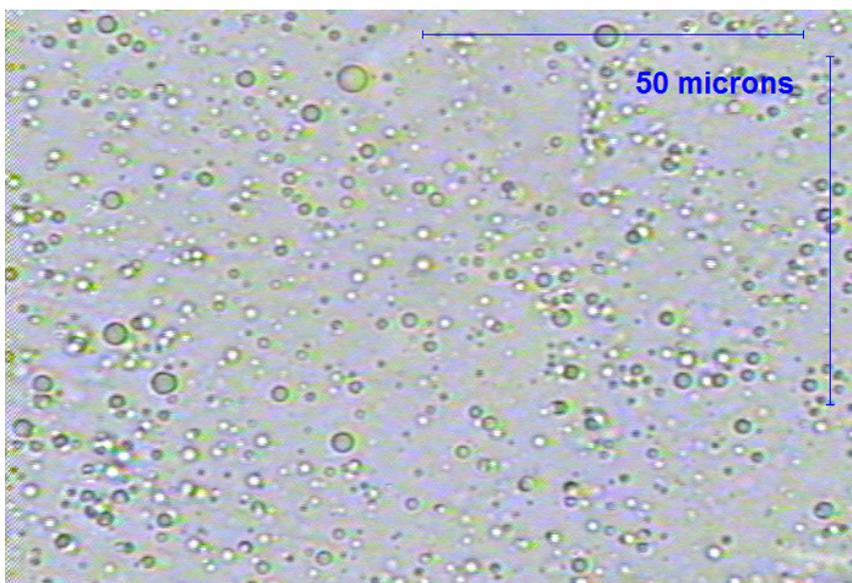


FIGURA 17 – ANÁLISE POR IMAGEM DO GENÉRICO “C” COM AUMENTO DE 400X

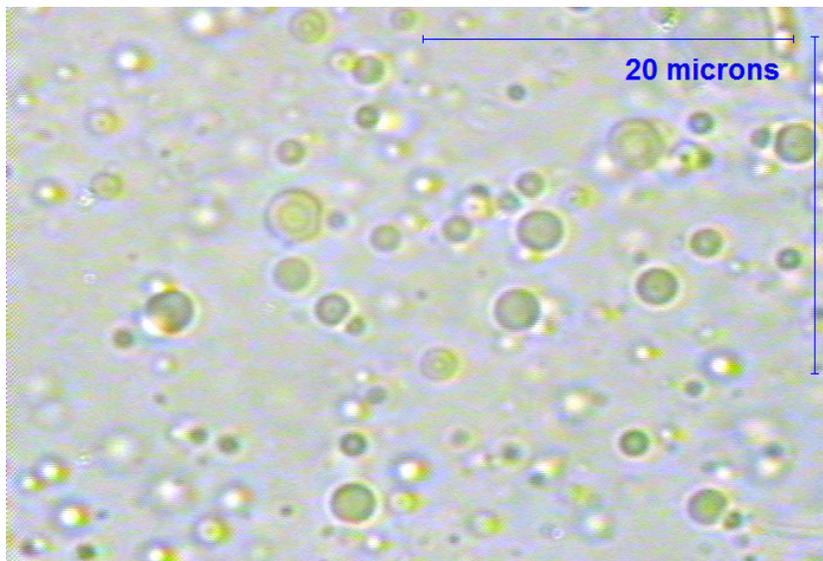


FIGURA 18 – ANÁLISE POR IMAGEM DO GENÉRICO “C” COM AUMENTO DE 1000X.

O genérico C apresentou tamanho de gotícula significativamente menor quando comparado com os genéricos A, B e ao referência ( $p < 0,05$ ). Destaca-se que o genérico C tem mais um interferente: é o único que contém o álcool cetosteárico. Segundo Aulton (2005), este composto é um bom agente emulsionante auxiliar sendo que parte do seu efeito estabilizante está relacionado à sua capacidade de aumentar a viscosidade da preparação. Forma também filmes interfaciais com os agentes tensoativos hidrofílicos tais como o cetomacrogol 1000 (álcool cetosteárico etoxilado) e dessa forma estabiliza emulsões O/A.

O menor tamanho de gotícula evidenciado no genérico C pode ser devido a essa característica do álcool cetosteárico e ainda a fatores como método de preparo, principalmente intensidade e tempo de agitação, proporção entre as fases aquosa e oleosa ou quantidade de tensoativo utilizado (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

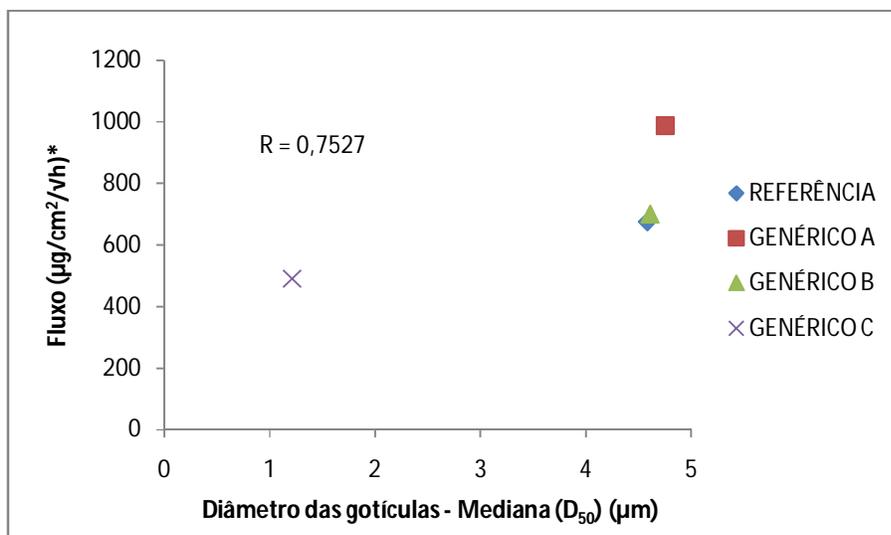
No genérico D não foi possível visualizar gotículas ao microscópio óptico. A hipótese para o ocorrido é que o produto seja uma microemulsão com gotículas de diâmetro reduzido, as quais não foram visualizadas devido ao alcance da técnica usada. A maioria das emulsões tem gotículas com diâmetros de 0,1 a 100  $\mu\text{m}$ , nas microemulsões o tamanho é reduzido – 5 a 140 nm. São sistemas termodinamicamente estáveis e apresentam muitas vantagens em relação às macroemulsões, em particular a sua transparência e estabilidade. Porém, requerem

quantidades maiores de tensoativo na sua formulação, geralmente há a presença de um cotensoativo, pois exigem uma tensão interfacial muito baixa para sua formação (AULTON, 2005).

### 5.2.2.1 Tamanho de gotícula X liberação

A caracterização físico-química de emulsões, principalmente por estudos de viscosidade e determinação do tamanho das gotículas, pode auxiliar na interpretação dos experimentos de liberação *in vitro* e *in vivo* (FORMARIZ *et al*, 2005).

Ao analisar os resultados foi visto que a difusão tendeu a diminuir com a redução do tamanho das gotículas nas formulações, apesar de não ter sido observada forte correlação ( $r=0,7527$ ) (Figura 19).



\*Fluxo obtido com a membrana de polietersulfona

FIGURA 19 – CORRELAÇÃO ENTRE O FLUXO DE LIBERAÇÃO DO DDA COM O TAMANHO DE GOTÍCULA DAS FORMULAÇÕES

O DDA, por ser um fármaco anfifílico pode interagir com o filme interfacial das gotículas da emulsão, localizando-se entre as bicamadas lipídicas (KRIWET, MUELLER-GOYMANN, 1994; DJORDJEVIC, PRIMORAC, STUPAR, 2005; SILVA *et al.* 2009), assim o tamanho da gotícula pode dificultar a saída do fármaco para o meio externo.

O processo de difusão do DDA pode ser relacionado com interações na interface das gotículas. Vasiljevic *et al.* (2006) considera que o DDA, por ser uma molécula anfifílica pode agir como um cotensoativo, tornando a interface mais rígida, suprimindo o processo de difusão. Segundo ele, essa interação provavelmente é mais pronunciada em altas concentrações de emulsificante.

As menores difusões do genérico C e D podem ser explicadas por essa interação do fármaco com o veículo. No caso do genérico C ( $D_{50} = 1,21 \mu\text{m}$ ), a presença do álcool cetosteárico na sua formulação, um emulsionante auxiliar, pode ter aumentado a interação do DDA na interface das gotículas, o que diminuiu sua difusão. O genérico D foi o que teve a menor difusão e supostamente o menor tamanho de gotícula. Como citado anteriormente por Attwood (2005), microemulsões requerem quantidades maiores de tensoativo para se manterem estáveis. Sendo assim, a interação do DDA pode ter sido maior ainda nessa formulação, consequentemente, menor foi sua difusão.

O genérico B e o referência que apresentaram velocidades de difusão semelhantes apresentaram também tamanhos de gotículas próximos ( $D_{50} = 4,61$  e  $4,58 \mu\text{m}$ , respectivamente).

O genérico A, apesar de não ter sido considerado estatisticamente diferente em relação ao medicamento referência quanto ao tamanho de gotículas ( $p=0,237$ ), apresentou o maior tamanho ( $D_{50} = 4,75 \mu\text{m}$ ) e a maior velocidade de liberação entre as amostras. A maior quantidade de água nessa amostra, a presença de um tensoativo (álcool lanolina) e do polímero formador do gel (poliacrilamida) de natureza diferente dos demais pode ter facilitado a coalescência das gotículas resultando em uma difusão maior do DDA. Este produto também foi o que apresentou a maior heterogeneidade no tamanho de gotícula (Tabela 4 e Figura 15), com o maior valor de *span* ( $1,43 \mu\text{m}$ ). A amplitude maior de sua distribuição pode ser um sinal da menor estabilidade da emulsão.

Emulsões com gotículas menores e distribuição homogênea são mais estáveis (AULTON, 2005; ISAAC *et al.*, 2008; FRANGE, GARCIA, 2009; OLIVEIRA,

2010), porém no desenvolvimento de uma formulação, deve-se levar em conta também que o fármaco precisa ser liberado do veículo em tempo adequado. Sendo assim, um equilíbrio entre esses dois fatores deve ser buscado.

A partir dos dados da literatura (CLÉMENT *et al.*, 2000; VASILJEVIC *et al.*, 2006), pode-se concluir que a viscosidade e o tamanho de gotícula podem influenciar direta ou indiretamente a liberação, mas como será essa relação vai depender do tipo de emulsão (A/O, O/A ou emulsões múltiplas), das características do fármaco (hidrofílico/lipofílico/anfifílico) e de outros fatores que em conjunto vão definir o desempenho do produto.

### 5.3 Resultados do ensaio de liberação *in vitro*

#### 5.3.1 Liberação *in vitro* com a membrana de polietersulfona

Nas Tabelas 5 a 9 estão apresentadas as quantidades liberadas de DDA através da membrana de polietersulfona, em cada tempo de coleta, para os medicamentos genéricos e o medicamento referência.

TABELA 5 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

TEMPO (horas)	TEMPO ( $\sqrt{\text{horas}}$ )	Quantidade liberada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )*	DPR (%)	% Liberada
0,25	0,5	172,61	8,57	8,76
0,5	0,7	278,63	7,84	14,14
1,0	1,0	464,79	7,18	23,58
1,5	1,2	609,48	5,67	30,93
2	1,4	756,47	5,64	38,38
3	1,7	964,80	6,90	48,95
4	2,0	1145,19	6,35	58,11
5	2,2	1281,08	6,34	65,00
6	2,4	1369,70	6,47	69,50

\*Média (n=6)

TABELA 6 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA DO GENÉRICO A COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

TEMPO (horas)	TEMPO ( $\sqrt{\text{horas}}$ )	Quantidade liberada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )*	DPR (%)	% Liberada
0,25	0,5	406,88	3,26	20,65
0,5	0,7	624,09	3,19	31,67
1,0	1,0	933,58	2,41	47,37
1,5	1,2	1145,63	2,14	58,13
2	1,4	1301,65	2,72	66,05
3	1,7	1481,91	2,04	75,19
4	2,0	1604,74	3,00	81,43
5	2,2	1677,79	3,01	85,13
6	2,4	1710,56	3,35	86,80

\*Média (n=6)

TABELA 7 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA DO GENÉRICO B COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

TEMPO (horas)	TEMPO ( $\sqrt{\text{horas}}$ )	Quantidade liberada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )*	DPR (%)	% Liberada
0,25	0,5	--	--	--
0,5	0,7	287,84	6,24	14,61
1,0	1,0	468,77	5,94	23,79
1,5	1,2	624,19	5,06	31,67
2	1,4	764,94	4,99	38,81
3	1,7	1002,90	4,55	50,89
4	2,0	1176,72	3,72	59,71
5	2,2	1318,17	3,55	66,88
6	2,4	1434,57	3,75	72,79

\*Média (n=6)

TABELA 8 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA DO GENÉRICO C COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

TEMPO (horas)	TEMPO ( $\sqrt{\text{horas}}$ )	Quantidade liberada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )*	DPR (%)	% Liberada
0,25	0,5	--	--	--
0,5	0,7	201,66	7,60	10,23
1,0	1,0	339,60	5,97	17,23
1,5	1,2	433,88	5,23	22,02
2	1,4	538,11	5,74	27,30
3	1,7	705,19	3,40	35,78
4	2,0	863,11	4,33	43,79
5	2,2	1020,12	1,74	51,76
6	2,4	1155,21	2,58	58,62

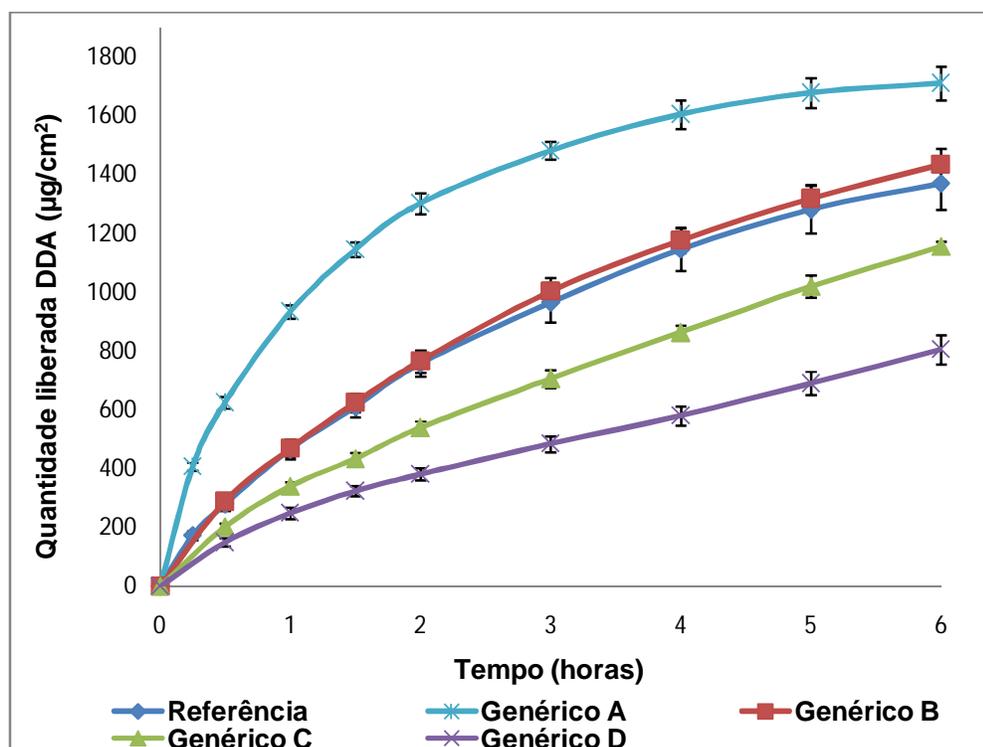
\*Média (n=6)

TABELA 9 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA DO GENÉRICO D COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

TEMPO (horas)	TEMPO ( $\sqrt{\text{horas}}$ )	Quantidade liberada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )*	DPR (%)	% Liberada
0,25	0,5	--	--	--
0,5	0,7	148,94	9,39	7,56
1,0	1,0	247,60	7,80	12,56
1,5	1,2	323,91	5,53	16,44
2	1,4	380,90	5,48	19,33
3	1,7	483,45	5,61	24,53
4	2,0	579,59	5,65	29,41
5	2,2	689,97	5,77	35,01
6	2,4	805,25	6,20	40,86

\*Média (n=6)

O desvio padrão relativo (DPR) entre as seis células de cada experimento foi menor que 10 % para todas as amostras, indicando boa precisão do método, ou seja, baixa variabilidade entre as réplicas dos ensaios de liberação. Na Figura 20 observa-se a representação gráfica dos resultados expressos nas Tabela 5 a 9.

FIGURA 20 – PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

### 5.3.1.1 Cálculo da velocidade de liberação (Fluxo)

A representação da quantidade liberada em função da raiz quadrada do tempo de ensaio permite obter, a partir da inclinação das retas (*slope*), a velocidade de liberação do fármaco em um produto semissólido (FDA, 1997; TOSCANO *et al.*, 2001; UEDA *et al.*, 2009).

Guy e Hadgraft (1990), baseados em estudo publicado por Higuchi (1962), propuseram que o tratamento dos dados de estudos de liberação *in vitro* deveria compreender a adoção de função com base na raiz quadrada do tempo. Segundo os autores, esse procedimento seria necessário para uma linearização dos dados e aproveitamento de mais pontos do perfil (HIGUCHI, 1962; GUY, HADGRAFT, 1990; BEMVINDO, 2006). De acordo com Higuchi, a observação de uma relação linear entre a quantidade de fármaco liberada/difundida e  $\sqrt{t}$  ocorre quando a difusão deste através da matriz do semissólido constitui o passo limitante do processo e, nestas circunstâncias, qualquer outro parâmetro (ex. meio receptor, membrana) não tem uma ação influente ou significativa no processo (TOSCANO *et al.*, 1997).

Esta relação tem se demonstrado ser linear e válida para formulações tópicas enquanto a porcentagem de fármaco liberada é menor que, aproximadamente, 30 % da quantidade aplicada no compartimento doador, constituindo a matriz, assim, uma fonte infinita e inesgotável de fármaco. Desta forma, o coeficiente de difusão não é dependente da concentração. Esta relação vale tanto para formulações tópicas contendo fármaco totalmente dissolvido quanto para aquelas em que o fármaco está suspenso (HIGUCHI, 1962; GUY, HADGRAFT, 1990; TOSCANO *et al.*, 1997; SHAH, 2005).

Adicionalmente, no compartimento receptor não se devem atingir concentrações superiores a 10 % da concentração limite de solubilidade do fármaco na fase receptora utilizada (TOSCANO *et al.*, 1997). No caso do DDA, a literatura traz que o mesmo é muito solúvel em tampão fosfato pH 7,4, com solubilidade superior à  $6,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  (SILVA *et al.*, 2009). A maior concentração na solução receptora atingida neste estudo não ultrapassou  $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ , sendo assim manteve-se as condições *sink* da análise, ou seja, não se aproximou da condição de saturação, situação que poderia reduzir o fluxo de difusão do fármaco do compartimento doador ao receptor.

### 5.3.1.1.1 Escolha dos pontos para cálculo da velocidade de liberação

Zatz e Segers (1998) discutem a escolha dos pontos de coleta nos ensaios de liberação *in vitro*, os quais citam que há um intervalo de tempo durante o qual os experimentos devem ser realizados. Os dados devem ser coletados somente após o equilíbrio da difusão (quando a membrana não exerce mais nenhum efeito), mas antes de ocorrer um esgotamento excessivo do fármaco do semissólido. Isto acontece por dois motivos:

Primeiro, porque os tempos iniciais podem não representar a situação em que a difusão através do semissólido está controlando a velocidade de liberação. Pode ser necessário desprezar um ou mais pontos no começo do experimento e utilizar os valores restantes para obter o *slope* da reta. Esta situação está ilustrada na Figura 21, linha 2 onde nos primeiros tempos, é observada uma pequena curvatura, onde o fluxo ainda não é constante com o tempo.

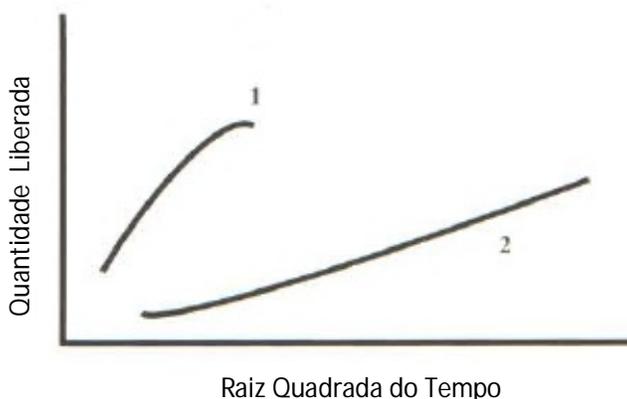


FIGURA 21 – PADRÃO DE LIBERAÇÃO ESPERADO PARA DOIS SISTEMAS: 1 – GEL DE LIBERAÇÃO RÁPIDA E 2 – POMADA DE LIBERAÇÃO LENTA  
FONTE: ZATZ, SÉGERS (1998)

Segundo, a linha 1 desta mesma figura exhibe uma curvatura em valores maiores da raiz quadrada do tempo. Este padrão é esperado quando a liberação excede aproximadamente 35-45% do conteúdo inicial de

fármaco do semissólido. Neste ponto o pressuposto básico da equação que suporta a relação linear entre quantidade liberada e a raiz quadrada do tempo não é mais válida. Se o perfil é muito rápido, como por exemplo, em sistemas de géis contendo fármacos dissolvidos de baixo peso molecular, a curvatura pode ser encontrada em menos de três horas (ZATZ, SEGERS, 1998).

Levando em consideração o exposto por Zatz e Segers (1998), o fluxo do DDA nas especialidades farmacêuticas foi calculado por regressão linear e corresponde à inclinação dos 5 primeiros pontos experimentais, a partir de 0,5h até 3h. Assumiu-se que a partir deste ponto o equilíbrio de difusão estaria alcançado e até 3 horas a porcentagem liberada de fármaco não caracterizava esgotamento da dose suficiente para influenciar na velocidade de liberação, o que seria confirmado pela linearidade das retas.

Para o genérico A o fluxo foi calculado a partir de 0,25h até 2h e para o referência o fluxo foi calculado de 0,5h até 3h e de 0,25h até 2h. A justificativa para essa diferença nos tempos de coleta é que ao realizar os testes iniciais os pontos de coleta foram planejados tendo como parâmetro o referência, que até 3 horas liberou em torno de 45 % da quantidade aplicada e a reta formada pela quantidade liberada em função da raiz quadrada do tempo apresentou uma boa linearidade ( $r = 0,9995$ ).

Porém, ao analisar o genérico A, este apresentou uma liberação muito mais rápida que os outros (em 3 h o genérico A já havia liberado 75%, vide Tabela 6), formando a curvatura indesejada em valores maiores da raiz quadrada do tempo (Figura 22), como demonstrado anteriormente por Zatz e Segers (1998), causado pelo esgotamento excessivo do DDA na amostra aplicada.

Foi necessária então, para o medicamento genérico A, a análise de mais um ponto de coleta no início da curva e a eliminação dos pontos a partir de 3 horas. Para que a comparação deste produto com o referência fosse feita usando-se os mesmos pontos, estes dois produtos foram reanalisados e posteriormente comparados com o ponto de coleta 0,25h.

A boa linearidade observada para os pontos escolhidos (Figura 23) foi confirmada pelos coeficientes de correlação apresentados na Tabela 10 (todos acima de 0,99) e é garantia de que a velocidade de liberação foi constante nestes tempos, para todas as amostras. Desta forma, a cinética de Higuchi pôde ser de fato aplicada (plotagem linear de  $Q$  versus  $\sqrt{t}$ ).

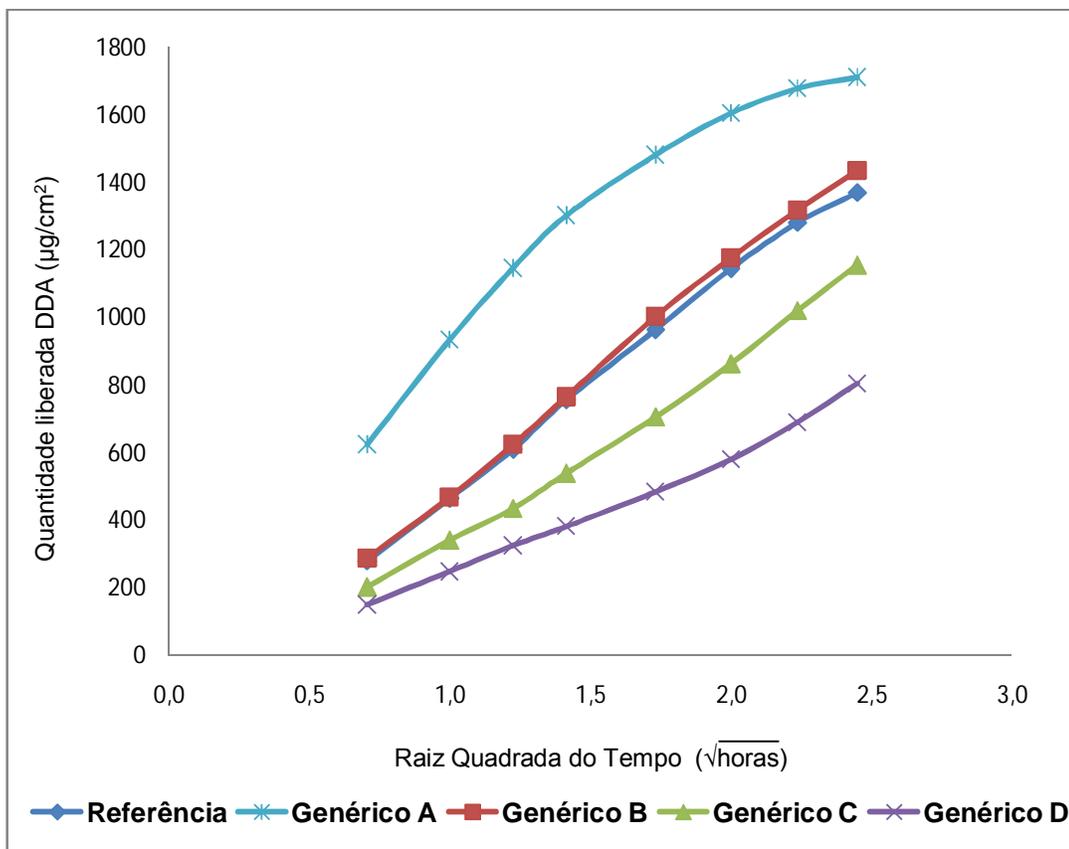


FIGURA 22 – QUANTIDADE LIBERADA EM FUNÇÃO DA  $\sqrt{t}$  COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA USANDO OS PONTOS DE COLETA DE 0,5 ATÉ 6h

TABELA 10 – FLUXOS, COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO E LAG TIME DOS PRODUTOS ATRAVÉS DA MEMBRANA DE POLIETERSULFONA

Produto	Fluxo ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{h}$ ) <sup>o</sup>	Coefficiente de Correlação	Lag Time (minutos)
REFERÊNCIA*	674,18 ± 53,53	0,9995	5,53
REFERÊNCIA**	637,57 ± 42,72	0,9981	3,85
GENÉRICO A**	987,52 ± 25,75	0,9990	0,34
GENÉRICO B*	700,27 ± 32,52	0,9990	6,01
GENÉRICO C*	489,49 ± 12,76	0,9988	5,74
GENÉRICO D*	325,76 ± 13,37	0,9998	3,53

<sup>o</sup>Média ± DP (n=6)

\*Calculados usando os pontos 0,5 até 3 h

\*\*Calculados usando os pontos 0,25 até 2 h

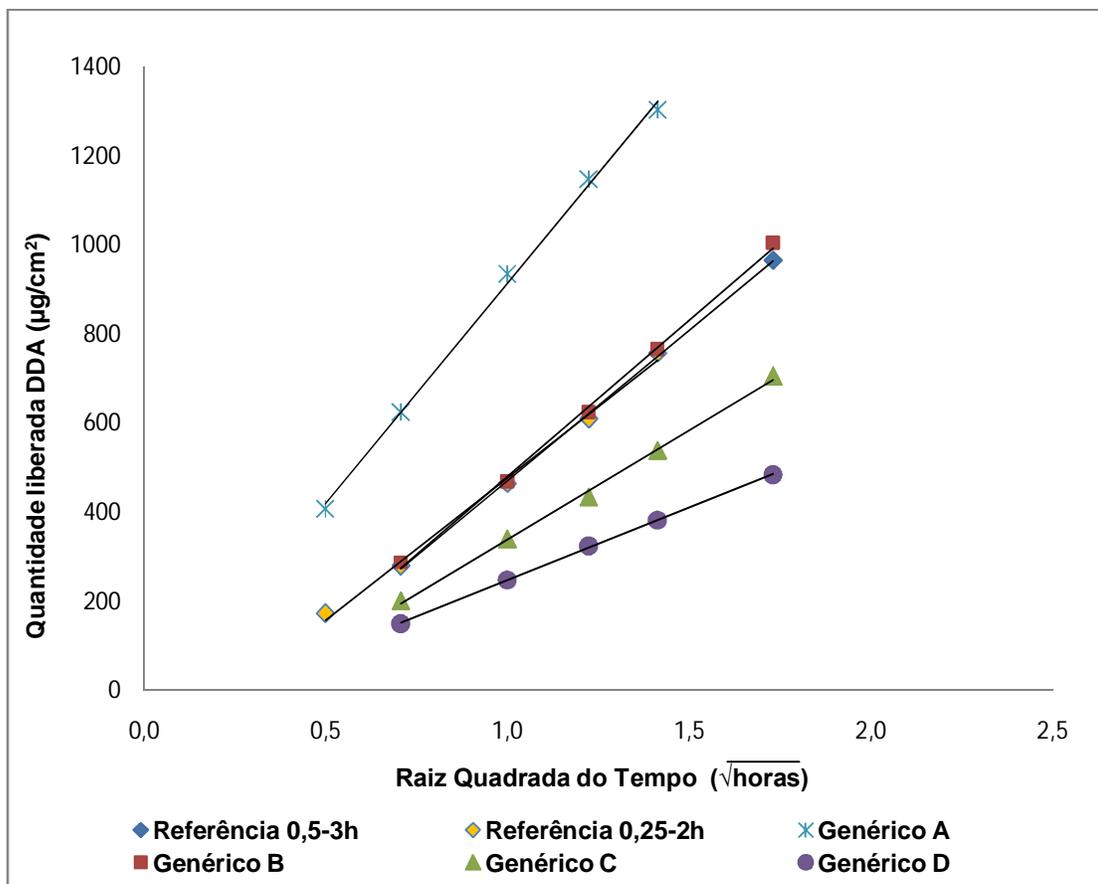


FIGURA 23 – QUANTIDADE LIBERADA EM FUNÇÃO DA  $\sqrt{t}$  COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA USANDO OS PONTOS DE COLETA ESCOLHIDOS PARA CADA PRODUTO

O *lag time*, é definido como o tempo necessário para que a passagem de uma substância através de uma membrana atinja o equilíbrio (AULTON, 2005), ele está demonstrado na Figura 24.

É possível ver pelo gráfico e pelos valores expostos na Tabela 10 que os produtos apresentaram um *lag time* pequeno, conseqüentemente pouco tempo para estabelecer o equilíbrio no processo de difusão. O genérico A foi o que apresentou o menor *lag time* (segundos), enquanto que os demais levaram de 3 a 6 minutos para alcançar uma velocidade constante de liberação.

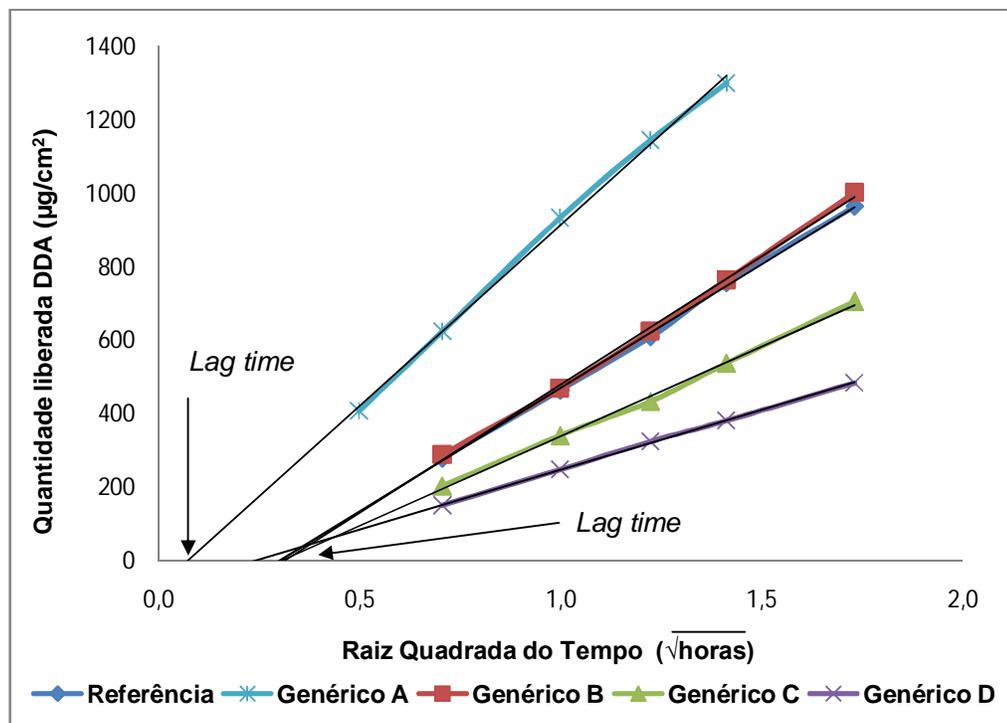


FIGURA 24 – EXTRAPOLAÇÃO ATÉ O EIXO X DA RETA DE REGRESSÃO LINEAR PARA VISUALIZAÇÃO DO LAG TIME

Um intercepto de X que corresponde geralmente a uma pequena fração de uma hora é uma característica normal nas plotagens de ensaios de liberação (FDA, 1997). Sendo assim os resultados estão de acordo com o que preconiza a literatura e demonstram que a membrana de polietersulfona não foi barreira à difusão do DDA.

### 5.3.1.2 Comparação das velocidades de liberação *in vitro*

Após determinar o *slope* de cada uma das seis células, os produtos foram comparados com o medicamento referência de acordo com o método não-paramétrico descrito na seção 4.2.3.6.

A escolha deste é justificada por ser um método resistente à *outliers*, já que o teste de liberação *in vitro* é um teste delicado e resultados não verdadeiros podem ocorrer no teste, devido a, por exemplo, formação de bolhas de ar entre a amostra e a membrana de alguma célula.

Os valores limites obtidos do intervalo de confiança de 90 %, para a razão das medianas das velocidades de difusão dos produtos, estão demonstrados na Tabela 11 e foram comparados com o intervalo limite de 75 % a 133,33 % como critério de semelhança (FDA, 1997).

**TABELA 11 – TESTE ESTATÍSTICO ENTRE GENÉRICOS E O REFERÊNCIA COM A MEMBRANA DE POLIETERSULFONA**

<b>Produto</b>	<b>Valores limites do intervalo de confiança de 90%</b>	<b>Conclusão*</b>
<b>REFERÊNCIA x GENÉRICO A</b>	146,60 - 165,94	NÃO SEMELHANTE
<b>REFERÊNCIA x GENÉRICO B</b>	94,99 - 111,93	SEMELHANTE
<b>REFERÊNCIA x GENÉRICO C</b>	66,82 - 77,74	NÃO SEMELHANTE
<b>REFERÊNCIA x GENÉRICO D</b>	45,17 - 52,14	NÃO SEMELHANTE

\*Critério para semelhança: Valores devem ficar entre 75 % a 133,33 % (FDA, 1997)

A análise da Figura 20 sugere que os perfis de liberação do referência e do genérico B são semelhantes. O genérico A teve uma liberação mais rápida que os demais e o Genérico C e D mais lentos que o referência. Pode-se ver que somente o genérico B seria considerado semelhante ao referência, segundo o método estatístico de comparação adotado (Tabela 11).

Os resultados de liberação podem explicar o conjunto de diferenças das formulações evidenciadas em cada teste que foi executado antes individualmente, pois é considerado um teste de “controle de qualidade final”. Ele reflete o efeito combinado de vários parâmetros físicos e químicos, incluindo solubilidade, tamanho de partícula e propriedades reológicas da forma farmacêutica (FDA, 1997). Como visto, os produtos analisados no presente estudo apresentavam características diferentes na formulação, com diferenças qualitativas e provavelmente quantitativas de excipientes, e modo de preparo (desconhecido), além das diferenças nos parâmetros físicos.

O genérico B apresentou o perfil semelhante ao produto referência, e analisando a composição qualitativa demonstra ser a formulação também mais próxima ao Cataflam Emulgel<sup>®</sup>, com os mesmos excipientes. Nos testes de tamanho de gotícula, teor de água e pH os resultados também foram semelhantes. E apesar da viscosidade deste produto ser maior que a do referência este não foi o fator predominante no resultado de liberação deste produto.

O genérico C teve uma liberação mais lenta que o referência. As interações do DDA com a interface e a maior viscosidade, devido a presença do agente de consistência/co-emulsionante álcool cetoestearílico podem ter contribuído para sua menor difusão.

O genérico D foi o que apresentou o menor fluxo, tamanho de gotícula e viscosidade. Foi o único que não especificou o tipo de tensoativo que emprega (consta apenas cera emulsionante não-iônica), além disso não declarou nenhum emoliente em separado. A possibilidade deste produto ser uma microemulsão, um sistema bastante estável, pode dificultar a difusão do DDA devido a interações do fármaco com o filme interfacial.

O genérico A com a maior liberação apresentou excipientes diferentes, como o polímero formador do gel, quando todos apresentavam o Carbopol<sup>®</sup>, neste era a Poliácridamida. O emulsificante (álcool lanolina) também difere dos demais e é o único que não continha álcool isopropílico como solubilizante. Esse fato pode aumentar a atividade termodinâmica do DDA, pois diminui sua solubilidade no veículo, conseqüentemente aumenta seu coeficiente de partição para a solução receptora. Essas diferenças qualitativas podem ter facilitado a difusão do DDA.

Bemvindo (2006) estudou formulações de nitrato de miconazol creme do mercado brasileiro e também observou diferenças na liberação dos produtos em função da diferença qualitativa das formulações. Neste caso, o excipiente propilenoglicol presente em algumas formulações aumentou a solubilidade do miconazol afetando a atividade termodinâmica e diminuindo o coeficiente de partição do fármaco para o meio receptor.

O teste de liberação *in vitro*, isoladamente, não é um substituto para avaliação da biodisponibilidade ou bioequivalência *in vivo* entre formulações dermatológicas de diferentes fabricantes (FDA, 1997). Isso porque uma maior quantidade de fármaco liberado pela formulação nos experimentos *in vitro* não é garantia de maior disponibilidade de fármaco no local de ação, visto que a

penetração cutânea de fármacos possui muitas peculiaridades. As características de penetração de cada formulação (por ex., presença de promotores de absorção) é que irão ditar a quantidade de fármaco presente em cada camada de pele (BEMVINDO, 2006).

Muitos promotores de absorção são usados por razões alternativas dentro das preparações tópicas e transdérmicas. Por exemplo, uma formulação tópica pode conter propilenoglicol como veículo, um agente tensoativo para solubilizar o fármaco e um terpeno como fragrância. Estas formulações podem penetrar mais devido a presença desses agentes, embora eles não tenham sido usados especificamente para este propósito (WILLIAMS, BARRY, 2004).

Apesar do teste de liberação ser apenas um indicativo do desempenho da formulação, os valores de fluxo obtidos no ensaio de liberação permitem concluir que:

O genérico A possui veículo que possibilita maior liberação do DDA para o meio receptor utilizado, quando comparado ao medicamento referência. Se esse mesmo comportamento ocorrer *in vivo*, pode-se inferir que uma maior quantidade de DDA estará disponível para a penetração na pele em um menor tempo a partir do genérico A.

Para os genéricos C e D, a provável maior afinidade do DDA pelo veículo resultou em uma quantidade menor que a liberada pelo referência, o que pode afetar seu desempenho uma vez que o primeiro passo para um produto tópico exercer seu efeito é liberar do veículo antes de entrar em contato com a superfície da epiderme e estar disponível para penetração na pele (GUY, 1986).

### **5.3.2 Liberação *in vitro* com a membrana de acetato de celulose**

Nas Tabelas 12 a 16 estão apresentadas as quantidades liberadas de DDA através da membrana de acetato de celulose, em cada tempo de coleta, para os medicamentos genéricos e o medicamento referência.

TABELA 12 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA PARA O MEDICAMENTO REFERÊNCIA COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

TEMPO (horas)	TEMPO ( $\sqrt{\text{horas}}$ )	Quantidade liberada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )*	DPR (%)	% Liberada
0,25	0,5	172,82	3,08	8,77
0,5	0,7	294,34	4,90	14,93
1,0	1,0	484,68	4,23	24,59
1,5	1,2	648,86	4,49	32,92
2	1,4	797,53	4,42	40,47
3	1,7	1040,09	4,35	52,77
4	2,0	1222,91	4,44	62,05
5	2,2	1361,03	4,32	69,06
6	2,4	1457,64	3,74	73,96

\*Média (n=6)

TABELA 13 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA PARA O GENÉRICO A COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

TEMPO (horas)	TEMPO ( $\sqrt{\text{horas}}$ )	Quantidade liberada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )*	DPR (%)	% Liberada
0,25	0,5	394,95	3,13	20,04
0,5	0,7	620,01	1,96	31,46
1,0	1,0	942,50	2,65	47,82
1,5	1,2	1172,29	2,88	59,48
2	1,4	1326,44	3,56	67,30
3	1,7	1549,50	4,20	78,62
4	2,0	1665,60	4,41	84,51
5	2,2	1731,01	4,38	87,83
6	2,4	1778,15	5,03	90,22

\*Média (n=6)

TABELA 14 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA PARA O GENÉRICO B COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

TEMPO (horas)	TEMPO ( $\sqrt{\text{horas}}$ )	Quantidade liberada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )*	DPR (%)	% Liberada
0,25	0,5	--	--	--
0,5	0,7	280,74	2,11	14,25
1,0	1,0	458,99	2,58	23,29
1,5	1,2	615,22	2,07	31,22
2	1,4	752,92	1,53	38,20
3	1,7	968,84	1,57	49,16
4	2,0	1145,78	0,80	58,14
5	2,2	1290,43	0,81	65,48
6	2,4	1393,42	1,34	70,70

\*Média (n=6)

TABELA 15 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA PARA O GENÉRICO C COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

TEMPO (horas)	TEMPO ( $\sqrt{\text{horas}}$ )	Quantidade liberada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )*	DPR (%)	% Liberada
0,25	0,5	--	--	--
0,5	0,7	203,85	3,56	10,34
1,0	1,0	337,96	2,59	17,15
1,5	1,2	438,97	3,25	22,27
2	1,4	530,51	3,74	26,92
3	1,7	696,49	3,93	35,34
4	2,0	844,81	5,28	42,87
5	2,2	992,11	5,70	50,34
6	2,4	1118,15	6,02	56,74

\*Média (n=6)

TABELA 16 – QUANTIDADE LIBERADA DE DDA PARA O GENÉRICO D COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

TEMPO (horas)	TEMPO ( $\sqrt{\text{horas}}$ )	Quantidade liberada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )*	DPR (%)	% Liberada
0,25	0,5	--	--	--
0,5	0,7	141,57	7,34	7,18
1,0	1,0	241,96	5,33	12,28
1,5	1,2	317,51	4,81	16,11
2	1,4	376,29	3,02	19,09
3	1,7	476,40	4,32	24,17
4	2,0	577,00	4,68	29,28
5	2,2	690,98	5,47	35,06
6	2,4	803,66	5,61	40,78

\*Média (n=6)

O desvio padrão relativo (DPR) entre as seis células de cada experimento foi menor que 8 % para todos os produtos, indicando baixa variabilidade entre as réplicas dos ensaios de liberação também para esta membrana.

Na Figura 25 observa-se a representação gráfica dos resultados expressos nas Tabelas 12 a 16. O cálculo do fluxo e *lag time* foi realizado da mesma maneira que no item 5.3.1 e os resultados estão expressos na Figura 26 e Tabela 17.

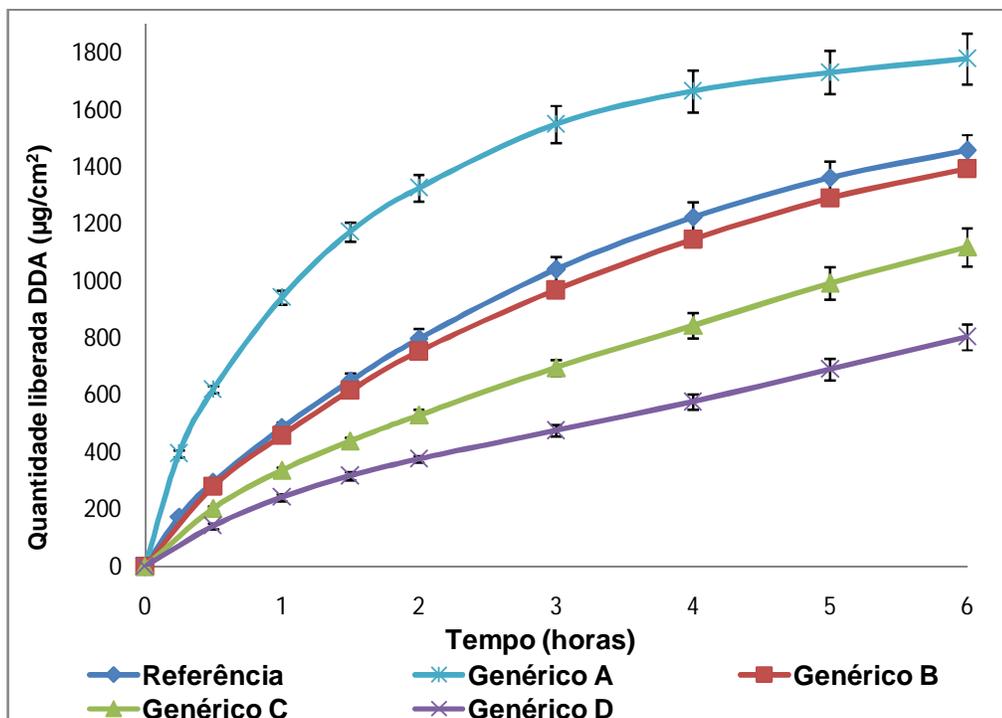


FIGURA 25 – PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

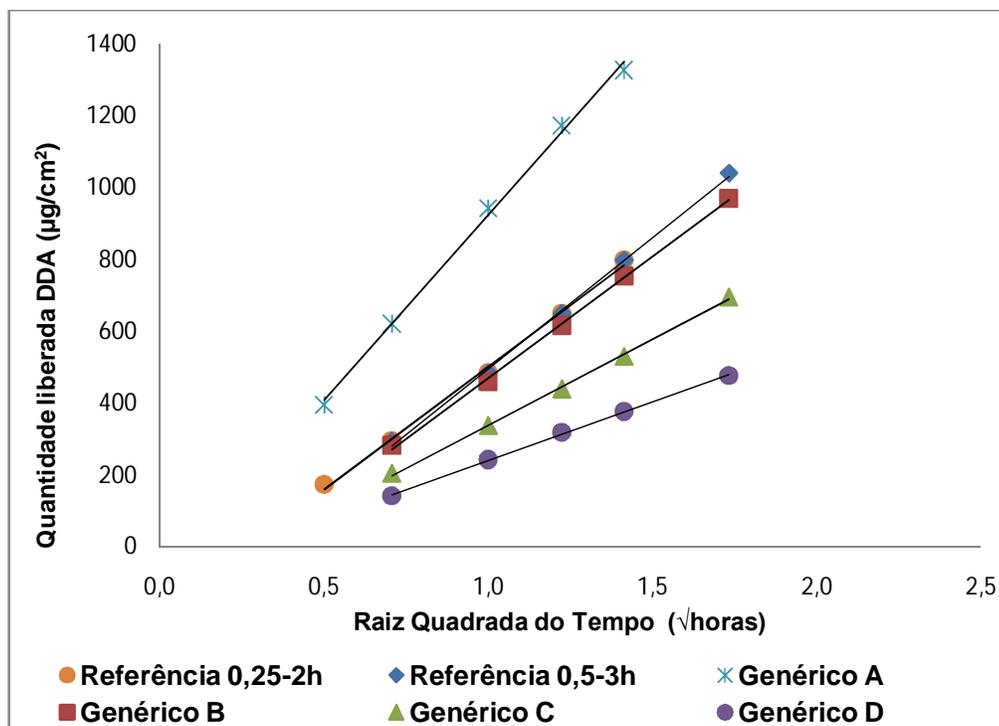


FIGURA 26 – QUANTIDADE LIBERADA EM FUNÇÃO DA  $\sqrt{t}$  COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE USANDO OS PONTOS DE COLETA ESCOLHIDOS PARA CADA PRODUTO

TABELA 17 – FLUXOS, COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO E *LAG TIME* DOS PRODUTOS COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

Produto	Fluxo ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$ ) <sup>◊</sup>	Coefficiente de Correlação	Lag Time (minutos)
REFERÊNCIA*	731,63 ± 35,91	0,9992	6,26
REFERÊNCIA**	682,28 ± 34,37	0,9986	4,25
GENÉRICO A**	1.032,33 ± 48,76	0,9988	0,67
GENÉRICO B*	676,82 ± 7,85	0,9995	5,63
GENÉRICO C*	478,50 ± 24,44	0,9993	5,14
GENÉRICO D*	326,33 ± 9,32	0,9997	4,16

<sup>◊</sup> Média ± DP (n=6)

\*Calculados usando os pontos 0,5 até 3 h

\*\*Calculados usando os pontos 0,25 até 2 h

Os produtos apresentaram praticamente os mesmos *lag times* e as mesmas diferenças de fluxo encontradas quando comparados com a membrana de polietersulfona.

Aplicando o teste estatístico (Tabela 18) descrito na seção anterior, constatou-se que também, apenas o genérico B foi considerado semelhante ao referência no ensaio com a membrana de acetato de celulose.

TABELA 18 – TESTE ESTATÍSTICO ENTRE GENÉRICOS E O REFERÊNCIA COM A MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

Produto	Valores limites do intervalo de confiança de 90%	Conclusão*
REFERÊNCIA x GENÉRICO A	143,92 - 160,18	NÃO SEMELHANTE
REFERÊNCIA x GENÉRICO B	88,82 - 95,08	SEMELHANTE
REFERÊNCIA x GENÉRICO C	62,31 - 68,96	NÃO SEMELHANTE
REFERÊNCIA x GENÉRICO D	42,76 - 46,59	NÃO SEMELHANTE

\*Critério para semelhança: Valores devem ficar entre 75 % a 133,33 % (FDA, 1997)

### 5.3.3 Comparação dos resultados obtidos com a membrana de polietersulfona e de acetato de celulose

Os resultados obtidos com as duas membranas em estudo apresentaram-se semelhantes para os produtos testados. Para analisar estatisticamente os valores de fluxo obtidos com as membranas foi realizado o teste *t* pareado. O pareamento é o indicado por aumentar a eficiência do teste, quando um mesmo produto é avaliada por dois tratamentos distintos (no caso as duas membranas), tornando-o mais sensível a diferenças pequenas entre os tratamentos.

Como pode ser visto na Tabela 19, não foram encontradas diferenças significativas entre as membranas de acetato de celulose e polietersulfona quanto aos valores de fluxo obtidos para as cinco especialidades farmacêuticas, para um nível de significância de 5 %.

TABELA 19 – TESTE ESTATÍSTICO: MEMBRANA DE POLIETERSULFONA X MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE

Membrana Polietersulfona x Membrana Acetato de Celulose	Valor de <i>p</i>	Conclusão*
REFERÊNCIA	0,1200	SEMELHANTE
GENÉRICO A	0,0569	SEMELHANTE
GENÉRICO B	0,1893	SEMELHANTE
GENÉRICO C	0,2099	SEMELHANTE
GENÉRICO D	0,9108	SEMELHANTE

\*Para um nível de significância de 5 %

Segundo Corbo *et al.* (1993), a seleção da membrana sintética é um dos passos mais críticos no desenvolvimento de um método de liberação *in vitro*. Fatores como dimensão reduzida e tortuosidade do poro, espessura, fenômenos de

adsorção à membrana ou interação formulação/membrana/fase receptora podem afetar a cinética de difusão do teste de liberação *in vitro* (CORBO, 1993; ZATZ 1995; TOSCANO *et al.*, 2001).

Shah *et al.* (1989) testaram cremes de hidrocortisona usando seis tipos de membranas hidrofílicas com porosidade semelhante ( $\pm 0,45 \mu\text{m}$ ), entre elas acetato de celulose e polissulfona, e observaram que o fluxo não foi afetado pelo tipo de membrana usado, com exceção da membrana de fibra de vidro. Em contraste, para pomadas de hidrocortisona somente a membrana de polissulfona foi adequada (SHAH, ELKINS, 1995).

De acordo com Zatz (1995), para oferecer a menor resistência difusional, a membrana deve ter alta porosidade, espessura mínima e não exibir ligação do fármaco à membrana. Já Shah e colaboradores (1999) concluíram que as características da membrana geralmente não afetam a velocidade de liberação, desde que a membrana tenha porosidade suficiente.

Ng *et al.* (2010) testaram 13 tipos diferentes de membranas e observaram que as membranas influenciaram na liberação do fármaco, podendo ser classificadas em 2 níveis: fluxo alto obtido com as membranas de microfiltração e fluxo lento com as de ultrafiltração, porém não houve correlação com os parâmetros da membrana como tamanho de poro ou espessura.

Pelos dados da literatura (SHAH *et al.*, 1989; SHAH, ELKINS, 1995; SHAH *et al.*, 1999; NG *et al.*, 2010) não existe um padrão de comportamento para as membranas, devendo ser elas testadas para cada fármaco, veículo e método (solução receptora).

As membranas de acetato de celulose e polietersulfona usadas neste estudo propiciaram fluxos semelhantes. Ambas têm caráter hidrofílico, apresentam mesma porosidade ( $0,45\mu\text{m}$ ) e espessura semelhantes ( $\pm 120$  e  $\pm 140 \mu\text{m}$ , respectivamente) e o DDA, fármaco anfílico, apresenta compatibilidade com a membrana. Resultado semelhante na comparação entre membranas de acetato de celulose e polissulfona foram obtidos no estudo de Bemvindo (2006) que não encontrou diferenças para as duas membranas em testes com cremes de nitrato de miconazol.

Estudos como este são importantes para caracterizar o desempenho de cada classe de medicamentos perante às especificidades, como a escolha da membrana, do ensaio de liberação.

## 6 CONCLUSÕES

Foram detectadas diferentes velocidades de liberação para os genéricos A, B, C e D, sendo somente o B considerado semelhante ao medicamento referência.

A velocidade de liberação *in vitro* dos medicamentos analisados, empregando-se as membranas de polietersulfona e acetato de celulose, não apresentaram diferenças significantivas, sugerindo que estas membranas são intercambiáveis para análise desse produto.

O estudo reológico demonstrou que todas as formulações analisadas têm comportamento pseudoplástico, mas apresentam diferenças em sua viscosidade aparente. Não foi possível correlacionar a viscosidade com a velocidade de liberação, pois a difusão mostrou ser dependente de um conjunto de fatores.

Há uma tendência de diminuição da velocidade de liberação *in vitro* com a diminuição do tamanho de gotícula para os medicamentos analisados. A natureza anfifílica do DDA pode ter promovido interações com a interface das gotículas nas emulsões, dificultando sua difusão do veículo.

As diferenças nos fluxos podem ser atribuídas aos diversos componentes do veículo. Os resultados encontrados neste estudo reforçam o impacto que os excipientes têm no desempenho de um produto de aplicação tópica. Porém, o teste de liberação *in vitro* apenas fornece um indício do desempenho da formulação.

A possível exigência de uso desta ferramenta pela legislação brasileira, como indicador da equivalência de formas farmacêuticas semissólidas deve ser acompanhada de critérios mais exigentes quanto à composição tanto qualitativa como quantitativa dos excipientes dos candidatos à genérico.

## 7 REFERÊNCIAS

AKOMEAH, F. K.; MARTIN, G. P.; BROWN, M. B. Variability in Human Skin Permeability *In vitro*: Comparing Penetrants with Different Physicochemical Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 4, p. 824-834. April 2007.

ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8° ed, Porto Alegre: Artmed, 2007.

ALVES, M. P. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de bases dermatológicas. Influência de promotores de absorção na permeação transdérmica de piroxicam**. 1996. 148p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. UFSM, Santa Maria.

ANTONIO, M. E. C. O. **Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas**. 2007. 147p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. UFPR, Curitiba.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BANEGAR-JALALI, M.; RICHARDS, J. H. The effect of suspending agents on the release of aspirin from aqueous suspensions *in vitro*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 2, p. 195, 1979.

BARRY, B. W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**. New York: Marcel Dekker, 1983.

BARRY, B. W. Reflections on transdermal drug delivery. **Pharmaceutical Science & Technology Today**. v. 2, n. 2, p. 41-43, 1999.

BARRY, B. W. Liberação transdérmica de fármacos. In: AULTON M. E., **Delineamento de formas farmacêuticas**. Segunda edição. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 504-536.

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.

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

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 897. Determina a publicação do "Guia para Isenção e Substituição de Estudos de Bioequivalência". **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, de 29 de maio 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, de 29 de maio de 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 2004.

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. Resolução RDC nº 48, de 6 de outubro de 2009. Dispõe sobre realização de alteração, inclusão, suspensão, reativação, e cancelamento pós-registro de medicamentos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, de 7 de outubro 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira, 5ª ed. Brasília, Anvisa: 546 p., volume 1, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista "A" de Medicamentos de Referência. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c090d580474591ac999fdd3fbc4c6735/lista+11-05-2012+LISTA+DE+MED+REFER%C3%80NCIA1\\_a.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c090d580474591ac999fdd3fbc4c6735/lista+11-05-2012+LISTA+DE+MED+REFER%C3%80NCIA1_a.pdf?MOD=AJPERES). Atualizada em 11/05/2012. Acesso em: 16 de maio de 2012.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Stationery Office, 2008.

BRONAUGH, R. L.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology**. 4<sup>a</sup> edição. Boca Raton: Taylor e Francis Group, 2005.

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 periodontal disease: *In vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **Journal Pharmaceutical Sciences**, 2007.

CATAFLAM EMULGEL/diclofenaco dietilamônio: gel tópico. Responsável técnico: Marco A. J. Siqueira. Taboão da Serra: Novartis Biociências, 2010. 1 bula de remédio.

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. IV (1), p.52-60, 2007.

CLÉMENT, P.; LAUGEL, C.; MARTY, J. P. *In vitro* release of caffeine from concentrated W:O emulsions: effect of formulation parameters. **International Journal of Pharmaceutics** v. 207, p. 7–20, 2000.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JÚNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, jan./mar., 2005.

CORBO, M.; SCHULTZ, T. W.; WONG, G. K.; VAN BUSKIRK, A. Development and Validation of *in vitro* release testing methods for semisolid formulations. **Pharmaceutical Technology**, v. 19, n. 9, p. 112-128, 1993.

DA SILVA, G. R.; LAGES, G. P.; PIANETTI, G. A.; NUNAN, E. A.; SOARES, C. D. V.; CAMPOS, L. M. M. Determinação de lamivudina, estavudina e nevirapina, em comprimidos, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1159-1163, 2006.

DI COLO, G.; CARELLI, V., GIANNACCINI, B., SERAFINI, M.F.; BOTTARI, F., Vehicle effects in percutaneous absorption: *in vitro* study of influence of solvent power and microscopic viscosity of vehicle on benzocaine release from suspension hydrogels. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, p. 387, 1980.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M. *In vitro* release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 73-79, 2005.

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.** U.S. Department of Health and Human Services - Food and Drug Administration. Rockville, 1997.

FDA. **Guidance for Industry: Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs – *in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release, and associated studies.** U.S. Department of Health and Human Services - Food and Drug Administration. Rockville, 1998.

FERRANTE, M.; ANDREETA, A.; LANDONI, M. F. Effect of different penetration enhancers on diclofenac permeation across horse skin. **The Veterinary Journal**, p. 1-4, 2009.

FLORENCE, A.T., ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia.** 3. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, jul./set., 2005.

FRANGE, R. C. C.; GARCIA, M. T. J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 263-271, 2009.

GALER, B. S.; ROWBOTHAM, M.; PERANDER, J.; DEVERS, A.; FRIEDMAN E. Topical diclofenac patch relieves minor sports injury pain: Results of a multicenter controlled clinical trial. **Journal of Pain and Symptom Management**, New York, v. 19, n. 4, p. 287-294, April 2000.

GARRETT, E. R.; CHEMBURKAR, P. B. Evaluation, control, and prediction of drug diffusion through polymeric membranes II. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p. 949, 1968.

GUY, R. H.; GUY, A. H.; MAIBACH, H. I.; SHAH, V. P. The bioavailability of dermatological and other topically administered drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 253-262, 1986.

GUY, R. H.; HADGRAFT, J. On the determination of drug release rates from topical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 60, p. R1-R3, 1990.

HADGRAFT, J.; DU PLESSIS, J.; GOOSEN, C. The choice of non-steroidal anti-inflammatory agents for dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 207, p. 31–37, 2000.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1–18, 2001.

HANSON RESEARCH CORPORATION. Manual da célula. Disponível em: <<http://www.hansonresearch.com/>>. Acesso em 02/01/2012.

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.

INSEL, P. A. Fármacos analgésico-antipiréticos e antiinflamatórios e medicamentos usados no tratamento da gota. In: GOODMAN & GILMAN: **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, Cap.27, 1996, p.450-465.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 81-96, 2008.

KHULLAR, R.; KUMAR, D.; SETH, N.; SAINI, S. Formulation and evaluation of mefenamic acid emulgel for topical delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 20, p. 63-67, 2012.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário terapêutico Guanabara**. Edição 2007/2008. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

KRIWET, K.; MUELLER-GOYMANN, C. C. Binary diclofenac diethylamine–water systems: micelles, vesicles and lyotropic liquid crystals. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 39, p. 234–238, 1993.

KRIWET, K.; MUELLER-GOYMANN, C. C. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, p. 231–242, 1995.

LIRA, A. A. M. **Estudo de Permeação *in vitro* e avaliação térmica de emulgel tópico a base de lapachol**. 2003. 81p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. UFPE, Recife.

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

MARTINS, M. R.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MCCLEMENTS, D. J.; COUPLAND, J. N. Theory of droplet size distribution measurements in emulsions using ultrasonic spectroscopy. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 117, p. 161-170, 1996.

METHROM. **Determinação de água por titulação Karl Fischer**. Monografia do equipamento. Disponível em: [http://www.metrohm.hu/DownloadDocs/mono\\_8\\_026\\_5013.pdf](http://www.metrohm.hu/DownloadDocs/mono_8_026_5013.pdf). Acessado em: 10/09/2011.

MICHAELS, A. S., CHANDRASEKARAN, S. K., SHAW, J. E. Drug permeation through human skin: theory and *in vitro* experimental measurement. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 21, p. 985-96, 1975.

MOHAMED, M.I. Optimization of chlorphenesin emulgel formulation. **AAPS Journal**. v. 6, n. 3, 2004.

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.

NISHIHATA, T.; KAMADA, A.; SAKAI, K.; TAKAHASHI, K.; MATSUMOTO, K.; SHINOZAKI, K.; TABATA, Y.; KEIGAMI, M.; MIYAGI, T.; TATSUMI, N. Percutaneous absorption of diclofenac in rats and humans: aqueous gel formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 46, p.1-7, 1988.

OLIVEIRA, A. G. **Caracterização da Distribuição do Tamanho de Gotas em Emulsões Água e Óleo Utilizando Diferentes Técnicas de Medição**. 2010. 144p. Dissertação (Mestrado). Instituto de engenharia Mecânica, Universidade Federal de Itajubá, Minas Gerais.

OSTRENGA J, STEINMETZ C, POULSEN B. Significance of vehicle composition. I. Relationship between topical vehicle composition, skin penetrability and clinical efficacy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 1175–1179, 1971.

PRAÇA, F. S. G. **Liberção e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais**. 2010. 44p. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. USP, São Paulo.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. **Tecnologia Farmacêutica**, 6ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, volume 1, 2003.

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

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. Tradução de: SANTOS, Raimundo Rodrigues e outros. Sexta edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RICCI, E. J.; BENTLEY, M. V. L. B.; FARAH, M.; BRETAS, R. E. S.; MARCHETTI, J. M. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.17, p.161–167, 2002.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6ª edição, London/Chicago: Pharmaceutical Press e American Pharmacists Association, 2009.

RUBIO, L.; ALONSO, C.; RODRÍGUEZ, G.; BARBOSA-BARROS, L.; CODERCH, L.; DE LA MAZA, A.; PARRA, J. L.; LÓPEZ, O. Bicellar systems for *in vitro* percutaneous absorption of diclofenac. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, p. 108-113, 2010.

RUELA, A. L. M., ARAÚJO, M. B., PEREIRA, G. R., Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação *in vitro*. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p.165-168, 2009.

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.

SHAH, V. P.; FLYNN, G. L.; GUY, R. H.; MAIBACH, H. I., W. I.; SCHAEFER, H.; SKELLY, J. P.; WESTER, R. C.; YACOBI, A. *In vivo* percutaneous penetration/absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 74, p. 1-8, 1991.

SHAH, V. P.; BEHL, C. R.; FLYNN, G. L.; HIGUCHI, W. I.; SCHAEFER, H. Principles and Criteria in the Development and Optimization of Topical Therapeutic Products. **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 8, p. 1107-1112, 1992.

SHAH, V. P.; ELKINS, J. S.; WILLIAMS, R. L. *In vitro* drug release measurement for topical glucocorticoid creams. **Pharmacoepial Forum**, v. 19, n. 2, p. 5048-5060, 1993.

SHAH, V. P.; ELKINS, 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.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of the Test system Used for *In vitro* Release of Drugs for Topical Dermatological Drug products. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 4, n. 3, p. 377-385, 1999.

SHAH, V. P.; ELKINS, J. S.; SHAW, S.; HANSON, R. *In vitro* release: Comparative evaluation of vertical diffusion cell system and automated procedure. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 8, n. 1, p. 97-102, 2003.

SHAH, V. P. *In vitro* Release from Semisolid Dosage Forms. In: BRONAUGH R. L., MAIBACH H. I. **Percutaneous absorption**. Boca Raton, 2005. p. 473-480.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN C. K.; SHAH, V. P. FIP/AAPS Guidelines to Dissolution/*in vitro* Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n. 1, p. 1-10, artigo 7, 2003.

SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. C.; LIRA, A. A. M.; EGITO, E. S. T. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.

SILVA, J. A.; BEDOR, D. C. G.; SOUSA, C. E. M.; SANTANA, D. P.; EGITO, E. S. T. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de diclofenaco

dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 1, p. 41-46, 2010.

SILVA, P. **Farmacologia**. Sétima Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

TAKAHASHI, K.; SUZUKI, T.; SAKANO, H.; MIZUNO, N. Effect of vehicles on diclofenac permeation across excised rat skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, p. 571–575, 1995.

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.

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 semi-sólidas de cetoconazol. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 67, n. 4, Lisboa, 1997.

UEDA, C.T.; SHAH, V.P.; DERDZINSKI, K.; EWING, G.; FLYNN, G.; MAIBACH, H.; MARQUES, M.; RYTTING, H.; SHAW, S.; THAKKER, K.; YACOBI, A. Topical and Transdermal Drug Products. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. **Pharmacopeial Forum**, v. 35, p. 750–764, 2009.

URSICA, L.; TITA, D.; PALICI, I.; TITA, B.; VLAIA, V. Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 931-936, 2005.

USP 33. **THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA**, 33<sup>a</sup> ed., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010.

VASILJEVIC, D.; PAROJCIC, J.; PRIMORAC, M.; VULETA, G. An investigation into the characteristics and drug release properties of multiple W/O/W emulsion systems containing low concentration of lipophilic polymeric emulsifier. **International Journal of Pharmaceutics** v. 309, p.171–177, 2006.

VAUTIER-GIONGO, C. T.; PASTORE, H. O. Estimativa do potencial zeta de micelas iônicas através de medidas de viscosidade, 23a. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, v. 1, p. 4-4, Poços de Caldas, MG, BRASIL, 2000. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0496-2/index.html>> Acesso em 01/03/2012.

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. **Journal of Controlled 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 pigskin I. Methyl salicylate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 35. p. 91-102, 1987a

WALKOW, J. C.; MCGINITY, J. W. The effect of physicochemical properties on the *in vitro* diffusion of drug through synthetic membranes and pigskin. II. Salicylic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 35. p. 103-109, 1987b

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 603-618, 2004.

WHITWORTH, C. W.; ELSABBAGH, H. M. Effect of high liquid concentrations and viscosity on the *in vitro* diffusion of salicylic acid and sodium salicylate from ointment bases. **Canadian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 77, 1978.

WOOD, J. H. Reologia Farmacêutica in LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. v. 1, Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. p. 211 – 224.

ZATZ, J. L. Drug release from semisolids: Effect of membrane permeability on sensitivity to product parameters. **Pharmaceutical Research**, 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.