DELFIM FERNANDO GONÇALVES DOS SANTOS

ABSORÇÃO PERCUTÂNEA

-geles de carbopol contendo fentiazac-

Faculdade de Farmácia do Porto

PORTO
1995

DELFIM FERNANDO GONÇALVES DOS SANTOS

Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

ABSORÇÃO PERCUTÂNEA

-geles de carbopol contendo fentiazac-

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
Prof. Doutor Nogueira Prista

Faculdade de Farmácia do Porto

PORTO

1995

Aos Meus Pais

À Minha Mulher

À Minha Filha

Aos Professores

Luís Vasco Nogueira Prista
Rui Manuel Ramos Morgado

Em 1990 fui encorajado pelo Prof. Doutor Luís Vasco Nogueira Prista a desenvolver um projecto de trabalho experimental que veio a conduzir à presente tese de dissertação de doutoramento.

Não me é possível agradecer ao Prof. Doutor Nogueira Prista sem prestar igualmente o preito da minha gratidão ao Prof Doutor Rui Manuel Ramos Morgado. A eles devo tudo o que de bom possa ter conseguido realizar na minha carreira profissional. No entanto gostaria de deixar bem vincado que, por maior que tenha sido a ajuda que me deram nesse domínio, e esta foi realmente inexcedível, o meu maior reconhecimento vai para a amizade que me dispensaram. A eles devo ensinamentos que influenciaram profundamente o que de mais importante alicerça a minha carreira universitária.

Nos 10 anos de actividade que desenvolvi no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, tive a sorte excepcional de encontrar como companheiros de trabalho pessoas, que não obstante evidenciarem sensibilidades diferentes, posso seguramente afirmar que estão entre aquelas que considero como sendo meus amigos.

A partir do momento que manifestei as minhas preocupações profissionais à Prof. Doutora Maria Fernanda Bahia e ao Prof. Doutor José Manuel de Sousa Lobo deparei sempre com uma atitude de total compreensão e apoio por parte destes professores. Esta atitude manteve-se inalterável porque nunca deixaram de se inteirar regularmente àcerca da evolução do meu trabalho.

À Prof. Fernanda Bahia quero manifestar o meu profundo reconhecimento, pela atenção que me dispensou e pelos conselhos oportunos e inteligentes que me transmitiu, numa demonstração plena de solidariedade e espírito científico verdadeiramente notável.

Ao Prof. Sousa Lobo agradeço a sua amizade, as sugestões inteligentes e a dedicação preciosa que me dispensou, contribuindo de forma decisiva para a conclusão deste trabalho.

Gostaria de salientar o meu agradecimento ao Dr. Edmundo Caldas Vilar, o amigo de sempre e de todos os dias, com quem trabalhei e que tanto me ajudou no trabalho experimental, especialmente na fase de pré-formulação. Recordo os dias de trabalho no Labortório e as longas conversas que tivemos e mantemos e que são para mim fontes de enriquecimento humano.

Ao amigo e colega Prof. Doutor Domingos Ferreira agradeço as palavras de confiança e estímulo bem como a amizade e lealdade que sempre manifestou.

Ao meu colega e amigo Dr. Carlos Maurício agradeço a sua compreensão e amizade que sempre me dispensou.

À Sra. Dra. Alda Albuquerque de Pinho agradeço o carinho e as palavras sinceras de incentivo que me dirigia frequentemente.

Aos colegas Dr. Paulo Lobão e Dr. Paulo Costa o meu reconhecimento e em especial a este último pela sua contribuição na composição gráfica desta dissertação.

Ao Laboratório de Toxicologia na pessoa da sua responsável Prof. Doutora Maria de Lourdes Bastos e da sua colaboradora Engª. Maria Elisa Soares quero expressar o meu reconhecimento pela disponibilidade e espírito de cooperação demonstrados no desenvolvimento da técnica de doseamento do fentiazac por HPLC.

À colega e amiga Dra. Luisa Peixe o meu agradecimento pela disponibilidade e simpatia que sempre me manifestou, traduzidas não só pelas palavras de incentivo que me dirigia mas também pelo seu contributo na realização dos ensaio "in vivo".

À minha querida amiga Dra. Rosa Pena Ferreira o meu profundo reconhecimento pelo estímulo, apoio e colaboração na execução gráfica definitiva da dissertação.

Ao Prof. Doutor José António Silva agradeço reconhecidamente o auxílio que me concedeu execução dos ensaios reológicos levados a cabo na Escola Superior de Biotecnologia.

Ao Dr. António Paiva agradeço a sua colaboração e amabilidade por ter autorizado a cedência de alguns fragmentos de pele humana para realização dos ensaios "in vitro".

Aos amigos Dr. José Augusto Silveira, Dr. Agostinho Franklin e Dr. Agostinho Almiro, o meu sincero reconhecimento pela amizade e disponibilidade que sempre me manifestaram.

Ao meu amigo Dr. Edvaldo Santos o meu sincero obrigado por toda a colaboração prestada.

Ao Sr. Engº. Rui Pinto o meu agradecimento pela preciosa ajuda e colaboração que me concedeu.

Às Sras. D. Adelina Fiel, D. Clara Soares, aos Srs. João Parente, Joaquim Ribeiro e Basílio Costa, manifesto o meu agradecimento, porque graças ao desempenho correcto das suas funções, tornaram mais fácil e mais agradável a realização deste trabalho que efectuei no Laboratório de Tecnologia.

Aos voluntários que permitiram a realização dos ensaios "in vivo", bem como à Dra. Maria Palmira Martins pelo auxílio prestado durante a realização dos mesmos, o meu muito obrigado.

Ao Instituto Pasteur de Lisboa, agradeço a cedência do fentiazac utilizado na execução deste trabalho.

Aos Laboratórios Bial, agradeço a consulta bibliográfica gratuita ao banco de dados Dialog.

A todos os que contribuiram de algum modo para a realização deste trabalho o meu muito obrigado.

Para finalizar não podia deixar de testemunhar a minha profunda gratidão àqueles que, de forma mais importante, tornaram possível a realização deste trabalho: aos meus pais, à minha mulher e à minha filha. A eles dedico esta dissertação.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, agradeço o apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho, que constitui uma das linhas de acção de investigação do Centro de Tecnologia do Medicamento o qual se encontra integrado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia do Porto.

RESUMO

A utilização de preparações tópicas para aplicação na pele reveste-se de grande importância para a absorção de princípios activos, nomeadamente de acção anti-inflamatória.

Nesta perspectiva, desenvolvemos este trabalho experimental visando os seguintes aspectos:

1 - Preparação de veiculos gelificados à base de Carbopol nos quais foi incorporado um anti-inflamatório não esteróide - o fentiazac.

Estudo de difusão "in vitro" com 8 preparações por forma a avaliar qual delas evidenciava maior nível de cedência do fentiazac.

2 - Controlo e verificação da estabilidade e comportamento reológico da formulação que apresentou melhores condições.

Efectuaram-se ensaios de escoamento e de análise viscoelástica, procurando relacionar estes parâmetros com a estabilidade e a cedência do fentiazac, em função do tempo e temperatura de armazenagem.

3 - Ensaios de cedência "in vitro" usando pele humana e ensaios de absorção "in vivo" com humanos voluntários.

4 -Avaliação "in vitro" do efeito promotor de absorção de um solvente (Dimetilformamida) e de dois tensioactivos (Laurilsulfato de sódio e Tween 80) adicionados ao gele de Carbopol contendo fentiazac, utilizando membranas epidérmicas artificiais (SARTORIUS) e pele depilada de cobaio.

ABSTRACT

The absorption of certain active substances - namely those with anti-inflamatory activity - is important when using topical preparations for application on the skin.

In view of this, we have developed the following experimental proceedings, which overlook the following aspects:

1 - Preparation of a carbopol based, gelified vehicle, in which a non-esteroidical anti--inflamatory drug - fentiazac - was incorporated into.

"In vitro" diffusion assays with eight different preparations, so as to evaluate which preparation showed the highest degree of release of fentiazac.

2 - The control and verification of the stability and reological behaviour of the formulation, that had previously shown the best performances.

Flow assays and viscoelastic analysis assays were performed, looking to relate the parameters with the stability and the release of fentiazac, in function of time and temperature of storage.

3 - "In vitro" drug release assays, using human corpse skin and "in vivo" absorption assays with voluntary humans.

4 -"in vitro" evaluation of the enhancer effect of a solvent (Dimethylformamide) and two surfactants (Sodium-lauryl sulfate and Tween 80), added to the Carbopol gel containing fentiazac. Artificial epidermic membranes (SARTORIUS) and hairless guinea-pig skins were used for the assays.

RESUMÉ

L´usage de préparations topiques appliquées dans la peau est trés importante pour l´absorption de principes actifs, nottament les anti-inflammatoires.

Ainsi, les buts du travail que nos avons developpé sont les suivants:

1- Préparation de formulations gelifieés de Carbopol contenant un anti--inflammatoire non-stéroidique, le fentiazac.

Étude de la diffusion "in vitro" de 8 préparations, pour choisir la formule présentant la plus grande vitesse de libération.

2- Contrôle et vérification de la stabilité et des proprietés rhéologiques de la préparation choisie.

On a effectué aussi des assais d´écoulement et d´analyse viscoélastique, pour établir des relations entre ces proprietés et la stabilité et libération du fentiazac, en function de temps et de la température de stockage.

3- Évaluation de la libération "in vitro", en utilizant de la peau humaine, et de l´absortion "in vivo", avec des humains.

4- Évaluation "in vitro" de l´effet promoteur de l´absortion d´un solvent (Diméthylformamide) et de deux tensioactifs (Laurylsulfate sodique et Tween 80) ajoutés à la gelée de Carbopol contenant le fentiazac. Les essais ont été effectués avec des membranes epidermiques artificielles (SARTORIUS) et avec de la peau epilée de cobaye.

ÍNDICE

Pág.

I - INTRODUÇÃO 1

1. A PELE HUMANA 1

1.1. Morfologia e Histologia 1

1.2. Bioquímica 2

1.2.1. Hidratos de carbono 2

1.2.2. Lípidos 3

1.2.3. Proteínas 4

1.3. Funções da Pele 6

2. PENETRAÇÃO CUTÂNEA 9

2.1. Importância da administração cutânea 9

2.2. Vias e mecanismos de penetração cutânea 9

2.2.1. Via transepidérmica 11

2.2.2. Via anexial 12

2.2.3. O "reservatório epidérmico" 13

2.3. Factores que influenciam a Absorção Percutânea 14

2.3.1. Conceitos físicos sobre difusão 14

2.3.2. Determinantes moleculares da absorção 15

2.3.2.1. Coeficiente de permeabilidade, coeficiente de difusão e coeficiente de partilha 15

2.3.2.2. Volume molecular 19

2.3.2.3. Substâncias ionizáveis 20

2.3.2.4. Ligação à pele 21

2.3.3. Leis de Fick 23

2.3.4. Não aplicabilidade da lei de Fick 27

2.3.5. Factores biológicos 28

2.3.5.1. Integridade do estrato córneo 29

2.3.5.2. Hidratação cutânea..... 30
2.3.5.3. Fluxo sanguíneo cutâneo..... 31
2.3.5.4. Lípidos cutâneos..... 33
2.3.5.5. Biotransformação cutânea..... 34
2.3.6. Idade, estado da pele e região anatómica..... 34
2.4. Promotores de absorção..... 38
2.4.1 Mecanismos de acção..... 38
2.4.2. Substâncias com reconhecida capacidade para promover a absorção dos fármacos..... 39
2.4.2.1. Sufóxidos e compostos similares..... 39
2.4.2.2. Pirrolidonas..... 43
2.4.2.3. Ácidos gordos, álcoois e glicóis..... 44
2.4.2.4. Azona e derivados..... 45
2.4.2.5. Ureia..... 47
2.4.2.6. Tensioactivos..... 49
2.4.2.7. Ésteres e amidas do ácido clofíbrico..... 51
2.4.3. Meios físicos..... 52
2.4.4. Conclusão..... 53

II - PARTE EXPERIMENTAL..... 54
1. INTRODUÇÃO..... 54
1.1. Fentiazac..... 55
1.2. Carbopol..... 56
2. FORMULAÇÃO..... 57
2.1. Objectivo..... 57
2.2. Preparações das formulações..... 58
3. ENSAIOS DE DIFUSÃO..... 60
3.1. Estudo da cedência da fentiazac "in vitro"..... 60

3.2. Material e métodos 61
3.2.1 Aparelhagem 61
3.2.2 Reagentes 61
3.2.3 Membranas epidérmicas artificius (SARTORIOS)" 61
3.2.3.1. Preparacão das membranas 61
3.2.4. Processo analítico 63
3.3. Discussão de resultados 70
3.4. Conclusão 73
4. VERIFICAÇÃO DO GELE DE FENTIAZAC (F8) 74
4.1. Aspectos sensoriais 74
4.2. pH 74
4.3. Teor em água 75
4.4. Controlo microbiológico 75
4.4.1. Técnica 76
4.4.1.1. Aparelhagem e material necessário 76
4.4.1.2. Preparação da amostra 77
4.5. Identificação e doseamento do fentiazac no gele 78
4.5.1 Identificação 78
4.5.2. Doseamento espectrofotométrico 78
4.6. Resultados e conclusões 80
5. REOLOGIA 82
5.1. Sistemas não newtonianos 83
5.2. Viscoelasticidade 86
5.3. Alterações reológicas com o tempo e temperatura e temperatura de § armazenagem 91
5.4. Análise reológica do gele de fentiazac 91
5.4.1. Aparelhagem utilizada 92
5.4.2. Ensaios de escoamento 93

5.4.3. Ensaios viscoelásticos 98
5.4.3.1. *Móduli* G´ e G´´ 98
5.4.3.1.1. Influência da temperatura e do tempo de armazenagem... 98
5.4.3.2. Fluência (*Creep-compliance*) 103
5.4.3.2.1. Influência da temperatura e do tempo de armazenagem 103
5.5. Discussão de resultados e conclusões 107
6. ESTABILIDADE 108
6.1. Cedência do fentiazac veiculado no gele de Carbopol. Influência da temperatura e tempo de armazenagem 108
6.1.1. Ensaio "in vitro" 108
6.1.2. Resultados e discussão 109
6.1.3. Conclusão 113
7. ENSAIOS "in vitro" E "in vivo" 114
7.1. Difusão "in vitro" do fentiazac através de pele humana de individuos com diferentes idades. - Efeito da congelação 114
7.1.1. Material e métodos 115
7.1.1.1. Aparelhagem 115
7.1.1.2. Reagentes 115
7.1.1.3. Obtenção e preparação da pele 115
7.1.1.4. Ensaio de difusão 116
7.1.1.5. Doseamento 116
7.1.2. Resultados e discussão 118
7.2. Absorção "in vivo" 119
7.2.1. Material e métodos 119
7.2.2. Processo analítico 119
7.2.3. Discussão de resultados 126

8. EFEITO PROMOTOR 128

8.1. Influência da Dimetilformamida (DMF), Laurilsulfato de sódio (LsS) e do Tween 80 (T80) 128

8.1.1. Ensaio com membranas epidérmicas artificiais (Sartorius) 129

8.1.1.1. Material e métodos 129

8.1.1.2. Resultados e Discussão 134

8.1.1.3. Conclusões 135

8.1.2. Ensaio com pele depilada de cobaio 136

8.1.2.1. Material e métodos 136

8.1.2.1.1. Aparelhagem 136

8.1.2.1.2. Doseamento 136

8.1.2.2. Discussão de resultados 142

8.1.2.3. Conclusões 144

III - BIBLIOGRAFIA

I - INTRODUÇÃO

1. A PELE HUMANA

2. PENETRAÇÃO CUTÂNEA

I - INTRODUÇÃO

1. A PELE HUMANA

A pele possui características específicas que permitem diferenciar a raça, o sexo e a identidade dos índividuos. Basta recordar que não há duas impressões digitais idênticas.

É um orgão dotado de elevada resistência e flexibilidade, apresentando uma apreciável permeabilidade selectiva e uma notável possibilidade para se autorreparar. Para além destes atributos, possui igualmente uma extraordinária capacidade sensorial e imunológica, desempenhando funções relevantes na conservação da homeostasia ao assegurar a regulação hemodinâmica e a termorregulação corporal. Como resultado destas especializações funcionais complexas, participa em numerosos mecanismos fisiológicos gerais, sendo justamente considerado o órgão de protecção do corpo humano.

1.1. Morfologia e Histologia

É constituída por duas camadas sobrepostas e intimamente unidas - a epiderme e a derme. Nesta organização estrutural, podemos ainda considerar uma zona subjacente à derme que é designada por hipoderme (fig.1).

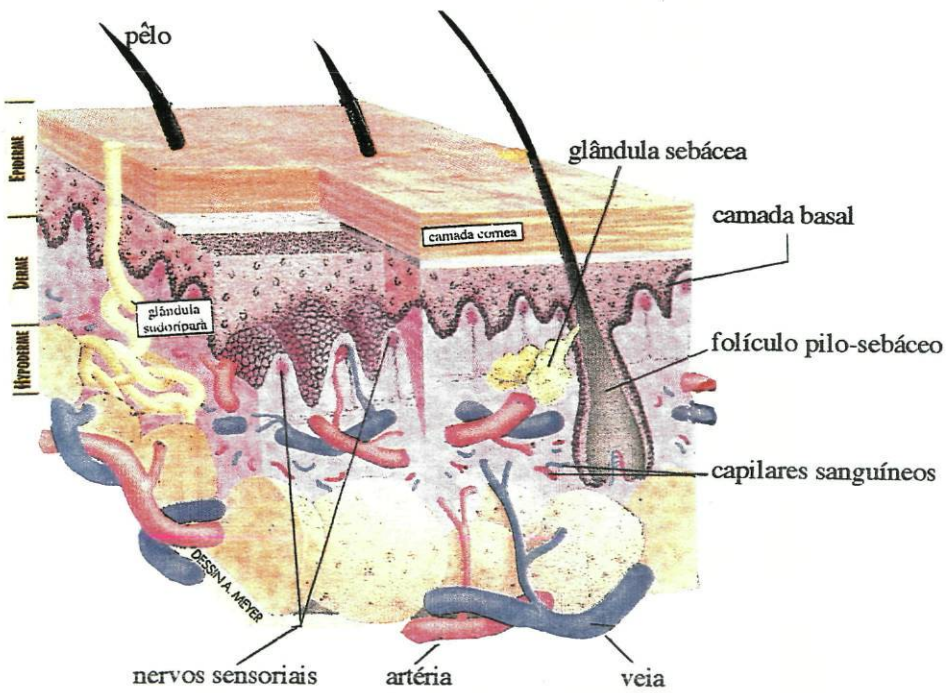


fig.1. Diagrama esquemático da microanatomia da pele

A epiderme e a derme funcionam de modo harmonioso. Contudo, verifica-se que a epiderme está em constante renovação pelo facto das células basais manterem a capacidade embrionária de multiplicação, enquanto a derme constitui a zona da pele mais estável porque é nessa zona que se encontram as estruturas mais especializadas. A hipoderme é fundamentalmente constituída por células adiposas, funcionando como reserva energética e também como uma espécie de almofada amortecedora entre a pele e os órgãos internos do corpo humano (1).

1.2. Bioquímica

Com a metodologia moderna, recorrendo a substâncias marcadas com radioisótopos, e através do conhecimento mais profundo da enzimologia na bioquímica humana, foi possível adquirir novos dados relativamente à bioquímica da pele. Com efeito, é sabido que neste órgão são produzidas numerosas substâncias verificando-se, ainda, a ocorrência de várias sínteses e processos de metabolização, bem como reacções de desintoxicação que garantem não só o bom funcionamento da pele, mas também a manutenção da sua integridade (2, 3).

A maioria das substâncias intervenientes nos processos metabólicos podem ser agrupadas em três grandes famílias de compostos: hidratos de carbono, lípidos e proteínas.

1.2.1. Hidratos de carbono

A detecção dos metabolitos cutâneos relacionados com os hidratos de carbono tem sido levada a efeito por métodos que envolvem o diagnóstico das enzimas intervenientes nos processos metabólicos. Como exemplo poderemos citar a presença na epiderme de glicogénio-sintetase, hexoquinase, glucose-6-fosfato desidrogenase, fosforilase, etc., enzimas que intervêm no metabolismo do glicogénio e da glucose. Estas substâncias são, como se sabe, utilizadas como fontes de energia (4).

Admite-se que a presença de ácido láctico, principal metabolito cutâneo da glucose, esteja relacionada com as fases anagénica e telogénica dos folículos pilosos e com a excreção do suor (5).

Os proteoglicanos (ácido hialurónico e sulfato de dermatano) constituem outros exemplos de substâncias biossintetizadas na pele (6).

A análise enzimática permite detectar ou confirmar determinado tipo de doenças cutâneas. Doentes com psoríase, por exemplo, apresentam níveis substancialmente elevados de glucose-6-fosfato desidrogenase e de 6-fosfogluconato, sem que se note alteração nas concentrações de fosfo-hexose isomerase e de aldose (7).

O glicogénio cutâneo, que em condições normais se encontra em estado dinâmico, pode depositar-se devido a modificações ou perda de actividade das enzimas, provocando o aparecimento de doenças como as de Pompe e de McArdle (8).

1.2.2. Lípidos

Os lípidos da superfície cutânea provêm das glândulas sebáceas e da epiderme. O esqualeno, determinados triglicerídeos e ésteres ceróticos são exemplos de lípidos que podem ser encontrados após extracção das glândulas sebáceas. Não é detectada, contudo, a presença de ácidos gordos livres, cujo aparecimento à superfície cutânea resulta possivelmente da hidrólise bacteriana do sebo (9,10).

A quantidade de colesterol, que tem origem na epiderme, é particularmente elevada na pele das crianças, ao contrário dos ésteres ceróticos e do esqualeno que surgem após a puberdade.

Os ácidos araquidónico, linoleico e eicosatetraenóico, que se encontram também na epiderme, desempenham um papel importante na conservação da barreira cutânea, estando provado que o primeiro se converte na pele em hidroxi-eicosatetraenóico e em prostaglandina E2 (11).

Na pele existem ainda álcoois gordos saturados e insaturados cujo comprimento das cadeias de carbono está compreendido entre C_{12} e C_{27} e esteróis livres e esterificados. Os esteróis chegaram a ser apontados como responsáveis pelo aparecimento do cancro cutâneo após exposição à luz UV. Actualmente admite-se como mais provável que a carcinogénese possa estar relacionada com a formação de peróxidos de esteróis e de radicais livres de peróxido.

O esqualeno é um hidrocarboneto triterpénico que intervem na composição dos produtos de excreção das glândulas sebáceas, facto que não se verifica nos produtos de excreção das glândulas sebáceas dos restantes mamíferos (12).

1.2.3. Proteínas

Não obstante o reconhecido avanço da ciência proporcionado pelas novas tecnologias, continuam a subsistir dúvidas quanto à provável existência da biossíntese proteica na epiderme. No entanto, através de experiências efectuadas com ^{14}C e ^{3}H-timidina, foi possível encontrar nas células da epiderme humana o ácido ribonucleico (RNA) e o ácido desoxirribonucleico (DNA).O primeiro destes compostos é necessário para a realização da biossíntese proteica e o segundo intervem na organização do código genético (13).

Admite-se que as proteínas fibrosas (colagénio, ceratina e elastina) sejam produzidas nos complexos polirribossómicos e que determinadas hormonas e corticosteróides intervêm na regulação da sua síntese. A confirmar isso, temos o exemplo dos estrogéneos que inibem o catabolismo do colagénio e da cortisona que inibe a síntese e degradação daquele composto (14)

A melanina é produzida pelos melanócitos nas camadas mais profundas da epiderme e tem por objectivo proteger a pele das radiações solares. A biossíntese deste pigmento que, além de existir na pele também é detectado nos cabelos e na coróide ocular, processa-se mediante oxidação da tirosina pela acção da tirosinase. Esta enzima que se encontra nos melanóforos sob forma inibida, devido à acção do ácido ascórbico, do glutatião, ou simplesmente por efeito dos grupos sulfidrilo, é susceptível de ser activada pela exposição às radiações UV. Esta circunstância promove a reacção da tirosinase sobre a tirosina que, sendo oxidada, origina a dioxifenilalanina (DOPA), constituindo este o 1° passo da síntese da melanina. Fenómeno idêntico parece ocorrer quando há destruição dos grupos -SH em zonas da pele que apresentam lesões inflamatórias (15).

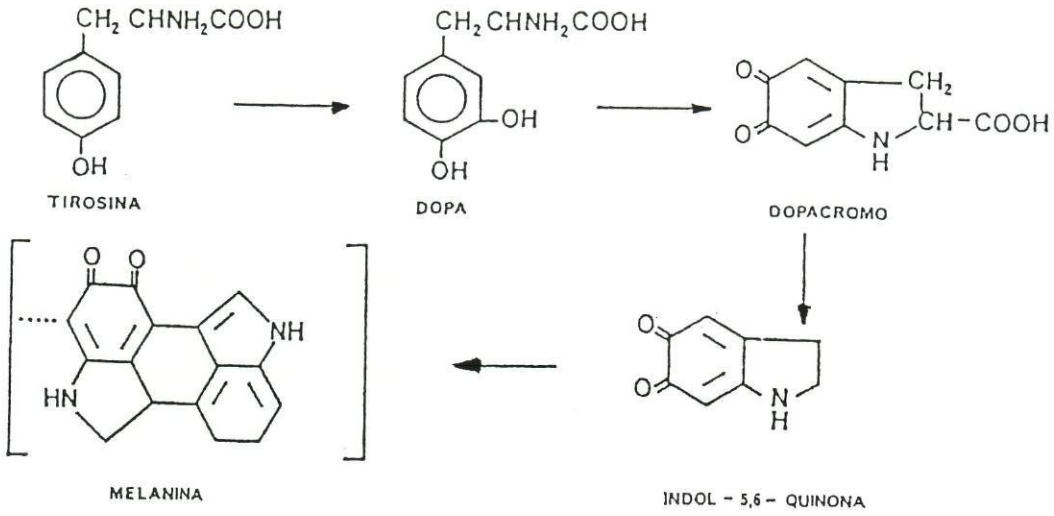


fig.2. Formação de melanina a partir de tirosina.

Durante o processo de biossíntese do ácido glutâmico a partir da histidina forma-se o ácido urocânico. Este composto, presente no suor, exerce acção de protecção cutânea contra as radiações solares.

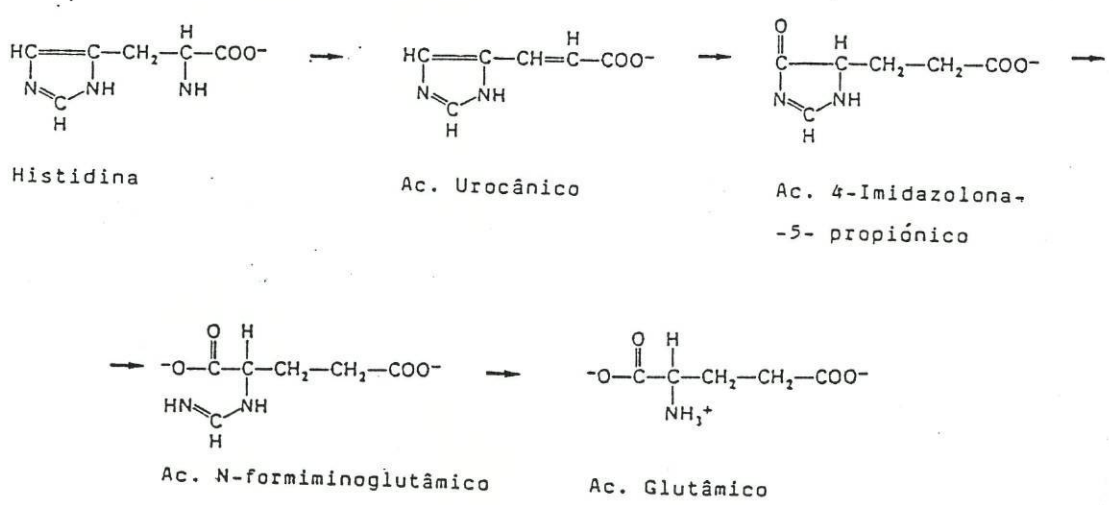


fig.3. Metabolismo da histidina

A histidina, através de um processo metabólico diferente do anterior, pode dar origem à histamina que é um vasodilatador segregado pelos mastócitos (16).

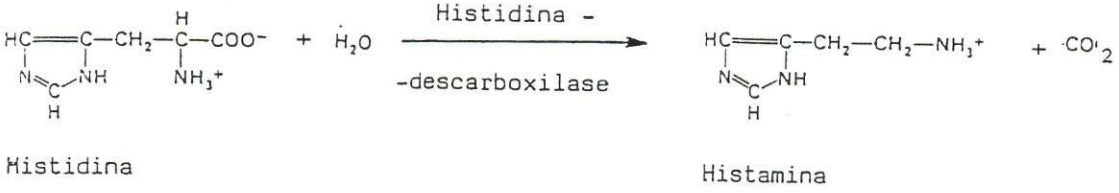


fig.4. Formação da histamina a partir da histidina.

1.3. Funções da Pele

Tal como dissemos inicialmente, a pele é um órgão que tem capacidade para desempenhar diversas funções. É difícil destacar alguma dessas funções porque todas são importantes e complementares. Apesar deste facto, pensamos que a protecção contra as agressões do meio externo deve merecer uma referência especial, dado que a pele é por excelência o orgão protector do corpo humano.

A função mecânica da pele está bem patente nas propriedades plásticas que possui e das quais resultam a resistência, a flexibilidade e a elasticidade. Essa resistência e flexibilidade são-lhe conferidas pelas fibras de colagénio e elastina que se encontram mergulhadas na substância fundamental da derme, permitindo que as distensões cutâneas não provoquem ruturas de pele, até limiares biofísicos próprios. Por seu turno, a elasticidade parece estar relacionada não só com a presença da elastina, mas sobretudo com o facto das forças aplicadas do exterior serem orientadas paralelamente ao eixo das fibras colagénias.

Outro factor importante relativo à plasticidade da pele deve-se à natureza da camada córnea da epiderme, a qual está dependente do correcto equilíbrio de lípidos à sua superfície, da presença de substâncias hidrossolúveis, das ceratinas e sobretudo da água, cuja concentração deverá estar compreendida entre 10 e 20% (17).

O principal obstáculo à entrada de substâncias químicas na pele é o estrato córneo que funciona como uma membrana muito pouco permeável, podendo mesmo considerar-se uma barreira química.

A resistência evidenciada por aquela região da epiderme implica que a penetração

cutânea de muitas substâncias se faça apenas pela via anexial, ou seja, através dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas. Fenómenos relacionados com a solubilidade, grau hídrico da pele, presença de compostos que favorecem a difusão, etc., justificam o diferente comportamento quanto à penetração, ainda que os estudos sobre esta matéria revelem que o factor primordial se prende com as características fisico-químicas das próprias substâncias (18).

O facto do estrato córneo ser uma estrutura apertada, que em condições de integridade apenas é permeável a nível molecular, constitui só por si um obstáculo à proliferação de bactérias e de fungos. A descamação permanente que se verifica à superfície daquela camada, associada aos processos de desinfecção e mais correntemente às lavagens, promove a remoção dos microrganismos impedindo o seu desenvolvimento.

Outro aspecto importante relaciona-se com as secreções sebáceas e o suor, na composição dos quais intervêm alguns ácidos gordos de cadeia curta (propanóico, butanóico, hexanóico e heptanóico) que, para além de evidenciarem uma efectiva acção bacteriostática e fungistática, diminuem o pH cutâneo e, consequentemente, as hipóteses de proliferação bacteriana (19).

O ácido láctico é um composto que estando presente na pele é responsável pelo abaixamento do pH da superfície cutânea. Deste facto resultou uma teoria apresentada em 1971 por Katz e Poulsen, designada por "manto ácido", complementada em 1974 por uma outra defendida por Nable e Somerville que afirmaram que o desenvolvimento microbiano depende não só do pH mas sobretudo do grau de humidade da pele, mais elevado nas regiões alcalinas do que nas ácidas (20).

Temos vindo a verificar que, efectivamente, a permeabilidade selectiva da pele constitui uma das principais características que confere a função protectora a este órgão. Relativamente às radiações, essa protecção é mais evidente perante as radiações que apresentam maior energia, ou seja, as de menor comprimento de onda. De acordo com a (Equação 1), a energia (E) é tanto maior quanto mais baixo for o comprimento de onda das radiações (l), em que (h) representa a constante de Planck e o quociente (C/l) corresponde à frequência (n) da radiação; (C) é a velocidade da luz.

$$\mathbf{E=h.C/l} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

As proteínas da pele em geral, e principalmente a melanina, são responsáveis pela absorção das radiações com comprimentos de onda próximos de 280 nm. Assim, poderemos afirmar que a distribuição melânica na pele além de contribuir para a diferenciação racial, participa igualmente no mecanismo de protecção contra as agressões das radiações que provocam eritemas cutâneos (21).

A pele desempenha ainda um papel importante na termorregulação corporal. Esta função é devida à contribuição do complexo sistema circulatório, cuja actuação consiste, fundamentalmente, nos mecanismos de vasoconstrição e de vasodilatação periféricos. Assinale-se, entretanto, que a função termorreguladora da pele é válida dentro de determinados limites de variação térmica (frio ou calor) que quando ultrapassados poderão ocasionar danos por vezes irreparáveis (22).

Apesar da espécie humana ser de todas a que apresenta o sistema piloso menos desenvolvido, não podemos esquecer as funções sensoriais e de protecção exercidas por esse sistema, com particular evidência nas regiões pilosas hormono-dependentes.

2. PENETRAÇÃO CUTÂNEA

2.1. Importância da administração cutânea

A administração cutânea tem por objectivo fundamental proporcionar uma acção tópica através da penetração mais ou menos profunda dos princípios activos.

Apesar de não constituir uma via de administração por excelência no que concerne a uma verdadeira absorção medicamentosa, nem por isso deixa de ser utilizada mesmo em terapêutica sistémica quando, por exemplo, os fármacos se alteram na passagem pelo tracto gastrintestinal ou são captados pelo fígado.

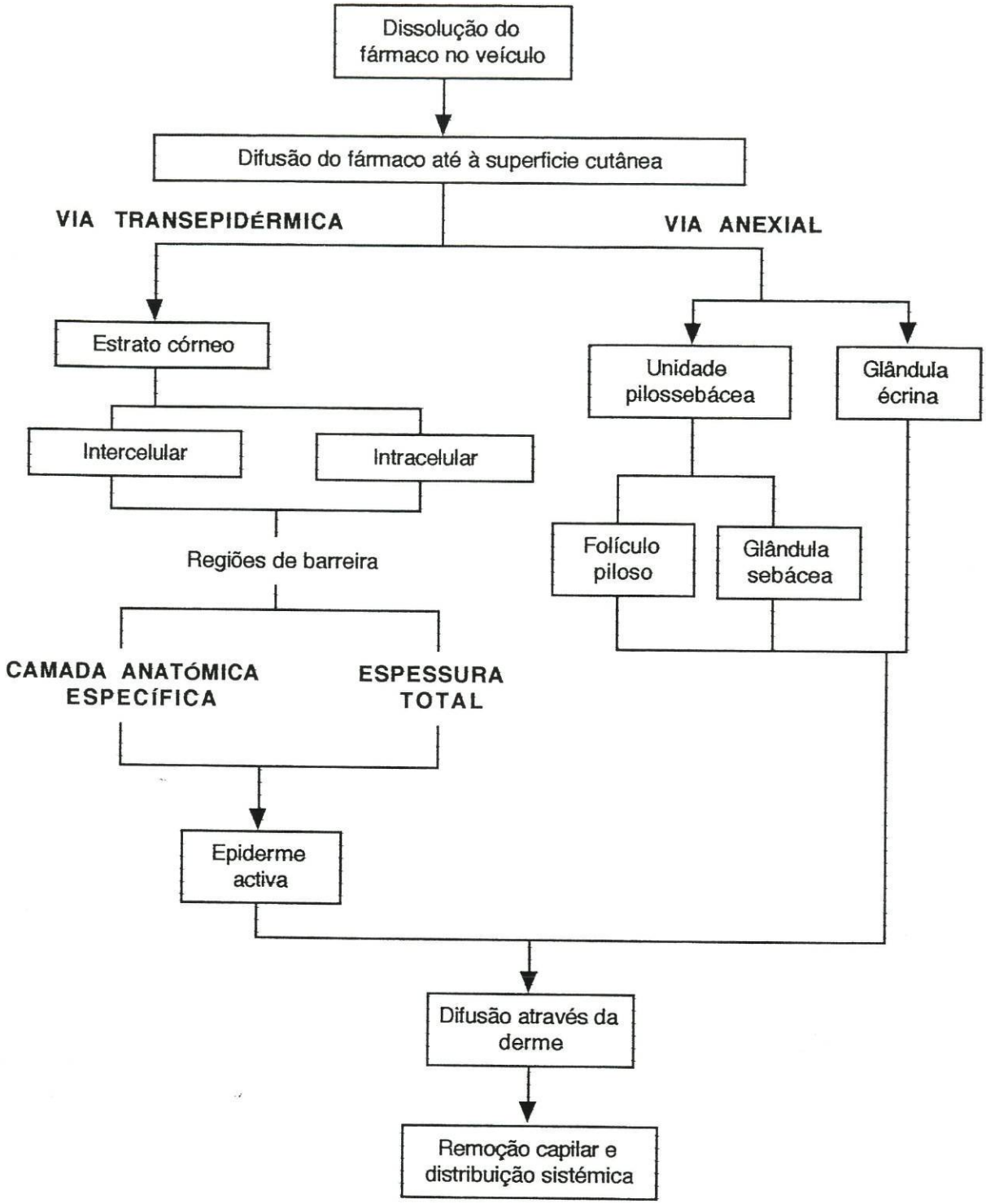
Desde há longos anos que a permeabilidade selectiva da pele perante os fármacos tem sido motivo de investigação tanto no domínio teórico como no prático. Os estudos sobre esta característica da pele envolvem os mecanismos de penetração dos fármacos através dos estratos e tecidos cutâneos, a eventual metabolização intermédia e as concentrações hemáticas e linfáticas desses compostos.

Os estudos relativos aos processos de penetração cutânea têm merecido o interesse de numerosos investigadores, empenhados na resolução de problemas farmacotoxicológicos resultantes da aplicação tópica de substâncias exógenas (23,24,25,26,27,28,29,30).

Actualmente, o recurso às preparações transdérmicas como forma de veicular substâncias activas para acção sustentada constitui uma das vias possíveis para se conseguir esse objectivo. As preparações de trinitrina, de escopolamina e de outros fármacos são exemplos deste tipo de administração.

2.2. Vias e mecanismos de penetraçâo cutânea

Considerando o estrato córneo em condições de perfeita integridade, pode referir-se como principais vias de penetração cutânea a via transepidérmica ou directa e a via anexial ou transitória (aparelho pilossebáceo e glândulas sudoríparas) (fig.5).



Adaptado de Prista et al. (4)

fig. 5. Resumo das vias de absorção percutânea.

A eleição de uma destas vias de administração é condicionada pela estrutura química da molécula do fármaco e pelo volume e a polaridade da referida molécula. Pensa-se, no entanto, que as duas vias se podem complementar, uma vez que, se por um lado a via anexial permite

inicialmente uma penetração cutânea mais rápida, por outro lado é possível verificar que a quantidade de fármaco que penetra através da via transepidérmica é maior, apesar dessa penetração ser mais lenta. Uma explicação possível para isto reside no facto de que em termos de área corporal, a raça humana (excepção ao couro cabeludo) apresenta uma superfície folicular aproximadamente igual a 1/1000 da superfície epidérmica total (31).

Contudo, existem fármacos que, devido à grande dimensão das suas moléculas e à sua elevada polaridade, penetram quase exclusivamente através da via transfolicular. Pode referir-se concretamente moléculas de esteróides que pelo facto de apresentarem hidroxilos e outros grupos polares estabelecem ligações com a ceratina hidratada, impedindo os seus movimentos. Nestes casos a penetração cutânea dá-se preferencialmente através da rede folicular (32).

2.2.1. Via transepidérmica

Tal como se referiu anteriormente, o estrato córneo é constituído por células muito compactas designadas por corneócitos (fig. 6).

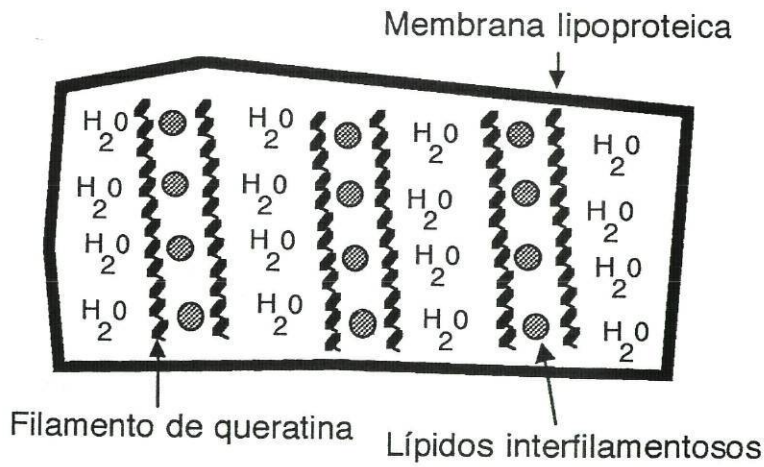


fig.6. Esquema de um corneócito.

A penetração pela camada córnea pode realizar-se através dessas células ou entre elas. Compostos polares, como a água, seguem geralmente a primeira via enquanto que os não polares, pela sua afinidade lipídica, difundem ao longo dos espaços intercelulares com penetração mais lenta que no primeiro caso. Esta menor velocidade de difusão acentua-se, ainda, quando os compostos não polares atingem a zona sub-córnea, onde a sua solubilidade no meio hídrico se encontra dificultada. Este facto justifica o efeito de "reservatório" de que mais

adiante se faz referência.

A estrutura intracelular do estrato córneo apresenta feixes fibrosos e uma matriz interfibrosa heterogénea constituindo uma espécie de mosaico com zonas polares contendo água e zonas apolares contendo lípidos. A disposição alternada destas regiões hidrófilas e lipófilas poderá explicar a difusão através do estrato córneo de moléculas com polaridades diferentes (33).

A concluir, pode afirmar-se que o conhecimento pormenorizado da estrutura molecular do princípio activo, bem como a eleição do respectivo veículo que o incorpora, são aspectos da maior importância a ter em conta quando se formulam preparações dérmicas.

2.2.2. Via anexial

A fraca difusibilidade do estrato córneo conduz a que a penetração de muitas substâncias se processe através da via transfolicular, representada principalmente pelo aparelho pilossebáceo.

Um centímetro quadrado de pele humana possui em média 10 folículos pilosos, 15 glândulas sebáceas e 100 glândulas sudoríparas. Contudo, a superfície apendicial apenas representa, como já foi referido, 0,1% da área total da pele.

Este facto por si só poderia levar a uma conclusão errada, se a realidade não tem demonstrado que, efectivamente, para muitas drogas é a principal, senão a única via alternativa de penetração cutânea.

Estudos recentes atribuem grande importância à via anexial no que respeita à penetração de iões e moléculas de elevado peso molecular (34).

Por outro lado, esta via proporciona a penetração rápida de drogas, como ficou demonstrado para a histamina após 5 minutos da aplicação (35).

O mesmo já não sucede pela via transepidérmica, dada a variedade e complexidade das barreiras a atravessar pelas drogas, verificando-se um atraso no processo de penetração, habitualmente designado por tempo de latência (lag-time).

2.2.3. O "reservatório epidérmico"

Determinados fármacos permanecem na camada córnea da pele durante algum tempo sem se difundirem, quando são submetidos a uma única aplicação. Este fenómeno designado por "reservatório epidérmico" tem sido demonstrado por vários investigadores.

Este comportamento dos fármacos foi verificado com certos corticosteróides (hidrocortisona, acetonido de fluocinolona e acetonido de triancinolona) mediante preparações aplicadas sob a forma de penso oclusivo. Situação análoga ocorre com outros compostos como são os casos da griseofulvina, do fusidato de sódio, do ácido fusídico e do hexaclorofeno (36,37,38,39).

Para haver formação de "depósito" é necessário existir uma relação adequada entre o grau de solubilidade do fármaco no estrato córneo da pele e a sua difusibilidade nesse meio. Este facto é particularmente característico de fármacos com baixa solubilidade e fraca difusão a esse nível da pele.

Quando se utilizam estes compostos nos pensos oclusivos conjuntamente com promotores de absorção, como por exemplo a ureia, observa-se um aumento da concentração do fármaco na epiderme. Contudo, a partir do momento em que os promotores de absorção são retirados dos pensos oclusivos, verifica-se a saturação do fármaco depositado na superfície da epiderme, dado que o estrato córneo readquire o seu conteúdo hídrico normal. Com a saturação do fármaco ocorre a sua precipitação e a partir desse momento acontece que uma parte do precipitado vai combinar-se com a ceratina e a outra parte vai difundir-se lentamente para o interior da pele.

Estabelece-se um equilíbrio dinâmico de tal forma que o fármaco insolúvel constitui como que uma espécie de "reservatório epidérmico", a partir do qual é fornecido princípio activo em quantidade proporcional à que vai sendo difundida para as camadas mais profundas da pele.

2.3. Factores que influenciam a Absorção Percutânea

Um medicamento tópico exerce eficazmente a sua acção quando se conjugam os seguintes princípios básicos: penetração através do estracto córneo, libertação da substância activa do veículo e consequente acção terapêutica desejada.

Depreende-se, portanto, que o êxito de uma terapia tópica esteja dependente da tríade fármaco-veículo-pele, não apenas em termos individuais mas, e sobretudo, da sua interligação.

Contrariando a ideia inicial de que a pele constituía uma estrutura impermeável, hoje sabe-se que não só é permeável como apresenta inclusivamente níveis de permeabilidade diferentes.

Um dos factores que condiciona o maior ou menor grau de absorção cutânea de um fármaco é a sua lipossolubilidade, ou melhor, o seu coeficiente de partilha O/A.

Outros parâmetros deverão ainda ser considerados, tais como: o coeficiente de difusão, a concentração e o peso molecular da substância activa. O coeficiente de difusão está relacionado com o coeficiente de partilha entre a substância activa e a camada córnea e o peso molecular daquela é inversamente proporcional à difusão.

As características individuais da pele, de acordo com a raça, sexo, idade, etc., associadas à heterogeneidade dos tecidos cutâneos e aos fenómenos metabólicos observados ao nível do estrato granuloso e da derme subjacente, dificultam a individualização dos factores que afectam a penetração.

Assim, as orientações biofarmacêuticas da medicação tópica apontam no sentido de ser necessário, por um lado, determinar rigorosamente a estrutura molecular do fármaco utilizado com vista à sua mais fácil difusão endocutânea e, por outro lado, seleccionar o excipiente adequado que garanta a cedência do princípio activo.

2.3.1. Conceitos físicos sobre difusão

A difusão consiste no transporte de substâncias resultante do seu movimento no interior de um substrato.

No que respeita ao estrato córneo, são três as etapas que regulam a difusão:

1ª. Numa primeira fase as moléculas ou iões terão de passar para a superfície do estrato córneo através do veículo. A etapa que controla este processo obedece à relação $\sqrt{t}$ de Einstein.

2ª. A passagem para o interior do estrato córneo corresponde à segunda etapa e é controlada pelo coeficiente de distribuição.

3ª. A terceira etapa corresponde à difusão do permeante através do estrato córneo.

2.3.2. Determinantes moleculares da absorção

2.3.2.1. Coeficiente de permeabilidade, coeficiente de difusão e coeficiente de partilha.

O coeficiente de permeabilidade (P) na 1ª lei de Fick (Equação 2) não inclui apenas o coeficiente de partilha (K), mas também o coeficiente de difusão (D).

O coeficiente de difusão, de acordo com a equação de Einstein, representa o movimento do permeante num determinado meio.

$$D=\Delta X^2/2t = RT/Nf \qquad \text{(Eq.2)}$$

onde X^2 é a média do deslocamento da molécula ao quadrado, t o tempo, R/N a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta e f é um factor que depende da forma e do volume mas é independente da massa.

Na difusão de uma substância através de um solvente, a configuração das moléculas constitui um problema matemático de difícil resolução, a menos que se considerem esféricas.

Relativamente ao volume, o mesmo problema não se coloca atendendo à proporcionalidade.

$$D=(1/V)^{1/3} \qquad \text{(Eq.3)}$$

onde **V** representa o volume molar

O acesso do permeante ao estrato córneo está condicionado pelos coeficientes de partilha. A sua passagem através do estrato córneo não se verifica antes da sua transferência do veículo para um dos seus componentes. É o coeficiente de partilha que controla este processo. (K) pode calcular-se, determinando a concentração da substância em dois solventes imiscíveis, num solvente e num tecido, ou em dois tecidos em equilíbrio.

No caso do estrato córneo, o coeficiente de partilha é definido como:

$$\mathbf{K=Csc/Cv} \qquad \text{(Eq.4)}$$

em que **Csc** e **Cv** correspondem às concentrações do permeante, respectivamente, no estrato córneo e no veículo.

É prática comum recorrer-se a solventes orgânicos como o octanol, o miristato de isopropilo, o heptano e o hexadecano para determinar os coeficientes de partilha O/A.

A selecção destes solventes baseia-se no facto de existir paralelismo entre Ksolvente/água e Ksc/água.

Um estudo recente sobre a absorção percutânea de séries de ésteres do ácido nicotínico demonstrou, como se pode verificar na Fig.7, que o coeficiente de permeabilidade (P) dos derivados do ácido nicotínico é função do coeficiente de partilha (K) miristato de isopropilo/água (40).

Quando o veículo é representado pela água, o logarítmo do coeficiente de permeabilidade (P) é proporcional ao logaritmo do coeficiente de partilha (KO/A) miristato de isopropilo / água. Contudo, para valores altos de KO/A essa relação não se verifica.

Considerando o estrato córneo como uma barreira lipídica, o exemplo acima apontado está em consonância com a noção de que quanto maior é o coeficiente de permeabilidade maior será a quantidade de substância que permeia a membrana. Todavia, para valores elevados de Ko/a, a passagem do estrato córneo para os tecidos aquosos subjacentes apresenta-se menos favorável, e o transporte através destes tecidos é que controla a velocidade de todos os processos.

Para líquidos puros a questão é diferente, atendendo a que a permeabilidade é máxima se KO/A = 1. Quando KO/A é superior a 1 a permeabilidade diminui. Este fenómeno pode

atribuir-se à competição do permeante entre o veículo e o estrato córneo. Com líquidos apolares o dador e a membrana apresentam propriedades solventes idênticas.

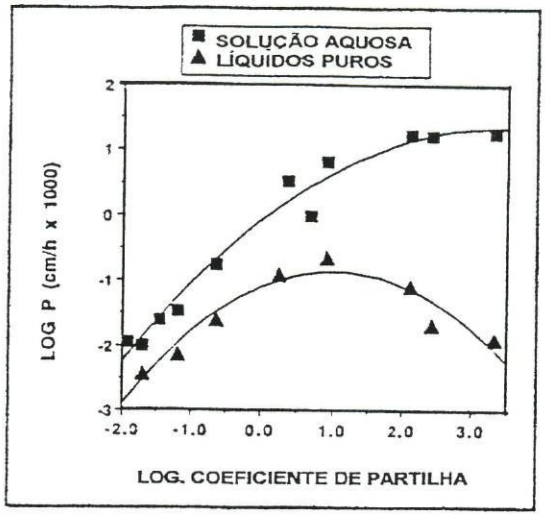


fig.7. Coeficiente de permeabilidade de derivados do ác. nicotínico em função do coeficiente de partilha miristato de isopropilo/água.

Deste modo, o coeficiente de partilha e a velocidade de permeação apresentam valores baixos conforme se demonstra na seguinte equação:

$$P = J/C = D\ K/l \qquad \text{(Eq.5)}$$

em que (P) representa o coeficiente de permeabilidade, (J) o fluxo no estado de equilíbrio, (C) a concentração do permeante dissolvido no veículo, (D) o coeficiente de difusão na membrana, (K) o coeficiente de partilha membrana/veículo e (l) a espessura da membrana.

Quando a partilha entre o veículo e a camada córnea é envolvida no processo de absorção, faz mais sentido determiná-la directamente do que considerar a substituição dos solventes.

Infelizmente, existem dificuldades tanto na obtenção como na interpretação dos dados experimentais. Habitualmente mergulha-se um ou mais pedaços de estrato córneo num líquido contendo uma concentração conhecida da substância. Depois de se atingir o equilíbrio, para o qual são necessárias várias horas ou mesmo um dia, determina-se no líquido a concentração da substância remanescente, e a quantidade transferida para a membrana é calculada pela diferença ou medida directamente no caso de se utilizarem compostos radioactivos.

A camada córnea é, por conseguinte, saturada com líquido e não mantém o seu estado normal, secando a estrutura durante as determinações. Deste modo, não é possível obter coeficientes de partilha aproximados sem oclusão da pele. Também não é possível trabalhar com os veículos semi-sólidos complexos que frequentemente se usam na terapia tópica. Além disso, há a possibilidade de se extrairem componentes estruturais da camada córnea, facto que pode influenciar o coeficiente de partilha mas não influencia necessariamente a difusão da molécula. Nestes casos, a permeabilidade não é obrigatoriamente proporcional à partilha na camada córnea.

Um exemplo que ilustra o que se acaba de expôr foi demonstrado por Anderson e Raykar (41). Com os resultados previamente obtidos com séries de derivados da hidrocortisona em relação aos referidos parâmetros, estes autores determinaram o efeito de vários substituintes de derivados do *p*-cresol no que respeita à partilha e à difusão através do estrato córneo.

A captação de soluções aquosas pela camada córnea não é afectada pela deslipidização usando clorofórmio/metanol (2:1), o que leva a admitir que as ligações às proteínas dos tecidos é bastante significativa.

Dois solventes, octanol e heptano, foram utilizados para simular os lípidos da camada córnea; o octanol apresentou um comportamento idêntico ao dos tecidos, o que demonstra que possui características de um líquido apolar.

No quadro seguinte é apresentada a contribuição de alguns grupos funcionais para o coeficiente de permeabilidade (41)

Quadro I - Contribuição dos grupos funcionais para a energia livre resultante da transferência de água para o estrato córneo a 37 °C.

	Energia livre (cal/mol)	
Grupos funcionais	**Ésteres da hidrocortisona**	***p*-cresóis**
$-CH_2-$	-440	
$-CONH_2$	2700	3400
$-COOCH_3$	1400	1100
-COOH	1500	2400
-OH	2400	2500

Os valores positivos correspodem à diminuição da permeação enquanto que os valores negativos significam o contrário. Os resultados encontrados para as duas séries de compostos são idênticos, o que leva a supôr que, se esses resultados forem comuns, o efeito da substituição química na permeação da pele pode ser antecipadamente determinado.

A título de exemplo, referimos que a inclusão de um grupo metilénico em determinada molécula resulta num aumento da permeação aproximadamente de duas vezes. Pelo contrário, é de prever que a introdução de um hidroxilo na mesma molécula traduza um efeito mais negativo que a inclusão de um grupo acetilo.

2.3.2.2. Volume molecular

Considerando o estrato córneo como uma camada compacta e que a difusão de moléculas se processa através de um percurso tortuoso, seria provável que o coeficiente de difusão fosse afectado pelo volume molecular. Não obstante essa probabilidade possa ter alguma aceitação, ainda não foi definitivamente demonstrada, através de estudos em que o volume constituía a única variável.

Anderson e Raykar estudaram a influência da massa molecular com duas séries de derivados da hidrocortisona e do *p*-cresol (41). Verificaram que a permeabilidade se podia relacionar perfeitamente com o coeficeente de partilha entre as duas séries, muito embora a inclinação das curvas obtidas fosse bastante diferente. Este facto pode ser devido ao efeito do volume molecular relativamente ao coeficiente de difusão na membrana.

No sentido de obter uma relação que inclua todos os dados, pode considerar-se a seguinte relação:

$$\mathbf{Dm = Dm^0\ M^{-n}} \qquad \text{(Eq.6)}$$

em que **Dm** representa o coeficiente de difusão de cada composto, **M** a massa molecular e $\mathbf{Dm^0}$ e **n** são constantes que dependem da natureza da membrana.

Mediante análise de regressão linear, foi encontrado o valor de 4,6 para **n**, número de certo modo elevado que poderá traduzir um efeito significativo do peso molecular.

O valor de n para o espaço de difusão está habitualmente compreendido entre 2 e 3.

Por outro lado, Guy e Hadgraft argumentam que, actualmente, quase todos os dados fornecidos pela literatura sobre permeação podem ser justificados em termos de coeficiente de partilha O/A e que, em função da amplitude dos erros que envolvem os estudos nesta área, não é possível justificar de forma evidente as diferenças de permeabilidade obtidas em termos de volume molecular (42).

2.3.2.3. Substâncias ionizáveis.

A natureza apolar da camada córnea pode sugerir que os compostos ionizáveis encontram grande resistência em permear. Este pressuposto pode ser facilmente verificado recorrendo a substâncias ionizáveis incorporadas em veículos nos quais, através da variação do pH, se consegue variar a razão entre as formas dissociadas e não dissociadas. As duas formas têm aproximadamente o mesmo volume molecular, pelo que os respectivos coeficientes de difusão apresentam um valor idêntico.

No entanto, há que considerar a possibilidade de alteração da barreira para valores extremos de pH e ainda a capacidade tampão das membranas.

O coeficiente de permeabilidade das formas não ionizadas é superior ao das formas ionizadas, em muitos casos na ordem das duas ou três vezes. Uma das razões prende-se com a maior solubilidade dos compostos não iónicos na camada córnea; a outra deve-se à sua fraca solubilidade em solventes aquosos.

A (fig.8) representa a permeação da lidocaína em função do pH.

Os valores experimentais relativos ao fluxo para sistemas contendo 5% de lidocaína (soluções de pH 4 e 6; dispersões de pH 7,8 e 10) demonstram um aumento da permeabilidade para as formas não ionizadas.

Os coeficientes de permeabilidade calculados a partir dos resultados obtidos foram $17,7 \times 10^{-3}$ cm/h para a forma não ionizada e $0,336 \times 10^{-3}$ cm/h para a forma ionizada (43).

A (fig.8) revela ainda, como se pode avaliar pelos valores de fluxo (J) calculados, que

quantidades significativas de lidocaína ionizada podem permear a pele. Outros estudos com compostos ionizáveis apresentam resultados idênticos, embora a razão entre os coeficientes de permeabilidade das formas não ionizadas e ionizadas variem com o tipo de substância.

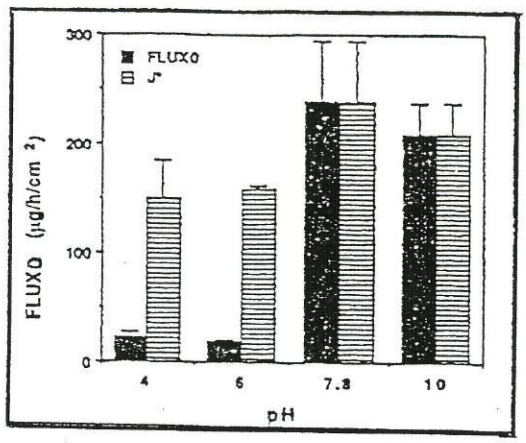


fig. 8. Permeação da lidocaína através de pele humana em função do pH.

2.3.2.4. Ligação à pele.

O problema da ligação do fármaco à pele dificulta o estudo experimental atendendo a que, tal como o coeficiente de partilha, está dependente do número e natureza dos grupos funcionais inerentes à molécula permeante.

É possível verificar por intermédio de uma simulação computorizada a importância das ligações ao estrato córneo e prever a forma como se processa o fenómeno (44). A (fig.9) ilustra um modelo deste tipo. O estrato córneo **SC** foi dividido em 10 segmentos iguais, cinco dos quais constituindo o meio de difusão; os compartimentos **B** retêm a substância permeante que não é capaz de se difundir através da membrana. A distribuição entre os compartimentos **B** e os outros compartimentos **SC** considera-se instantânea e depende unicamente da fracção que fica ligada **FSC**, a qual corresponde, nestas experiências computorizadas, à variável. A constante de velocidade **K** cujo valor é de ordem um, corresponde à transferência de **SC**; a razão K_1/K_{-1} corresponde ao coeficiente de partilha **SC/dador**; **AQ** representa os tecidos viáveis para onde se pode difundir a substância e **SINK** representa o sangue ou a fase receptora, respectivamente nos ensaios "in vivo" e "in vitro".

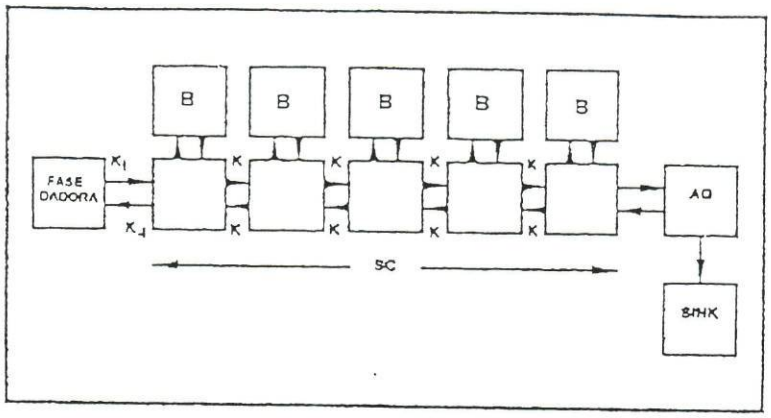


fig.9. Modelo de uma membrana multicompartimentada.

As (figs.10 e 11) mostram o efeito da ligação relativamente a uma substância. As curvas na (fig.10) dizem respeito às quantidades acumuladas de substância que penetra em função do tempo. As partes rectas são paralelas demonstrando que o fluxo no estado de equilíbrio não é afectado pela ligação à pele.

O maior efeito prende-se com o aumento verificado com o tempo de cedência (lag-time), que é tanto mais elevado quanto maior é o valor de **FSC**.

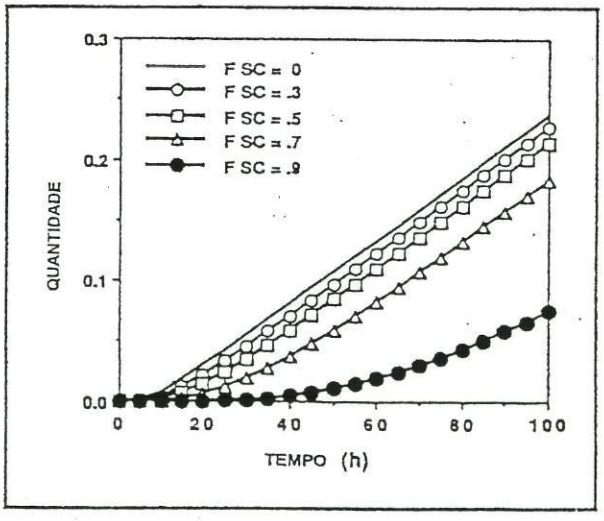


fig.10

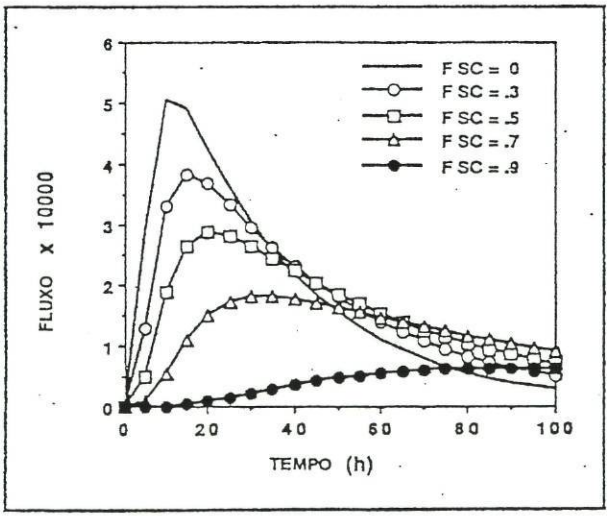


fig.11

2.3.3. Leis de Fick

O estrato córneo possui maior ou menor afinidade para determinadas substâncias, não se tratando, portanto, de um sistema inerte. Contudo, considera-se uma membrana que obedece às leis físicas da difusão passiva particularmente quando se atinge o estado de equilíbrio (steady-state).

A velocidade de difusão através de uma membrana, ou seja o fluxo **J**, tal como postulou Fick, é proporcional à diferença de concentrações **C** entre os dois lados da membrana e inversamente proporcional à sua espessura **l**.

A constante de proporcionalidade é definida como coeficiente de permeabilidade **P**. Este inclui o coeficiente de difusão diferencial **D** e o coeficiente de partilha **K**. Esta relação é conhecida pela 1ª lei de Fick:

$$J = dC / dl \qquad \text{ou} \qquad J = P\,\Delta C = K\,D\,\Delta C / l \qquad \text{(Eq.7)}$$

As unidades que exprimem o fluxo **J** são mole/cm^2. seg., que quantifica a passagem de substância por unidade de área da membrana por unidade de tempo.

Esta equação e as equações com ela relacionadas referem-se à difusão no estado de equilíbrio (steady-state) de uma substância através de uma membrana considerada homogénea. Atendendo a que a pele é constituída por uma estrutura multilamelar, torna-se vantajoso considerar como fluxo total o somatório dos fluxos relativos às várias camadas, em que cada uma delas exibe o seu próprio **K**, **D** e **l**. O processo de difusão no estrato córneo é lento, contrariamente ao que se passa na epiderme. Neste caso a difusão é mais rápida, pelo que a etapa que condiciona a velocidade se localiza geralmente ao nível do estrato córneo. Como resultado deste facto é normal considerarem-se o fluxo, os valores encontrados no estado de equilíbrio e a quantificação do coeficiente de permeabilidade **P** obtidos com o estrato córneo.

A 1ª lei de Fick apresenta três variáveis: **J**, **C** e **l**, desdobrando-se a primeira em muitas outras. Esta lei não é utilizada na maioria das situações experimentais, sendo seguida de preferência a 2ª lei de Fick. A equação desta lei, que reduz o número de variáveis a uma, facilita a resolução de muitos problemas relacionados com a difusão.

As derivações à 2ª lei de Fick consideram um elemento de volume formado por dois

planos perpendiculares ao sentido da difusão (45). O difusor entra pelo lado de concentrações mais altas saindo pelo lado de menores concentrações.

As quantidades de substância que entram e saem por unidade de tempo podem ser calculadas pela 1ª lei de Fick. A equação que quantifica a diferença entre essas quantidades para um modelo de difusão unidimensional corresponde à 2ª lei de Fick.

No caso dos sistemas reais a molécula ao entrar no estrato córneo pode movimentar-se em três direcções. Para simplificar o problema considera-se o coeficiente de difusão igual nas três direcções. Daqui resulta a derivação à 2ª lei de Fick, representada da seguinte forma:

$$dc/dt = D.(d^2c/dx^2 + d^2c/dy^2 + d^2c/dz^2) \qquad \text{(Eq.8)}$$

Deste modo **x**, **y** e **z** correspondem às três coordenadas de espaço.

Para as situações experimentais em que se considera a difusão unidireccional, isto é, em que o gradiente de concentração apenas se desloca ao longo do eixo dos **x**, a equação anterior pode simplificar-se, dando lugar à equação que expressa a 2ª lei de Fick:

$$dC/dt = D.d^2C/dx^2 \qquad \text{(Eq.9)}$$

em que **C** representa a concentração de substância a difundir, **x** a área de secção, **D** o coeficiente de difusão e **t** o tempo.

Nos estudos de permeação através da pele os investigadores usam normalmente uma membrana colocada entre dois compartimentos correspondentes respectivamente à fase dadora e à fase receptora.

Algum tempo após o início do processo de difusão atinge-se o estado de equilíbrio. Assim, a equação anterior pode ser simplificada:

$$dm/dt = D.C_o/l \qquad \text{(Eq.10)}$$

em que, **m** representa a quantidade acumulada de substância difundida através da membrana no tempo **t**, **Co** é a concentração do difusor na primeira camada da membrana e **l** a espessura.

Na maioria das experiências não é possível calcular **Co**. Contudo, é fácil determinar **C´o** isto é, a concentração da substância na fase dadora que contacta com a membrana.

Co e **C´o** estão assim relacionados:

$$Co = K.C'_o \qquad \text{(Eq.11)}$$

em que **K** é o coeficiente de partilha da substância difusora entre a membrana e a solução que a banha. Substituindo na (Eq.10) **Co** pela expressão da (Eq.11) obtém-se:

$$dm/dt = D.C'_o.K/l \qquad \text{(Eq.12)}$$

A (fig 12) representa a quantidade de substância **m** que permeia a pele por unidade de área em função do tempo **t**.

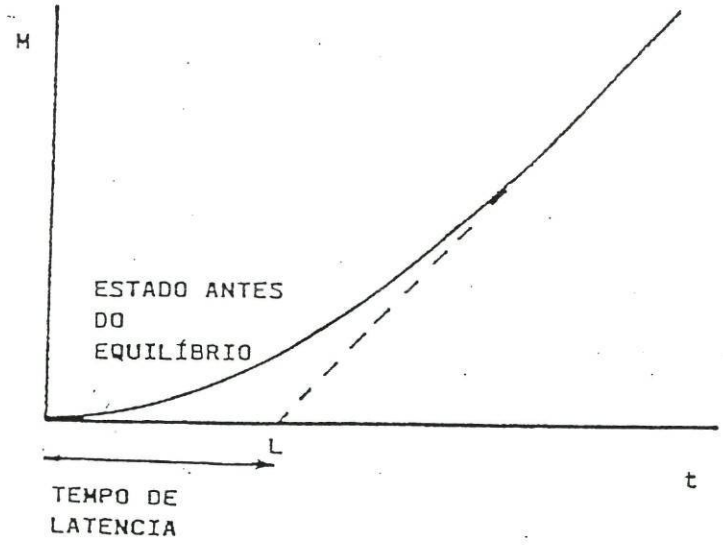


fig.12. Curva das concentrações (quantidades de substância acumulada -M-) versus tempo, por difusão através da epiderme.

Da intercepção do eixo do tempo com o prolongamento da recta correspondente ao pseudo-estado de equilíbrio, resulta o tempo de lactência "lag-time".

O tempo de latência **L** representa o período durante o qual a velocidade de difusão através da membrana está a aumentar. Genericamente, o estado de equilíbrio é mantido durante um período aproximadamente igual a 2,7 **L**. Este pode relacionar-se com o coeficiente de difusão através da seguinte equação:

$$L = l^2/6D \qquad \text{(Eq.13)}$$

Deste modo, teoricamente pode obter-se **D** (coeficiente de difusão) determinando **L** (tempo de lactência), partindo do princípio que **l** (espessura da membrana) é conhecida.

Na prática, este método para calcular **D** apresenta grandes desvantagens, pois é difícil determinar a espessura exacta do estrato córneo. Além disso, há que considerar a eventual presença de promotores de absorção e os valores de **L** (tempo de latência) obtidos nos estudos experimentais com a pele humana. Estes valores são muito variáveis devido às ligações entre a substância que penetra e a camada córnea.

O coeficiente de permeabilidade da substância **P** que se difunde através da membrana pode ser definido pela expressão:

$$P = K.D/\Delta l \qquad \text{(Eq.14)}$$

Substituindo na (Eq.12) obtém-se:

$$dm / dt = C'o .P \qquad \text{(Eq.15)}$$

A expressão **dm/dt** corresponde ao fluxo **J**, ou seja, à quantidade de substância acumulada que se difunde por unidade de área através da membrana.

$$J = C'o .P \qquad \text{(Eq.16)}$$

Assim, se a concentração na fase dadora e o fluxo são conhecidos, o coeficiente de permeabilidade pode ser determinado. É exactamente este parâmetro que se utiliza muitas vezes para caracterizar a absorção percutânea.

Convém referir que estas relações são válidas apenas para o estado de equilíbrio. Além disso, a teoria de difusão de Fick é aplicável a um meio isotrópico. No entanto, a pele é constituída por várias camadas heterogéneas, pelo que os coeficientes de difusão calculados

através das expressões anteriormente mencionadas enfermam de erros resultantes das ligações fármaco-pele ou de desvios ao comportamento ideal das soluções.

2.3.4. Não aplicabilidade da lei de Fick.

Em determinadas circunstâncias as leis de Fick não podem ser aplicadas, nomeadamente em situações nas quais a permeação não é apenas controlada pelo estrato córneo. Um exemplo deste caso ocorre quando o penetrante está dissolvido num meio cuja libertação é relativamente lenta e a substância exibe maior afinidade para o veículo.

Para os casos em que a difusão através do estrato córneo é mais rápida relativamente à difusão através do veículo, ou da transferência do veículo para o estrato córneo, Higuchi desenvolveu equações matemáticas, pelas quais é possível verificar que a quantidade de substância que penetra através da pele é proporcional à $\sqrt{t}$.

$$Q = 2\ Cv\ (\ Dv\ .t\ /\ \pi)^{1/2} \qquad \text{(Eq.17)}$$

onde **Dv** é o coeficiente de difusão do permeante no veículo e **Cv** a concentração total do permeante (suspenso e dissolvido).

Esta equação aplica-se em situações nas quais o penetrante está sob a forma de suspensão (46). Nestas condições, a absorção no estrato córneo e por último, a difusão através da membrana, dependem da eficácia do penetrante dissolvido. Deste modo a equação pode exprimir-se assim:

$$Q = [(2\ Cv\ -\ Sv)\ Sv.Dv.t]^{1/2} \qquad \text{(Eq.18)}$$

em que **Sv** é a solubilidade do penetrante no veículo. Uma situação mais complicada, mas também frequente, é a que envolve um permeante que está dissolvido num meio disperso com duas fases emulsionadas. Neste caso, é necessário verificar a capacidade de libertação da substância permeante a partir da emulsão. Se a velocidade de libertação **Vl** fôr rápida, isto é, se fôr maior que a velocidade de absorção **Va**, as leis de Fick são perfeitamente aplicáveis. Pelo contrário, se a libertação é lenta, **Vl** < **Va** (emulsões viscosas ou muito estáveis) a difusão obedece à lei de Higuchi ou seja, é proporcional à $\sqrt{t}$.

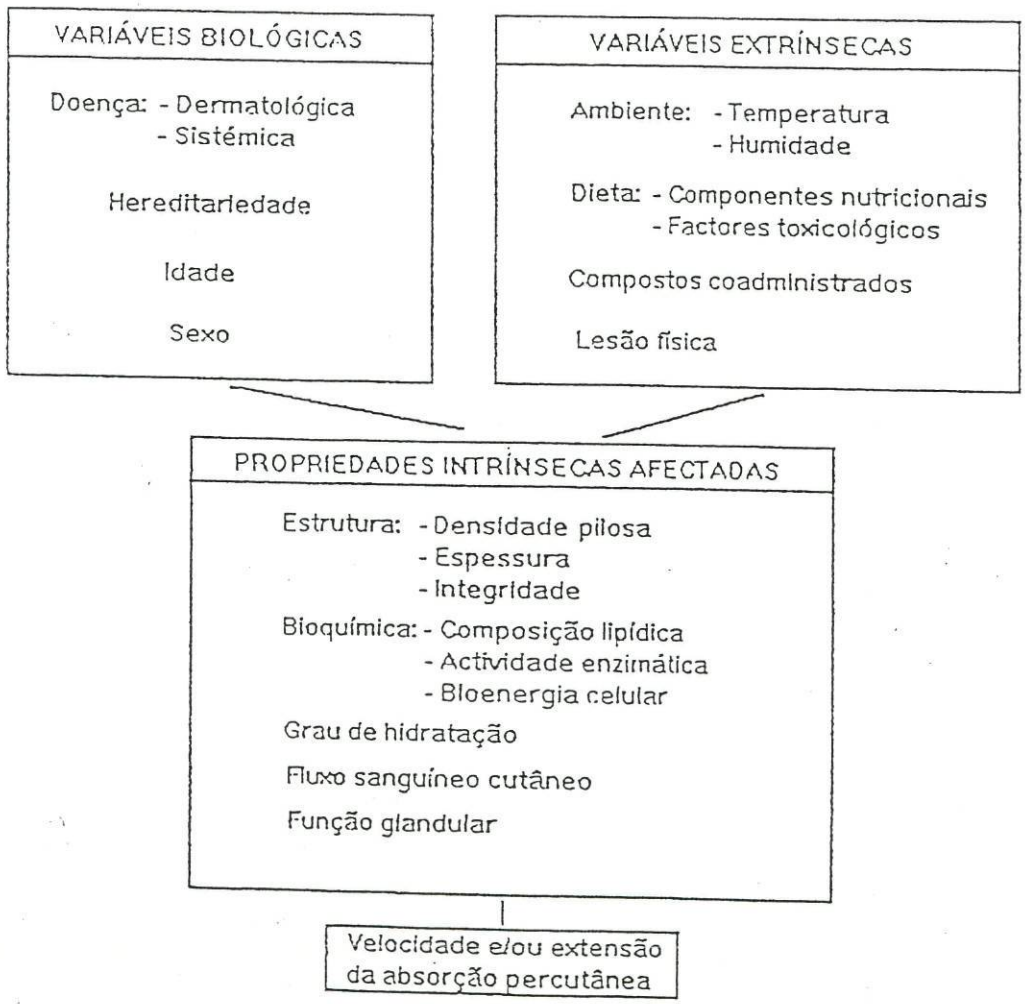
2.3.5. Factores biológicos

A complexidade e a diversidade de condições biológicas inerentes à pele torna difícil a compreensão dos mecanismos de penetração e de absorção dos fármacos.

A pele dos mamíferos constitui um órgão dinâmico com múltiplas funções biológicas, entre as quais se destacam as propriedades de barreira, que se revestem de capital importância na absorção percutânea, e a termorregulação, responsável pela manutenção da temperatura corporal.

Outras funções referidas anteriormente, tais como: mecânicas, sensoriais, endocrinológicas, imunológicas, metabólicas, etc., resultam de uma estrutura microanatómica complexa da pele cujo conhecimento ajuda a esclarecer e a evidenciar os factores biológicos que afectam a penetração cutânea.

Quadro II - Factores que podem modular a permeação cutânea.



O Quadro II ilustra os vários factores biológicos e factores extrínsecos que podem alterar as propriedades intrínsecas da pele, modulando assim a permeação cutânea.

As propriedades intrínsecas são aquelas que apresentam um efeito directo sobre a quantidade de substância que penetra ou é absorvida na pele.

Variáveis biológicas e extrínsecas, podem afectar estes processos. Determinadas doenças dermatológicas, por exemplo, são susceptíveis de alterar a permeação de substâncias aplicadas topicamente.

2.3.5.1. Integridade do estrato córneo

O ponto fulcral da investigação sobre os efeitos das doenças dermatológicas na integridade do estrato córneo põe em relevo a importância de que se reveste a função da barreira cutânea, tal como tem sido demonstrado através de vários estudos "in vitro" e "in vivo".

A penetração através do estrato córneo está, de uma forma geral, directamente relacionada com o coeficiente de partilha dos compostos lipídicos (47).

A remoção do estrato córneo por processos fisico-químicos (agentes queratolíticos, abrasão, fitas adesivas, etc.) origina o aumento da penetração. Uma vez regenerado o estrato córneo, o fluxo normal é retomado integralmente.

Se ocorrer a modificação da pele sem que haja completa remoção da camada córnea, verifica-se igualmente um aumento da permeação, tal como foi verificado em experiências nas quais se utilizou pele com alterações dermatológicas proliferativas.

A importância dos lípidos intercelulares na função de barreira pode ser evidenciada através da sua remoção por solventes orgânicos (éter, clorofórmio/metanol). O aumento da penetração de compostos hidrofílicos como a hidrocortisona e o ácido benzóico, através de pele deslipidizada foi demonstrado por estudos "in vivo" em porquinhos da India (48)

Determinado tipo de doenças dermatológicas, tais como a psoríase, aceleram a absorção, não só devido à remoção do estrato córneo, mas também à modificação produzida na estrutura epidérmica e à alteração que ocorre na perfusão vascular (49,50). A ictiose congénita, marcada pela desidratação da pele, tornando-a escamosa, constitui outro exemplo de alteração da integridade da camada córnea, promovendo a absorção (51).

Certas doenças sistémicas, como a diabetes, podem igualmente alterar a velocidade de absorção tópica de substâncias. No caso concreto da diabetes sabe-se que esta doença altera a estrutura da camada basal epidérmica e a função capilar, pelo que a difusão de substâncias é substancialmente aumentada em diabéticos crónicos (52,53,54).

Estas alterações relacionadas com o desenvolvimento de doenças sistémicas terão que ser equacionadas, pois podem alterar de uma forma significativa a absorção quando a função capilar constitui um processo importante.

Embora o estrato córneo represente a primeira barreira à absorção percutânea para a maioria das substâncias, alguns compostos polares penetram preferencialmente através da chamada via anexial. Esta é composta, como já foi referido anteriormente, pelas estruturas anexas cutâneas (folículos pilosos e glândulas sudoríparas) ou ainda por zonas ricas em estruturas proteicas como os ceratinócitos (55,56,57). Para aquelas substâncias, a densidade de folículos pilosos e de glândulas sudoríparas nas várias espécies, bem como as diferenças verificadas consoante a região anatómica, podem alterar a velocidade de absorção.

2.3.5.2. Hidratação cutânea

A hidratação da pele constitui um dos factores que mais afecta a velocidade e o grau de absorção percutânea. O uso de pensos oclusivos é considerado um dos métodos mais primários para incrementar a penetração cutânea, como foi demonstrado por Wurster e Kramer para os metil, etil e glicol salicilatos, e por Feldman e Maibach para a hidrocortisona em humanos (58,59). A influência da hidratação é mais importante para moléculas não polares do que para moléculas polares, tendo estas provavelmente um papel secundário no aumento da difusibilidade da molécula penetrante (60). Todavia, a hidratação afecta também a partilha e o gradiente de concentração da molécula penetrante no estrato córneo, bem como a espessura da barreira.

As alterações destes parâmetros podem modificar a configuração do reservatório do estrato córneo para os diferentes penetrantes e, por consequência, modificar o perfil da permeação.

A oclusão impede a evaporação superficial da água endógena, promovendo assim a hidratação do estrato córneo. Em condições de elevada humidade relativa (superior a 80%), verifica-se um aumento significativo da hidratação cutânea (61).

A avaliação do grau de hidratação pode ser obtida mediante a monitorização da permeabilidade do estrato córneo à água através da determinação da perda de água transepidérmica.

Estudos recentes "in vitro", em que se utilizou o paratião, revelaram um aumento significativo do fluxo de permeabilidade quando a humidade relativa era de 90%, para valores de humidade de 60 e 20% (62).

2.3.5.3. Fluxo sanguíneo cutâneo.

A derme é irrigada por uma larga rede capilar que regula o fluxo sanguíneo cutâneo em resposta à função termorreguladora.

Quando a temperatura ambiente é superior à temperatura do corpo, o fluxo sanguíneo aumenta. Pelo contrário, o fluxo diminui para temperaturas mais baixas por forma a compensar a perda de calor superficial.

O fluxo sanguíneo cutâneo varia, em média, entre 0,5 e 100 ml/min/100 g. Em condições normais (repouso) o fluxo sanguíneo da pele humana situa-se à volta de 3-10 ml/min/100 g. Quando a temperatura ambiente excede 43 ^{o}C, o fluxo aumenta cerca de 10 vezes (52).

Danon e col. demonstraram em experiências "in vivo" que a absorção tópica do metilsalicilato aumentava 3 vezes quando indivíduos voluntários eram expostos a altas temperaturas ambientais ou eram submetidos a elevado esforço físico (63).

Tal como a temperatura, também a humidade pode alterar a absorção percutânea. No quadro seguinte apresenta-se o resultado dum estudo "in vitro" com o paratião em que foi utilizada pele de porco (62).

Quadro III- Efeito da temperatura e humidade na absorção percutânea "in vitro" do paratião em pele de porco.

Dose aplicada ($\mu g/cm^2$)	Temperatura (°C)		Humidade relativa (%)	Absorção relativa *
	Pele	Ar		
4	37	37	60	1**
	37	42	60	1,14
	42	42	60	2,78
	37	37	20	0,97
	37	37	90	2,20
40	37	37	60	1**
	37	42	60	1,50
	42	42	60	2,32
	37	37	20	0,79
	37	37	90	2,75
400	37	37	60	1**
	37	42	60	1,35
	42	42	60	1,61
	37	37	20	0,98
	37	37	90	2,56

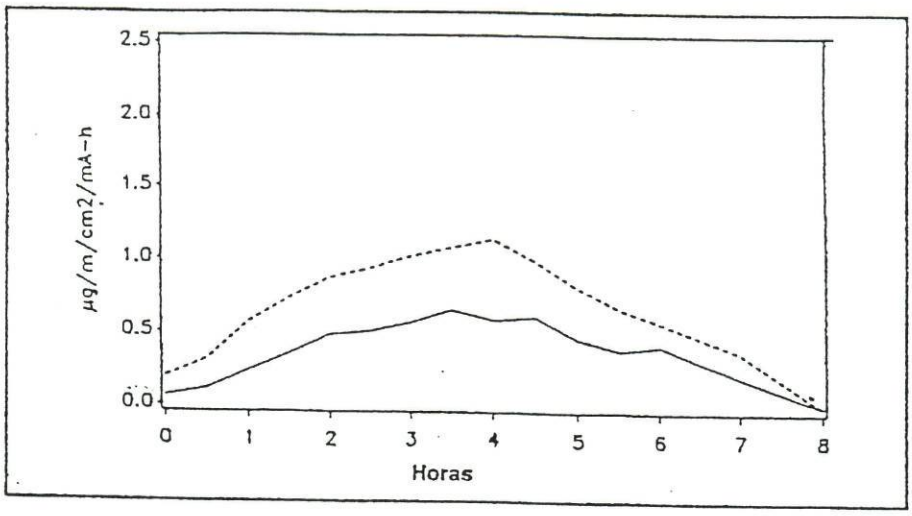
* (% dose absorvida) / (% dose absorvida no controlo) calculada independentemente para cada dose.

** Condições do controlo para cada dose..

A (%) da dose absorvida nas condições do controlo são: 7,69% para 4 g; 1,91% para 40 g e 0,46% para 400 g.

A absorção percutânea pode ser modulada por alterações no fluxo sanguíneo cutâneo.

O mecanismo primário responsável pela alteração do fluxo sanguíneo resulta não só do efeito da temperatura, como também da manipulação farmacológica na utilização de substâncias que originam vasoconstrição ou vasodilatação. Como exemplo, pode citar-se a adição da norepinefrina à lidocaína, resultando dessa associação uma diminuição do fluxo do anestésico provocada pelo efeito vasoconstrictor da amina. Pelo contrário, a associação de um vasodilatador com determinados fármacos, pode aumentar-lhes o fluxo de forma notória. É o que acontece quando se associa a tolazolina, composto vasodilatador periférico, com a lidocaína, como se pode observar na (fig.13) (64,65).



(------) **lidocaína + tolazolina**
(_____) **lidocaína**

fig.13. Influência da tolazolina no fluxo transdérmico da lidocaína.

As doenças dermatológicas podem igualmente interferir com o fluxo sanguíneo cutâneo, nomeadamente pela formação de eritemas. Certos estímulos provocados pela libertação de mediadores inflamatórios podem também alterar a perfusão vascular e/ou a permeabilidade capilar, modificando deste modo a penetração e/ou a absorção.

2.3.5.4. Lípidos cutâneos.

Elias formulou um modelo de estrutura epidérmica contendo corneócitos disseminados pela matriz lipídica extracelular (66)

A primeira via para a penetração química através do estrato córneo é através da estrutura lipídica dos espaços intercelulares, e a sua composição bioquímica é dependente das espécies. Por isso, a composição lipídica da epiderme representa uma das maiores determinantes à penetração de compostos através da pele. Factores que possam alterar essa composição lipídica afectam consequentemente a cinética de permeação. O mecanismo primário da acção de muitos promotores da absorção, nomeadamente solventes, resulta precisamente dos seus efeitos sobre a estrutura lipídica cutânea. A composição lipídica da pele pode ser manipulada experimentalmente

mediante o uso de solventes deslipidizantes ou a nível sistémico por alteração da dieta. Certas doenças que modificam o metabolismo lipídico, ou problemas de insuficiência nutricional, alteram a função de barreira cutânea, afectando, por conseguinte, a absorção.

2.3.5.5. Biotransformação cutânea.

Estudos recentes têm demonstrado que o metabolismo cutâneo constitui um importante componente da permeação de muitas substâncias (67,68,69,70,71).

São vários os factores que influenciam a quantidade de substância que, após a sua penetração no estrato córneo, permitem que seja absorvida intacta ou a sob a forma de um metabolito resultante da biotransformação epidérmica. Entre os citados factores que influenciam a fracção de penetrante que é metabolizada referem-se a velocidade de permeação, o tempo de permanência da substância bem como do respectivo metabolito na epiderme, a actividade enzimática epidérmica, as características de partilha da substância e do metabolito e ainda a localização anatómica dos enzimas.

Estudos sobre a absorção tópica do paratião demonstraram que o metabolismo de primeira passagem era bloqueado pelo prévio tratamento com citocromo P-450 inibidor. O metabolismo era igualmente afectado pela oclusão, dado que facilitava a transformação da fracção de paratião metabolizado em paraoxon ou p-nitrofenol (72).

2.3.6. Idade, estado da pele e região anatómica

Não existem dados seguros relativamente às relações entre a idade e a permeabilidade cutânea aos fármacos. No entanto, a utilização tópica de esteróides como a hidrocortisona, tem permitido adquirir algumas informações a tal respeito (73,74,75).

As experiências realizadas neste domínio permitiram concluir que a pele de criança é muito mais permeável que a do adulto e que, em geral, a pele do idoso é a de menor índice de permeabilidade. Um trabalho de Harpin e Ratter revelou que a pele dos prematuros é muito mais permeável ao álcool (76).

Crianças cuja pele foi submetida a lavagens com solução de hexaclorofeno apresentaram sinais de lesões cerebrais. Estas lesões são manifestamente mais extensas em prematuros (77).

Não é possível atribuir ao factor idade o comportamento das diversas regiões anatómicas perante a perda de água transepidérmica. Com efeito, este fenómeno em determinadas regiões é menor nas crianças do que nos adultos e nestes é ainda menor do que nos idosos. Contudo, este conceito não é válido para outras regiões anatómicas dado verificar-se comportamento completamente inverso.

No que respeita à integridade da pele confirma-se o conceito básico de que a eficácia da sua função de barreira apenas se verifica quando ela se apresenta em perfeitas condições. Qualquer fenómeno físico, químico ou biológico que lhe altere estas características modifica-lhe o índice de permeabilidade e, claro está, a absorção.

Existem estudos para avaliar o grau de penetração e de absorção dos fármacos nas diversas regiões anatómicas. A espessura da pele é diferente nas várias partes do corpo, facto que poderia explicar só por si as variações da permeabilidade. Contudo, isso nem sempre acontece pois áreas, como a palma das mãos e a planta dos pés, apesar de evidenciarem um estrato córneo com uma espessura compreendida entre 400 e 600 micra, comparada com 10-20 micra de outras zonas, apresentam uma barreira pouco eficaz. Na realidade o fluxo hídrico e o coeficiente de permeabilidade são 10 vezes maiores do que os que se observam na pele abdominal, e o coeficiente de difusão é seguramente 150 vezes maior.

A natureza do estrato córneo desempenha um papel mais importante na regulação da penetração dos fármacos do que a própria espessura. Com efeito, a estrutura dos corneócitos palmares e plantares é diferente da estrutura que se observa noutras partes do corpo, o que leva a admitir que aqueles elementos estruturais da pele desempenham outras funções para além da protectora.

Um interessante trabalho de Wedig e col., em que se compara o grau de penetração cutânea da dipiritiona em diferentes áreas anatómicas, revelou que esta era máxima na fronte, seguida do couro cabeludo e, por último, o antebraço (fig.14) (78) .

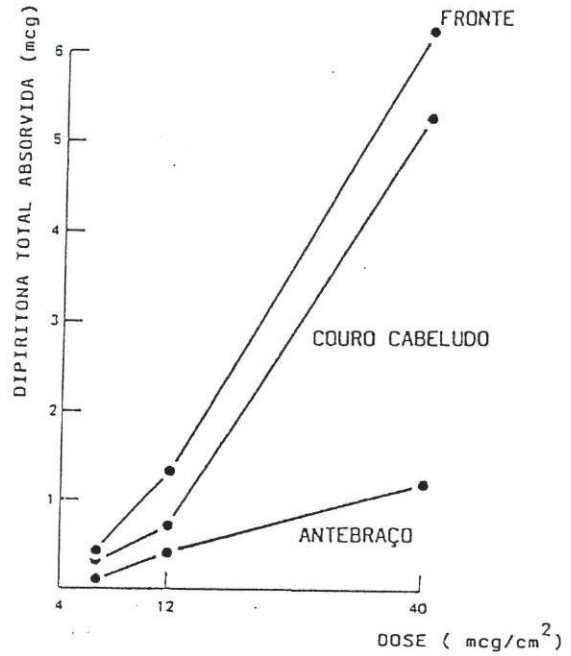


fig.14. Relação entre diferentes concentrações de dipiritiona aplicadas em diferentes zonas anatómicas e a absorção percutânea.

O facto da região frontal proporcionar maior penetração da dipiritiona parece estar relacionado com a existência de elevado número de glândulas sebáceas.

Regiões como a escrotal, a vulvar e a dos grandes lábios são também das mais permeáveis. Particularmente permeável é a pele da região pós-auricular, razão pela qual esta zona anatómica é escolhida preferencialmente para a terapêutica sistémica (usando o sistema TDD com oclusão).

O local de aplicação mais usado para medir a absorção cutânea é o antebraço, não obstante as diferenças que se verificaram consoante a zona anatómica.

Quadro IV-Factores que influenciam a Permeação e a Absorção Cutânea dos Fármacos

Biológicos		
	Espessura	Hidratação
	Idade	Local de aplicação
	Fluxo sanguíneo	Espécies animais
	Metabolismo	
Factores de Permeação		
	Peso molecular	Grau de dissociação
	Coef. partilha	Concentração
	Solubilidade	Dimensão molecular (difusibilidade)
	Ligação à pele	
Factores do Veículo		
	Penetração	Libertação
	Efeito promotor	Activ. termodinâmica
	Oclusão	pH
	Cap.tensioactiva	
Factores físicos		
	Temperatura	Tempo
	Clima	
Lesões		
	Mecânica	Química
	Doença	

2.4. Promotores de absorção

A presença de determinados compostos, actuando por mecanismos diversos pode proporcionar variações no fluxo de um fármaco através da pele, mediante modificações na estrutura das membranas celulares, alterações dos coeficientes de difusão e dos coeficientes de partilha estrato córneo/veículo, influência mais marcada no conteúdo hídrico cutâneo, diminuição das tensões interfasiais, etc.

Refira-se, entretanto, que tais substâncias devem apresentar-se inócuas, farmacologicamente inactivas, não interferirem com os princípios activos nem modificarem as características físicas e sensoriais próprias de cada produto. O seu efeito deve ser imediato e reversível e a sua utilização, tanto no campo farmacêutico como cosmético, perfeitamente aceitável. Estas substâncias designam-se por modificadores, aceleradores, catalizadores ou simplesmente, promotores. Se ainda considerarmos a intervenção de parâmetros tecnológicos pode, em certos casos, atingir-se o efeito promotor máximo.

2.4.1. Mecanismos de acção

Os promotores da absorção incrementam a absorção dos fármacos através da pele por vários mecanismos e o estudo ao nível molecular dessas acções tem ajudado a esclarecer esses fenómenos.

Assim, utilizam-se frequentemente promotores como forma de aumentar a solubilidade do fármaco no veículo (79,80,81).

Por outro lado, odem facilitar a penetração de componentes do veículo na pele para promover a partilha do fármaco no tecido de forma a criar o "efeito reservatório". A utilização da pirrolidona é frequentemente citada como exemplo deste tipo (82).

Concomitantemente podem promover a hidratação do estrato córneo de modo a formar canais polares que facilitam a difusão dos fármacos. Todavia, esta hipótese foi posta em causa após realização de um estudo no qual foi utilizada pele depilada de rato durante 140 horas, dado que a integridade das membranas fisiológicas "in vitro", para além das 50 horas, se torna questionável (83,84).

O etanol em concentrações superiores a 50% tem sido apontado como responsável pela formação de poros no estrato córneo, embora este efeito possa ser atribuído às propriedades extractivas dos lípidos pelos alcanóis (85,86).

O mecanismo de transporte facilitado através do estrato córneo tem sido sugerido para explicar a difusão de moléculas de natureza iónica (87). Pela modificação do pH pode ocorrer a ionização do fármaco. Aniões como o salicilato podem ser transportados para o interior da pele através do respectivo gradiente de concentração.

A teoria da partilha proteico-lipídica (LPP) tem sido apontada como potencial mecanismo de acção dos promotores da absorção (88,89,90,91).

De acordo com o exposto, pode considerar-se que os promotores da absorção actuam por um ou mais dos seguintes mecanismos:

- **Ruptura da estrutura altamente organizada dos lípidos componentes do estrato córneo.**
- **Interacção com as proteínas intracelulares.**
- **Promoção da partilha do fármaco ou actuação como co-promotor ou co-solvente no estrato córneo.**

2.4.2. Substâncias com reconhecida capacidade para promover a absorção dos fármacos

2.4.2.1. Sulfóxidos e compostos similares

O dimetilsulfóxido (DMSO) foi, provavelmente, o composto que mais despertou o interesse dos investigadores no que concerne à sua utilização como promotor da absorção. É um solvente aprótico, incolor, inodoro e higroscópico.

A dimetilformamida (DMF) e a dimetilacetamida (DMA) são outros solventes que desde os anos 60, tal como o DMSO, foram utilizados para acelerar a penetração de vários produtos, nomeadamente antifúngicos, antibióticos, esteróides, anestésicos locais e salicilatos (92). A partir de 1983 toda a literatura referente a estes solventes em geral e, especialmente, ao

DMSO, foi reunida por Barry e mais recentemente outros estudos, apresentados no (Quadro V), foram efectuados com o sulfóxido .

Embora o DMSO evidencie um excelente poder acelerador na penetração de várias substâncias, há provas da existência de efeitos indesejáveis associados ao seu uso.

A actividade do DMSO é dependente da sua concentração (93,94). Uma resposta positiva requer, geralmente, concentrações acima dos 60% o que torna problemática a sua utilização se atendermos aos seus efeitos negativos sobre a pele. Estão descritos estudos que responsabilizam o sulfóxido pela ocorrência de manifestações de toxicidade. A formação de eritemas e de pápulas, lesões irreversíveis na pele, alterações no estrato córneo e desnaturação das proteínas constituem alguns exemplos do que atrás foi referido (95,96).

Todos estes efeitos negativos que foram apontados para o DMSO implicaram que a sua utilização fosse interrompida no uso clínico e levassem os investigadores a procurar um derivado estruturalmente idêntico.

As séries homólogas de alquilmetilsulfóxidos foram apontadas como potenciais promotores da absorção (97).

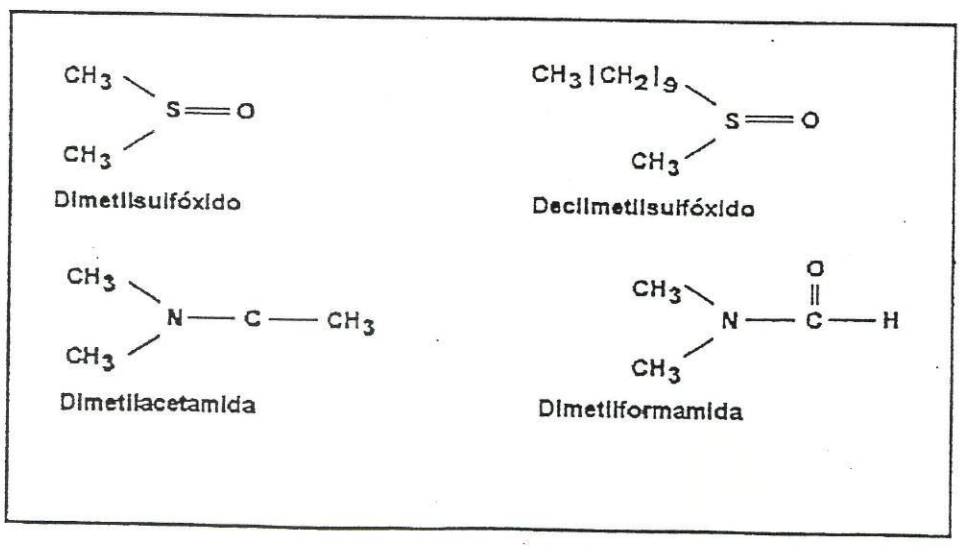


fig.15. Solventes promotores

Quadro V - Resumo de Alguns Estudos sobre o Efeito Promotor do DMSO

ESTUDO	FÁRMACO	DMSO concentração/veículo	MEMBRANA	TEMPERATURA (°C)	E.P.
Hwang and Danti (98)	Ácido Flufenamico	5%/vaselina	Coelho *in vivo*	Ambiente	3
Spruance *et al.* (99)	Acyclovir	100%	Cobaio *in vitro*	Ambiente	3
Spruance *et al.* (100)	Acyclovir	100%	Cobaio *in vitro*	Ambiente	3
Spruance *et al.* (101)	5-etil-2' -desoxiuridina	95%	Cobaio *in vitro*	25	19
Aungst *et al.* (102)	Naloxona	10%/propilineglicol	Humana *in vitro*	37	1
Kurihara-Bergstrom *et al* (103)	Metanol	100%	Ratinho depilada *in vitro*	37	20
Kurihara-Bergstrom *et al.* (104)	Vidarabina	30%	Ratinho depilada *in vitro*	37	1
		50%			14
		75%			23
		100%			32
Winfield and Taylor (105)	1-hexanol	100%	Rato *in vitro*	37	9

E.P.- **Efeito Promotor**

Ao que tudo indica, o mais potente de todos eles parece ser o decilmetilsulfóxido (DCMS) (fig.15) que, para além de promover com êxito a penetração das substâncias, evidencia reversibilidade da acção. É considerado um bom promotor da absorção para moléculas hidrófilas e moléculas ionizadas, mas o mesmo já se não verifica para compostos lipófilos (106).

O mecanismo de acção dos sulfóxidos é caracterizado pelo seu poder dissolvente que altera a permeabilidade das membranas celulares. Em 1965 Muset e col. demonstraram por análise espectral que a mistura de DMSO com ácido oleico e linoleico origina mudança na configuração isomérica, convertendo-se os derivados *cis* em *trans* . Esta modificação altera a geometria molecular da estrutura lipídica das membranas celulares (107).

A DMF é também, como já foi dito, um solvente com capacidade para acelerar a penetração de substâncias como o octanol, aumentando o coeficiente de permeabilidade através da pele "in vitro" aproximadamente 3 vezes e para a cafeína cerca de 12 vezes (108).Um outro estudo "in vitro" refere que a DMF aumenta o fluxo da aspirina através de pele humana cerca de 4 vezes. A biodisponibilidade do 17-benzoato de betametasona duplica na presença da DMF (109).

De experiências feitas no Laboratório de Tecnologia da Faculdade de Farmácia do Porto, utilizando membranas epidérmicas artificiais (SARTORIUS) e pele depilada de cobaio, verificou-se que a um sucessivo aumento da concentração da DMF correspondia igualmente um aumento da quantidade de fentiazac difundido. Quanto maior a concentração da DMF maior o seu poder dissolvente, mas as membranas epidérmicas artificiais, no fim de cada experiência, apresentavam fissuras por onde passava o anti-inflamatório (110).

Ao que tudo indica, mediante estudos "in vivo", a DMF provoca alterações irreversíveis nas membranas, circunstância que está a ser esclarecida pelos investigadores em voluntários humanos (109).

"In vitro" a DMA, tal como a DMF, promove a penetração de substâncias como a griseofulvina e a hidrocortisona, embora de uma forma menos activa que o DMSO (111,112).

Num estudo "in vitro" foi constatado que a DMA numa mistura a 10% com propilenoglicol aumentava em 25% o fluxo da naloxona (antagonista de narcóticos) através de

pele humana (113).

2.4.2.2. Pirrolidonas

Nos últimos 10 anos, as pirrolidonas e seus derivados (fig.16) receberam considerável atenção por serem consideradas potenciais promotores da penetração cutânea e auxiliarem a formação de reservas das substâncias retidas na camada córnea e unhas.

Usando séries de pirrolidonas alquil-substituídas, Sasaki et al. monitorizaram "in vitro" e "in vivo" a permeação transdérmica e a acumulação destes promotores e um permeante modelo (vermelho de fenol) na pele de rato (114). Este estudo permitiu verificar que a acumulação na pele do modelo permeante e as pirrolidonas é dependente da concentração (115). Através da combinação da N-metilpirrolidona (NMP) com 1-lauril-2-pirrolidona, em veículo para libertação transdérmica, a permeação do vermelho de fenol e do 5-fluoroacilo é extraordinariamente aumentada (116).

Apesar de se reconhecer às pirrolidonas uma marcada actividade aceleradora da penetração, o seu uso está comprometido, atendendo ao facto destas substâncias induzirem fenómenos de irritação, toxicidade e dor.

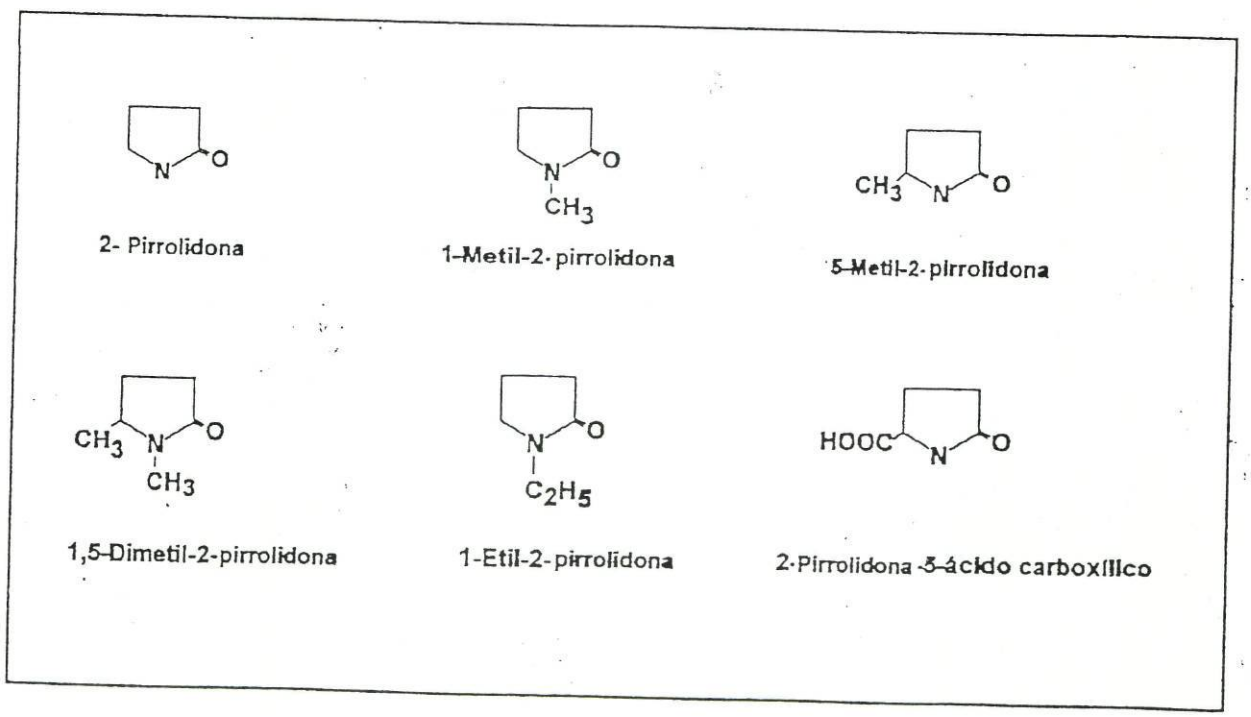


fig.16. Pirrolidona e derivados

2.4.2.3. Ácidos gordos, alcoóis e glicóis.

Existem vários estudos que apontam estes compostos como sendo susceptíveis de incrementar a penetração de substâncias através da pele.

Cooper, por exemplo, refere a capacidade promotora de ácidos gordos de longa cadeia e de alcoóis sobre compostos lipófilos como o ácido salicílico (117).

A utilização de misturas binárias de ácidos ou álcoois gordos com propilenoglicol apresenta um efeito sinérgico acentuado. Foi verificado que o ácido oleico em propilenoglicol incrementava a biodisponibilidade de esteróis como o 17-benzoato de betametasona, e que utilizando o ácido associado a um veículo inerte (dimetilisossorbido) não se verificava esse aumento (109).

Outros estudos "in vivo" demonstraram que a associação de ácido oleico ao propilenoglicol (Fig.18) promove a penetração de substâncias como a nicardipina em macacos e da azidotimidina (AZT) em ratos (118,119).

O resultado desta associação é nitidamente menos notório quando se trata de ácidos gordos saturados, pelo facto dos ácidos gordos de longa cadeia serem insolúveis em propilenoglicol.

Por técnicas calorimétricas justifica-se que estes sistemas binários fluidificam os lípidos do estrato córneo, permitindo uma mais rápida difusão das substâncias. Porém, um estudo no qual foi utilizado ácido oleico deuterado e lípidos do estrato córneo, possibitou a verificação de que à temperatura de 60 °C o ácido oleico não apresentava grande significado na estrutura lipídica da pele (120). Este facto contraria um pouco a teoria anteriormente apontada relativamente à fluidificação macroscópica dos lípidos cutâneos, a qual põe em destaque a capacidade promotora do ácido oleico. Contudo, os autores propõem um modelo heterogéneo de lípidos em que o ácido oleico ocuparia uma região de "fluidez", criando espaços que permitiriam a passagem de outras substâncias.

Outros ácidos gordos são usados como promotores. Num trabalho em que se procurou estudar a influência do comprimento, ramificação, bem como o grau de saturação das suas

cadeias na capacidade aceleradora da penetração, as investigações demonstraram que o ácido láurico era de todos os ácidos gordos o que maior efeito promotor exercia, concluindo-se igualmente que a presença de ligações duplas em *cis* nas cadeias alquílicas potencializa a actividade aceleradora do ácido gordo (121).

Os ácidos gordos e seus ésteres são considerados autênticos promotores da absorção que actuam a dois níveis. Por um lado provocam dano nas membranas e por outro aumentam a solubilidade das substâncias no veículo.

Golden et al., através de um estudo "in vitro" com uma série de isómeros de ácido gordo com 18 átomos de carbono, referem que os ácidos *cis* mono-insaturados centralmente, aceleram o fluxo de substâncias como o ácido salicílico, fluorbiprofeno e benzoato de betametasona através de pele de porco. Este acréscimo do fluxo deve-se, segundo os autores, ao aumento da fluidez lipídica.

O mecanismo de "push-pull" foi proposto para justificar a capacidade dos ácidos alcanocarboxílicos provocarem um aumento da absorção de substâncias como a teofilina e a adenosina (122,123). O excesso de energia livre na fase dadora mantém máxima a actividade termodinâmica dos fármacos (efeito "push") e os aceleradores promovem a sua solubilização na pele (efeito "pull").

2.4.2.4 Azona e derivados.

A Azona ou laurocapramo (1-dodecilazaciclohептano-2-ona) é uma molécula especificamente designada como promotor de absorção pela Nelson Research and Development Co.

Como se pode verificar (fig.17) este composto é um híbrido de uma amida cíclica, como é o alquilsulfóxido nas pirrolidonas. Esta substância é levemente irritante mas activa em pequenas concentrações (0,1-5%). Tal como o ácido oleico, a escolha do co-solvente é um importante factor a considerar na actividade da Azona.

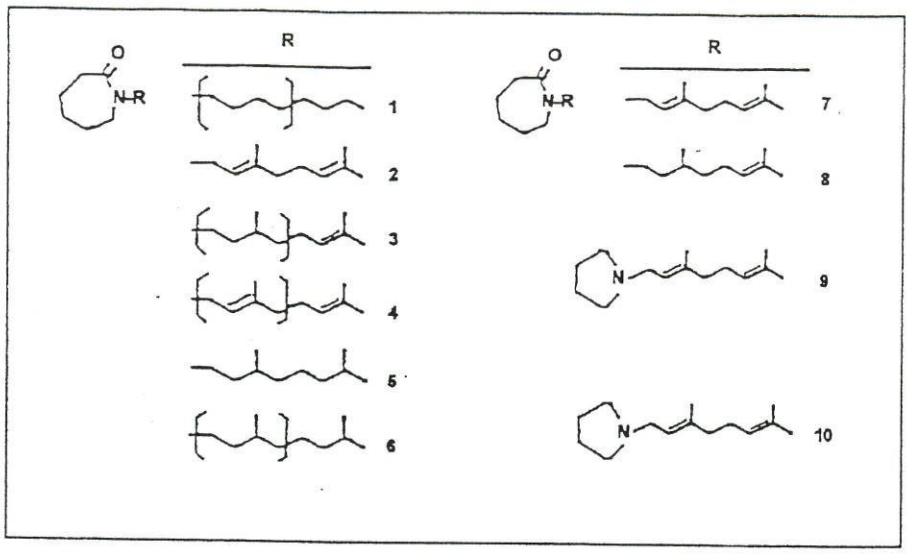


fig.17. Azona e derivados

Alguns solventes polares como o propilenoglicol apresentam sinergismo de acção com a Azona (fig.18) (124,125).

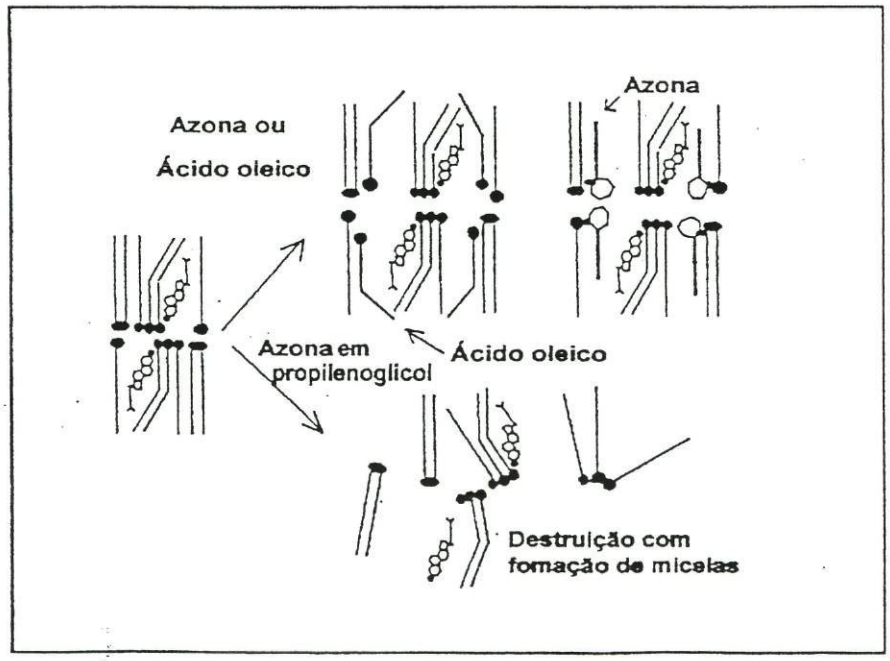


fig.18. Sinergismo de acção do propilenoglicol relativamente à azona e ao ácido oleico.

A sua capacidade promotora é dependente da concentração e foi já demonstrada com diferentes grupos de compostos desde antifúngicos, antivíricos, antibacterianos, esteróides e até mesmo pró-fármacos (126,127,128). Chow et al. verificaram que concentrações de Azona acima de 10% diminuem acentuadamente a absorção (129).

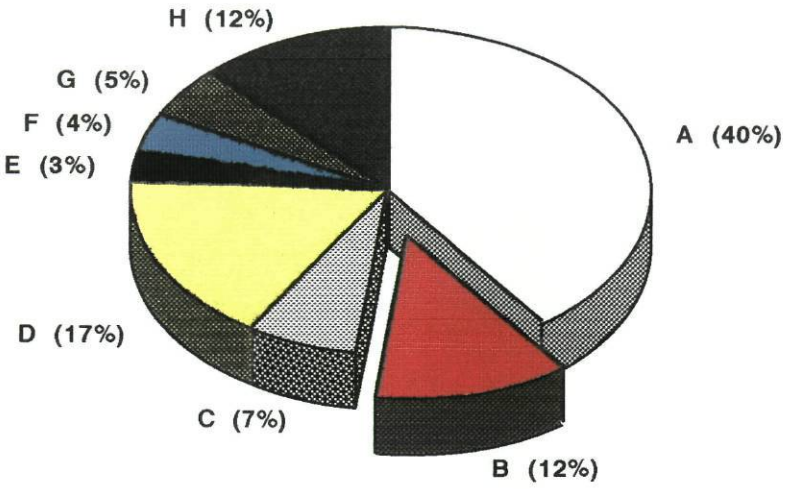
Têm sido sintetizados vários derivados da Azona, alguns deles permitindo a obtenção de resultados bastante positivos na permeação do aciclovir, por exemplo, através da pele depilada de rato (130,131,132). O estudo desses derivados permitiu ainda observar que os possuidores de uma cadeia terpénica de 10 carbonos e um grupo carbonilo no anel azaciclo, apresentam um efeito mais pronunciado na absorção. Os derivados com 20 carbonos na cadeia lateral terpénica diminuem a actividade aceleradora. Concluiu-se, igualmente, que as cadeias alquílicas induzem mais irritação primária do que as alquilénicas. Analisando a acção promotora e o poder irritante deve dar-se preferência aos derivados 2, 3 e 10 representados na (fig.17) (107).

A hidratação da pele parece não constituir o mecanismo principal para induzir a penetração. A hipótese de que a Azona e o monoleato de sorbitano podem alterar a difusão da água transcelular por modificação da estrutura do estrato córneo parece ganhar cada vez mais significado. De facto, a penetração da indometacina através da via anexial, aumenta consideravelmente na presença de qualquer um dos compostos referidos. Para além disso, a via transepidérmica (mais lenta), em condições de oclusão, pode contribuir também para tornar o mecanismo mais rápido, uma vez que na presença de água a resistência da camada córnea é evidentemente menor (133).

2.4.2.5. Ureia

A ureia é uma das substâncias constituintes do chamado Factor Hidratante Natural da Pele, conhecido por NMF (natural moisturizing factor) (fig.19).

Aminoácidos livres (40%), ácidos pirrolidonocarboxílicos (12%) e ureia (7%) são os componentes mais representativos do NMF havendo, no entanto, outros constituintes alguns dos quais ainda não identificados.



A. Aminoácidos livres **40%**

B. Ácidos pirrolidonocarboxílicos **12%**

C. Ureia **7%**

D. Amoníaco, ác. úrico,glucosamina, creatinina e outras subst. orgânicas ...**17%**

E. Magnésio e cálcio **3%**

F. Potássio **4%**

G. Sódio **5%**

H. Lactatos, cloretos, fosfatos, citratos e formiatos **12%**

fig.19. Factor hidratante natural da pele (NMF) - composição.

A ureia tem sido utilizada como agente hidratante no tratamento da ictiose, psoríase e outros estados de hiperqueratose. É também usada como queratolítico, especialmente após contacto prolongado e em concentração superior a 7% (134).

Woodford et al., referem que a actividade e biodisponibilidade da hidrocortisona é substancialmente aumentada na presença da ureia (135).

Beastall et al. através de um trabalho sobre a influência da ureia na absorção percutânea, demonstraram que esta substância promove o aparecimento de eritema induzido pelo hexilnicotinato (136).

Um estudo "in vivo"da indometacina realizado em coelhos permitiu verificar um aumento da absorção percutânea na presença da ureia (137). Todavia, 10% de ureia em propilenoglicol não promove o aumento da permeação "in vitro" da naloxona através de pele humana (113). Em solução aquosa a 10%, também não incrementa a permeação "in vivo" do nicotinato de benzilo (138).

Análogos da ureia, cíclicos e não saturados, têm vindo a ser sintetizados no sentido de serem utilizados como promotores em preparações transdérmicas (139). Verificou-se, entretanto, que na difusão da indometacina através de pele de cobra e pele depilada de rato, alguns desses compostos apresentam uma eficácia idêntica à Azona (140).

Compostos análogos à ureia com radicais arilo ou radicais alquilo substituídos em C_{12}, foram igualmente sintetizados para serem usados como promotores da absorção (141). Estes compostos juntamente com o propilenoglicol, contrariamente ao verificado com a ureia, mostraram perante um modelo de molécula hidrófila (5-fluoroacilo) um efectivo poder acelerador da sua permeação, em condições "in vitro", através de pele humana.

2.4.2.6. Tensioactivos

Os tensioactivos são largamente utilizados em formulações farmacêuticas, pesticidas e cosméticas.

Há já algum tempo que o seu estudo como promotores de absorção tem vindo a merecer grande curiosidade por parte dos investigadores.

Os tensioactivos em solução aquosa tendem a formar micelas quando a sua concentração atinge a concentração micelar crítica (CMC) (110). A capacidade destas micelas incluirem no seu interior moléculas pouco solúveis em água possibilita a sua solubilização, facilitando assim a passagem de substâncias através das membranas ou dos espaços intercelulares. Uma vez transposta a barreira, é desejável a disponibilidade dessas substâncias para haver eficácia do efeito pretendido. Porém, a libertação só se efectua quando é quebrada a estrutura micelar ou desfeita de algum modo a ligação com o tensioactivo. Esta transição depende da maior ou menor influência das modificações sobre a energia do sistema

administrado, perante as novas condições inerentes ao meio fisiológico. Depreende-se, portanto, que a concentração do tensioactivo relativamente à CMC se reveste de extraordinária importância no que respeita à penetração, pois esta varia consoante aquela não é atingida ou é ultrapassada.

Os tensioactivos ao baixarem as tensões interfasiais promovem a absorção pela via anexial.

A resistência evidenciada pela camada córnea é particularmente reduzida pela presença de tensioactivos aniónicos por alteração das hélices da ceratina e ainda porque reagem com os locais de ligação.

A actividade catalisadora dos tensioactivos iónicos depende, fundamentalmente, da destruição das membranas epidérmicas que originam, pois tendo afinidade com as α-proteínas, como a ceratina, ao complexarem com elas provocam a desnaturação reversível e a distensão dos filamentos. A expansão da membrana causa a formação de cavidades e a perda da capacidade de ligação à água, que resulta da conversão da α-ceratina em β - ceratina (107).

Outro aspecto a considerar é a configuração das moléculas dos tensioactivos, já que interfere com a sua capacidade promotora da absorção. A actividade aceleradora de penetração é aumentada se a cadeia hidrófila incluir pelo menos 5 unidades de óxido de etileno, indicativo de um EHL característico dos agentes O/A (107).

Tem-se verificado, no entanto, a diminuição de fluxos de penetração quando presentes alguns agentes não iónicos. Essa redução parece resultar da baixa concentração da substância a penetrar, a qual vai sendo retida nas micelas devido ao grande poder solubilizante exercido pelas cadeias com muitas unidades polioxietilénicas (142).

O aumento da penetração por intermédio de tensioactivos não iónicos com concentrações abaixo da CMC parece dever-se à sua própria concentração. Aumentando a concentração haverá correspondente elevação do grau de penetração do agente, resultando daí uma interacção pele/tensioactivo. Para além disso, as alterações verificadas ao nível da resistência das membranas fazem aumentar a penetração de outros compostos dissolvidos no veículo (143).

Um estudo refere que os tensioactivos catiónicos e os aniónicos, como o laurilsulfato

de sódio, proporcionam o aumento da penetração, mas são altamente irritantes para a pele porque originam edemas e interferem com a ceratina (82.

Eagle et al., verificaram que o dano provocado por dois agentes iónicos bivalentes pode ser inibido ou substancialmente reduzido se estiverem associados em concentrações equimoleculares com um agente não iónico (144). Os tensioactivos não iónicos não apresentam declaradamente efeitos lesivos na pele.

O fluxo da hidrocortisona e da lidocaína através da pele de rato depilada é aumentado pelo Tween 20 (145,146). Estudos recentes não confirmaram ser generalizada a capacidade promotora deste tensioactivo, já que ela não se verificou para a penetração "in vivo" da nicardipina em macacos e do 5-fluoroacilo através da pele humana e pele de cobra (90,118,147).

Um estudo "in vitro" em que foram utilizadas membranas epidérmicas artificiais (SARTORIUS) e pele depilada de cobaio, permitiu verificar um aumento da difusão do fentiazac incorporado num gele de carbopol contendo determinadas concentrações de Tween 80 (110).

Julgamos que os resultados contraditórios que se têm verificado com os Tween podem ser devidos à selecção das membranas utilizadas nas experiências.

2.4.2.7. Ésteres e amidas do ácido clofíbrico

Num estudo "in vitro" realizado com duas espécies animais (ratos e cobaios), foram utilizados ésteres e amidas do ácido clofíbrico (fig.20) no sentido de ser avaliada a respectiva capacidade aceleradora da absorção percutânea (148).

Nesse trabalho foi confirmada a capacidade promotora da absorção desses derivados do ácido clofíbrico sobre a hidrocortisona, através do aumento verificado nos coeficientes de permeabilidade.

As amidas evidenciaram um efeito acelerador mais pronunciado que o dos ésteres com idêntica cadeia alquílica.

Comparativamente à Azona, a velocidade de permeação da hidrocortisona em presença da octilamida do ácido clofíbrico é menor. No entanto, os resultados dos ensaios realizados por um período de 24 horas revelaram maior eficácia promotora da amida.

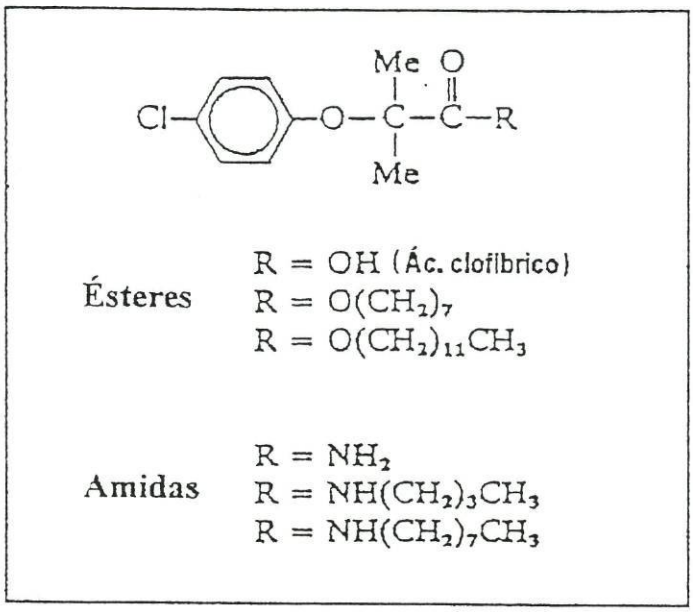


fig.20. Ésteres e amidas do ácido clofíbrico

2.4.3. Meios físicos

Os ultrassons e a iontoforese representam meios físicos que permitem um aumento da penetração das substâncias através das membranas.

A iontoforese possibilita a permeação de moléculas ionizadas pela influência da corrente eléctrica. Esta técnica tem sido explorada com o objectivo de tornar possível a permeação de substâncias incapazes de penetrar mesmo na presença de agentes químicos, como é o caso dos peptídeos e das proteínas (149).

2.4.4. Conclusão

O estrato córneo constitui, como já foi referido, uma efectiva barreira à penetração de fármacos, justificando por isso a importância que merece, actualmente, o estudo da influência e mecanismos de acção dos promotores de absorção.

A grande variedade de substâncias utilizadas pelos investigadores e a complexidade que envolve os fenómenos da penetração cutânea, impedem que os mecanismos de acção estejam perfeita e completamente estabelecidos.

As técnicas analíticas mais recentes de difractometria, espectrometria e calorimetria (XRD, FTIR DSC) têm proporcionado um grande avanço na resolução do problema dos mecanismos de absorção sobretudo a nível molecular (150).

II - PARTE EXPERIMENTAL

1. INTRODUÇÃO
2. FORMULAÇÃO
3. ENSAIOS DE DIFUSÃO
4. VERIFICAÇÃO DO GELE DE FENTIAZAC (F8)
5. REOLOGIA
6. ESTABILIDADE
7. ENSAIOS "in vitro" E "in vivo"
8. EFEITO PROMOTOR

II - PARTE EXPERIMENTAL

1. INTRODUÇÃO

A utilização de preparações tópicas para aplicação na pele reveste-se de grande importância para promover a absorção de princípios activos, nomeadamente com acção anti--inflamatória.

Atendendo a que o recurso à via cutânea é muitas vezes utilizado como alternativa, e frequentemente como complemento, de outras vias de administração, o estudo da absorção de fármacos justifica-se plenamente.

Como já anteriormente foi referido, a absorção percutânea depende de factores fisiológicos tais como a integridade da pele, o débito sanguíneo cutâneo, o local da absorção, o grau de hidratação e a temperatura. Depende igualmente de outros factores inerentes à própria formulação como, por exemplo, a natureza e o tipo de excipiente, com especial destaque para a presença de tensioactivos e outros promotores de absorção, e também das suas características reológicas.

Existem numerosos trabalhos que provam efectivamente a capacidade do excipiente modificar a velocidade de penetração de um fármaco através do estrato córneo, ou seja, a sua biodisponibilidade.

Partindo desse princípio, entendeu-se que seria de interesse proceder ao estudo sobre a velocidade de absorção cutânea do fentiazac veiculado em preparações gelificadas à base de Carbopol, e verificar a influência de algumas substâncias adicionadas ao veículo, apontadas como potenciais aceleradores da penetração.

Procedeu-se também à análise reológica de um gele contendo fentiazac, nomeadamente no que respeita ao tipo de escoamento e às características de viscoelasticidade, procurando relacionar estes parâmetros com a estabilidade da preparação e a cedência do princípio activo em função do tempo e temperatura de armazenagem.

1.1. Fentiazac

O fentiazac (Fig.21), quimicamente designado por ácido 4-(p-clorofenil)--2-fenil-5-tiazolacético, é um anti-inflamatório não esteróide. Foi sintetizado pela primeira vez em 1966 a partir da reacção de ciclização da tiobenzamida com o ácido 3-bromo-(4-clorobenzoil)propiónico, de acordo com o método de Hantzch (151,152).

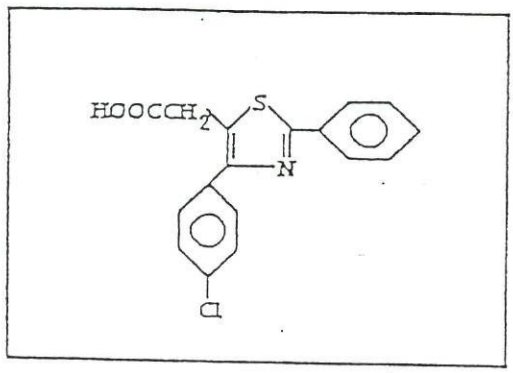


fig.21. fentiazac

Este composto apresenta propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas, e a sua actividade foi já comprovada em diversos modelos experimentais. Integra-se no grupo dos ácidos carboxílicos e no sub-grupo dos derivados do ácido acético, sendo um composto não esteróide que intervém na síntese das prostaglandinas actuando provavelmente por inibição da cicloxigenase (153,154,155,156).

Apresenta baixa toxicidade podendo no entanto revelar algum grau de ulcerogenia, além de outros efeitos secundários como o eritema, prurido e cefaleias.

Em Portugal é comercializado com as designações de Donorest (drageias e supositórios), IDR (drageias, supositórios e creme), Norvedan 200 (drageias), Norvedan 400 (supositórios), Norvedan E (drageias) e Norvedan Creme (157).

1.2. Carbopol

O Carbopol (Fig.22), também designado por carboxipolimetileno, é um polímero do ácido acrílico obtido por síntese química, que apresenta elevado peso molecular e contém na sua composição 56-68% de grupos carboxílicos e aproximadamente 0,75-2% de alquilsacarose (158,159).

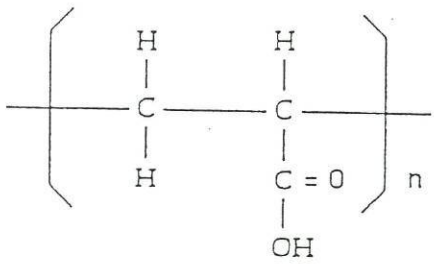


fig.22 Estrutura química do Carbopol

Existem algumas variedades de polímeros que diferem principalmente no peso molecular e no grau de neutralização. São diferenciados comercialmente por números (ex: C-910; C-934; C-940; C-941; C-960; C-961; C-1342). A fórmula empírica que foi estabelecida corresponde a -($C_3H_4O_2$)x (-C_3H_5 - sacarose)y-. As variedades 960 e 961 são polímeros já neutralizados e o Carbopol 1342 é anfifílico. Em dispersão aquosa as variedades ácidas a 1% apresentam um valor de pH próximo de 3.

Consoante se procede à neutralização com hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, bicarbonato de sódio, bórax ou com etanolaminas, aumenta a viscosidade até geles firmes e transparentes entre pH 6 e 11. Este fenómeno é justificado pelo facto da transformação química da passagem de ácido a sal provocar um desenrolamento das cadeias poliméricas proporcionando à estrutura, então distendida, maior eficácia como espessante.

Este excipiente faz parte de muitas preparações farmacêuticas líquidas e semi-sólidas, sendo menos utilizado em formas sólidas.

Em Tecnologia Farmacêutica, o Carbopol é usado principalmente como agente emulsionante, suspensor, gelificante e clarificante (soluções extractivas).

As vantagens do ponto de vista reológico deste produto (grande viscosidade em baixas concentrações, possibilidade de diversos graus de viscosidade e escoamento, bioadesividade, etc.), o facto de apresentar boa compatibilidade com um grande número de fármacos e promover o aumento de biodisponibilidade e ainda a excelente tolerância cutânea que evidencia determinaram a sua preferência para a execução deste trabalho.

Foram utilizados o Carbopol 934 e o Carbopol 940 na preparação das formulações e recorreu-se a uma solução de hidróxido de sódio a 1% e à trietanolamina para a neutralização, tendo a escolha final incidido sobre a primeira base, fundamentalmente por duas razões: primeiro porque as etanolaminas habitualmente utilizadas, como a trietanolamina, podem originar nitrosaminas com potencialidade carcinogénica, e depois porque os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram maiores níveis de cedência do fentiazac, quando é utilizado como agente neutralizante a solução aquosa de hidróxido de sódio a 1%.

2. FORMULAÇÃO

2.1. Objectivo

Atendendo a que a dose oral do fentiazac pode atingir 800 mg/dia, é fácil admitir que a quantidade biodisponível, após aplicação tópica, ficará muito aquém daquele valor. De facto, a biodisponibilidade do fentiazac por via cutânea é fraca.

Esta circunstância obrigou à preparação e ensaio de diversas formulações na tentativa de obter bom nível de cedência do anti-inflamatório e também boa qualidade no que respeita à estabilidade e características sensoriais da preparação final.

Inicialmente foi preparado um gele de polioxietilenoglicóis correspondente à formulação base da pomada de nitrofurazona do Formulário Galénico Nacional. Este

veículo apresenta consistência apropriada e não fluidifica com a incorporação do Fentiazac. Apesar disso, esta formulação foi posteriormente excluída uma vez que o produto final se apresentava demasiado adesivo e pegajoso.

Finalmente pensou-se numa preparação gelificada à base de Carbopol, tendo sido preparadas e ensaiadas oito formulações que se encontram indicadas no **Quadro VI.**

2.2. Preparação das formulações.

Técnica: Dispersar o Carbopol em parte da água e adicionar agente de neutralização (solução aquosa de hidróxido de sódio a 1% ou trietanolamina) até obter pH 7,0. Dispersar a metilcelulose em água aquecida a 60 ^{o}C. Deixar arrefecer e misturar com o gele de Carbopol (**F6**, **F7** e **F8**). Preparar as respectivas soluções de conservante com o propilenoglicol e álcool de 95^{o} (**F1** e **F3**), com a glicerina e o álcool (**F2**), com o propilenoglicol e o carbowax aquecidos a 60 ^{o}C (**F4** e **F5**) e com o propilenoglicol (**F6**, **F7** e **F8**) e juntar a cada mistura o fentiazac. Adicionar a água restante e homogeneizar.

	Quantidades em gramas							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Fentiazac	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Carbopol 940	-	-	-	0,500	0,250	0,250	0,250	0,250
Carbopol 934	3,700	3,700	2,500	-	-	-	-	-
Metilcelulose 400	-	-	-	-	-	3,300	2,200	2,200
Carbowax 4000	-	-	-	1,500	1,500	-	-	-
Propilenoglicol	28,000	-	25,000	14,000	14,000	13,300	13,300	13,300
Glicerina	-	28,000	-	-	-	-	-	-
Álcool 95°	28,000	28,000	28,000	-	-	-	-	-
Sol. aquosa NaOH 1% q.b.p.	-	-	-	pH 7,0	pH 7,0	pH 7,0	-	pH 7,0
Trietanolamina q.b.p.	pH 7,0	pH 7,0	pH 7,0	-	-	-	pH 7,0	-
Metilparabeno	0,025	0.025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Água destilada q.b.p.	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000

Quadro VI - Composição das formulações estudadas.

3. ENSAIOS DE DIFUSÃO

3.1. Estudo da cedência do fentiazac "in vitro".

O estudo da velocidade de cedência do fentiazac "in vitro" incorporado em diferentes veículos foi efectuado, recorrendo a uma célula de difusão (Fig.23) à qual se aplicaram membranas sintéticas que procuram simular a absorção "in vivo".

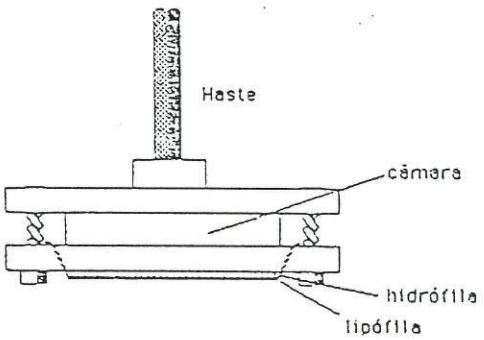


fig. 23. Célula de difusão

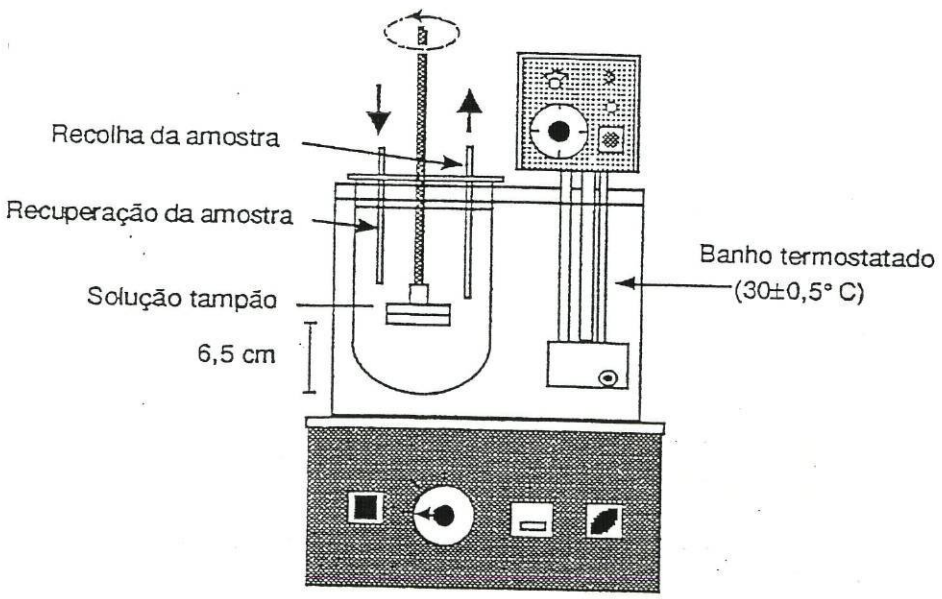


fig. 24. Aparelho de dissolução (F.P.V)

3.2. Material e métodos

3.2.1. Aparelhagem

- Aparelho de dissolução de formas farmacêuticas orais sólidas oficializado na F.P.V a cuja haste se adaptou uma câmara apropriada para colocação da amostra (fig.24)

- Estufa - (Horo) - Dr. Ing. A. Hofmann.

- Balança de Precisão - Mettler AE 200.

- Placas de Petri.

- Espectrofotómetro Hitachi U-2000.

- Potenciómetro - Methrohm/605.

3.2.2. Reagentes

- Solução tampão de fosfatos pH 7,0 (USP XXI).

- Componente lipídico N (composição não indicada pela firma produtora) para impregnação da membrana lipófila.

3.2.3. Membranas epidérmicas artificiais (SARTORIUS)

As membranas artificiais que se destinam a simular a pele são constituídas por duas camadas: uma membrana hidrófila e um septo filtrante, tipo RS - modelo SM 16754.

3.2.3.1. Preparação das membranas

- ***Membrana hidrófila*** - colocar em contacto com água durante cerca de 3 horas para obter a hidratação completa.

- ***Membrana lipófila*** - pesar 4 g de componente lipídico N, previamente aquecido a 40 ^{o}C em estufa. Transferir para placa de Petri. Determinar o peso do septo filtrante e

colocar em contacto com a substância lipídica até que fique transparente. Deixar escorrer o excesso de líquido e secar a membrana entre dois papeis de filtro. Repetir este procedimento usando outros papeis de filtro secos. Pesar o filtro novamente para controlar o aumento de peso, que deverá estar compreendido entre 90-105% do peso inicial.

Para evitar a solidificação do componente N manter a temperatura acima de 24 ºC.

Imediatamente após a preparação, juntar as duas camadas de maneira concêntrica exercendo ligeira pressão (fig.25).

Aplicar esta membrana directamente na câmara com a parte hidrófila voltada para a amostra.

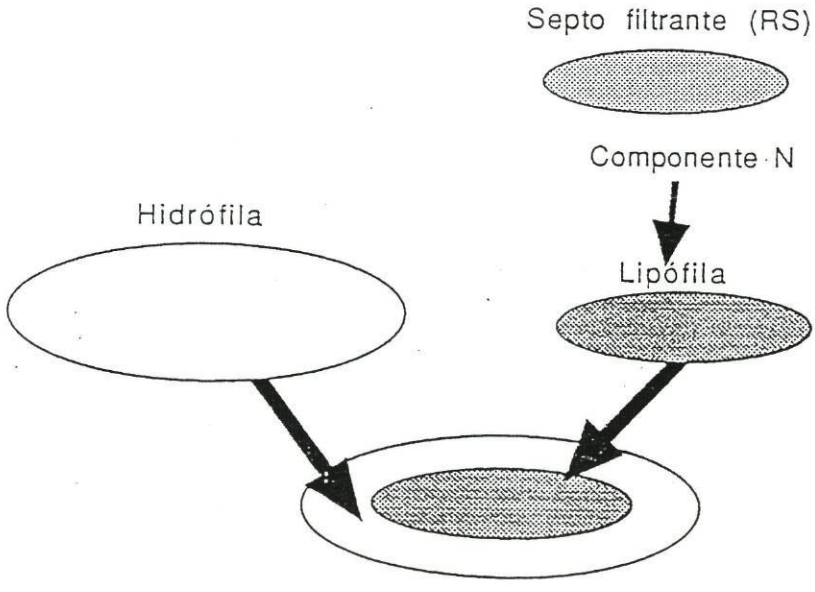


fig.25. Aplicação das membranas artificiais

3.2.4. Processo analítico.

- ***Testemunha*** - Pesar 378 mg de pomada para um balão volumétrico de 1000,0 ml contendo solução tampão de pH 7,0. Agitar ao abrigo da luz durante 6 horas a 37 ^{o}C e completar o volume com a solução anterior. Filtrar.

-***Amostra*** - Pesar 378 mg de pomada directamente para a câmara. Adicionar 1,5 ml de solução tampão de pH 7,0. Aplicar a membrana dupla, bem esticada, com a parte hidrófila directamente em contacto com a amostra. Mergulhar a câmara na fase receptora constituída por 1 litro de solução tampão de pH 7,0 submetida a uma agitação de 100 r.p.m. Retirar periodicamente 10 ml para doseamento e compensar com igual volume de fase receptora. Os valores das leituras obtidas foram adequadamente corrigidos, de acordo com a Eq.19 de modo a considerar o efeito de diluição acumulativa resultante da adição do volume de líquido de compensação na fase receptora após cada determinação. Efectuar a experiência ao abrigo da luz e trabalhar à temperatura de 37±1 ^{o}C.

$$\mathbf{A_{prob.} = A_n + 0{,}01\ (\Sigma A_{n-1})} \qquad \text{(Eq.19)}$$

em que:

$\mathbf{A_{prob.}}$ - Valor corrigido da absorvência da amostra.

$\mathbf{A_n}$ - Absorvência da amostra.

$\mathbf{\Sigma A_{n-1}}$ - Somatório das absorvências determinadas anteriormente.

-***Doseamento*** - Efectuar a determinação do teor em fentiazac por espectrofotometria na zona do U.V. em 244 nm, usando como branco a solução tampão

anteriormente indicada. Comparar a absorvência obtida com a do problema e com a do padrão.

Nota: Previamente verificou-se a possível interferência do excipiente neste doseamento, não se registando, contudo, qualquer influência.

$$Q\% = A_{prob.}/A_{pad.} \times 100 \qquad \text{(Eq.20)}$$

em que:

(Q%) - quantidade de princípio activo cedido em função do tempo, expressa em percentagem.

$A_{pad.}$ - valor da absorvência da solução testemunho.

3.3 Resultados e estudo estatístico.

O **Quadro VII** traduz o registo dos resultados dos ensaios realizados, agrupados de acordo com a formulação respectiva. Referem-se aos ensaios de cedência do Fentiazac incorporado em geles de Carbopol e estão expressos em:

- percentagem de Fentiazac cedido em função do tempo.
- área sob a curva (AUC).

A percentagem de princípio activo libertado em função do tempo é a forma mais simples de exprimir os resultados, permitindo simultaneamente uma fácil interpretação dos mesmos, em relação a uma só fórmula ou para comparação entre várias.

Quadro VII - Cedência de Fentiazac (%) durante 20 horas a partir de geles de Carbopol.

Tempo (horas)	Fentiazac cedido (%) F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,25	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,4 ± 0,3	0,0	0,9 ± 0,3	1,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	3,4 ± 0,4
0,5	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2	3,3 ± 0,7	1,2 ± 0,2	2,7 ± 0,4	4,3 ± 0,7	4,7 ± 1,1	6,5 ± 0,6
0,75	2,6 ± 0,2	1,4 ± 0,2	4,5 ± 0,9	2,8 ± 0,5	3,9 ± 1,2	7,5 ± 0,5	6,9 ± 0,9	9,7 ± 0,3
1	4,3 ± 1,0	2,0 ± 0,5	5,7 ± 1,3	3,3 ± 0,8	4,5 ± 1,3	9,3 ± 1,1	10,4 ± 2,3	12,3 ± 1,2
1,5	6,1 ± 0,9	3,6 ± 0,3	8,9 ± 1,1	5,6 ± 0,6	6,4 ± 1,5	14,1 ± 1,3	13,8 ± 2,1	15,5 ± 1,8
2	8,2 ± 1,4	5,3 ± 1,0	12,1 ± 1,7	7,6 ± 1,0	8,5 ± 0,9	16,3 ± 1,8	16,1 ± 1,9	21,9 ± 1,4
2,5	9,8 ± 1,2	6,8 ± 0,9	14,1 ± 2,1	8,4 ± 0,9	12,0 ± 1,8	19,8 ± 1,2	19,6 ± 3,1	27,4 ± 1,6
3	11,0 ± 1,9	9,2 ± 1,2	17,0 ± 0,9	9,5 ± 0,8	16,3 ± 2,1	24,5 ± 2,1	24,4 ± 3,0	32,2 ± 1,7
4	14,0 ± 2,0	11,8 ± 2,1	20,2 ± 2,3	11,6 ± 1,4	18,7 ± 2,2	32,0 ± 2,7	30,7 ± 3,2	41,5 ± 1,9
5	16,3 ± 1,8	14,5 ± 1,9	24,3 ± 2,8	15,3 ± 2,1	22,6 ± 1,9	37,2 ± 2,5	32,5 ± 2,9	50,5 ± 2,5
6	18,1 ± 2,4	17,6 ± 1,3	28,6 ± 2,9	18,2 ± 1,9	28,9 ± 2,4	42,9 ± 3,1	36,5 ± 3,4	57,6 ± 2,3
7	19,4 ± 2,1	19,1 ± 2,4	30,9 ± 3,1	23,2 ± 2,4	34,7 ± 2,7	48,6 ± 2,9	40,7 ± 4,1	64,6 ± 1,9
8	25,3 ± 2,2	22,6 ± 3,1	35,5 ± 2,8	27,8 ± 2,8	44,3 ± 3,2	53,8 ± 4,3	46,8 ± 3,9	70,4 ± 2,8
10	34,1 ± 3,4	30,5 ± 2,8	41,3 ± 3,2	34,5 ± 3,1	49,1 ± 3,0	58,9 ± 4,1	53,1 ± 4,2	78,2 ± 2,9
12	40,7 ± 3,2	34,1 ± 3,2	47,8 ± 3,9	37,8 ± 2,2	51,3 ± 4,1	62,8 ± 3,9	62,3 ± 3,2	81,9 ± 1,8
20	45,2 ± 3,5	43,3 ± 3,7	60,2 ± 4,1	40,9 ± 3,5	53,6 ± 4,3	69,3 ± 4,6	67,5 ± 3,8	85,6 ± 2,8
AUC (t=20h)	581,3 ± 52,1	517,9 ± 51,1	754,4 ± 61,7	552,2 ± 45,5	769,7 ± 62,3	1000,8 ± 68,1	948,4 ± 66,3	1294,2 ± 43,3

(±) - Intervalo de confiança = 95%
t - 0,05
N - 5

As áreas sob a curva foram calculadas pelo método trapezoidal, para um tempo de 20 horas por nós estabelecido. No sentido de simplificar a sua aplicação, o processo foi determinado na forma de programa, usando-se linguagem BASIC, funcionando num microcomputador da marca Macintosh modelo LC.

A análise estatística foi efectuada utilizando o critério de rejeição segundo a distribuição de Student. A variável **t** calculada, era comparada com o valor **t** fornecido pela tabela de Fischer, para p=0,05 e o número de graus de liberdade N=n-1, em que **n** é o número de amostras (160).

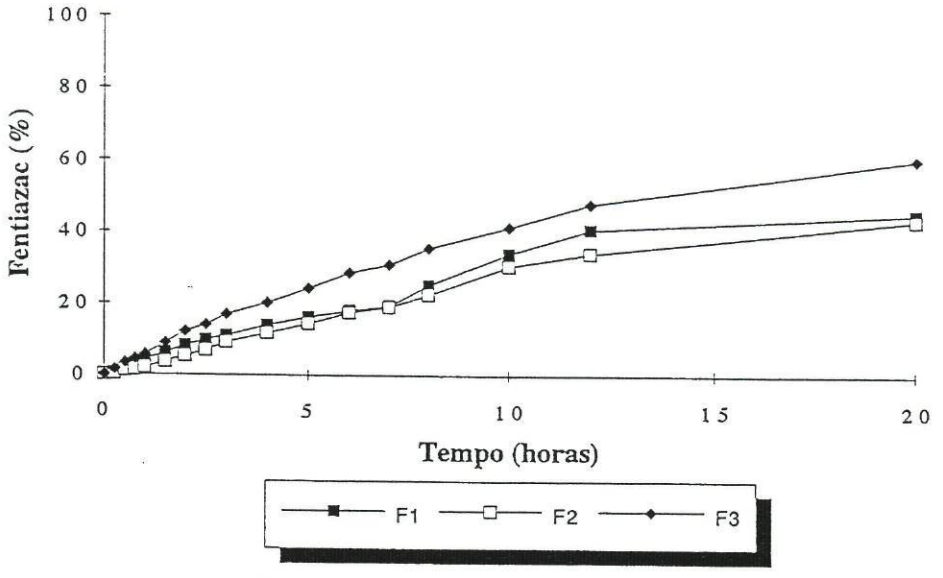


fig.26. Curvas de cedência do Fentiazac referentes às F1, F2 e F3 durante 20 horas.

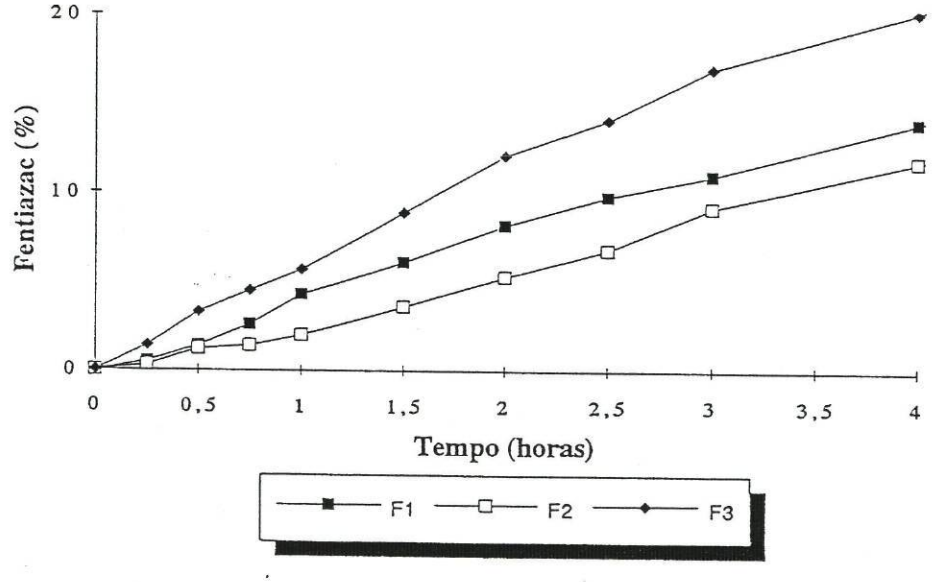


fig.27. Curvas de cedência do Fentiazac referentes às F1, F2 e F3 durante 4 horas.

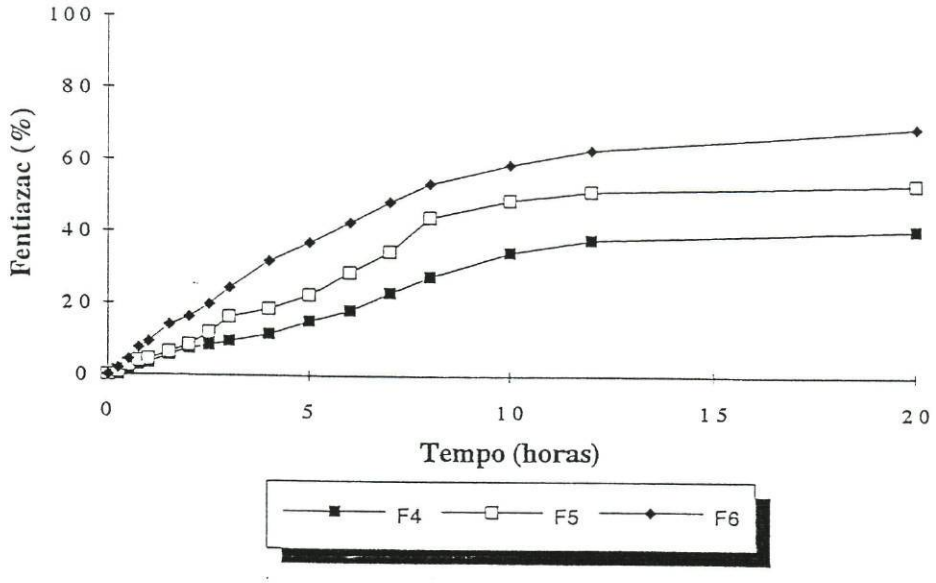


fig.28. Curvas de cedência do Fentiazac referentes às F4, F5 e F6 durante 20 horas.

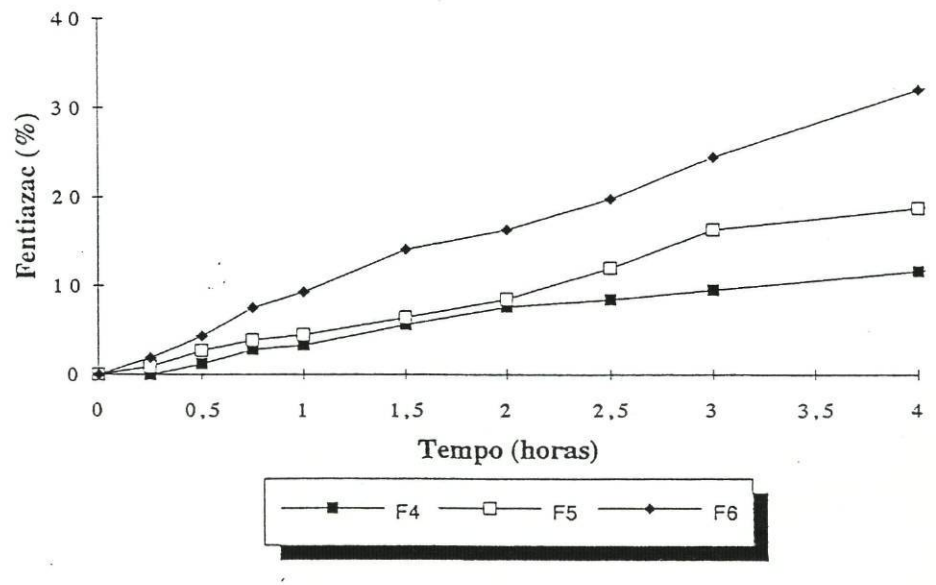


fig.29. Curvas de cedência do Fentiazac referentes às F4, F5 e F6 durante 4 horas.

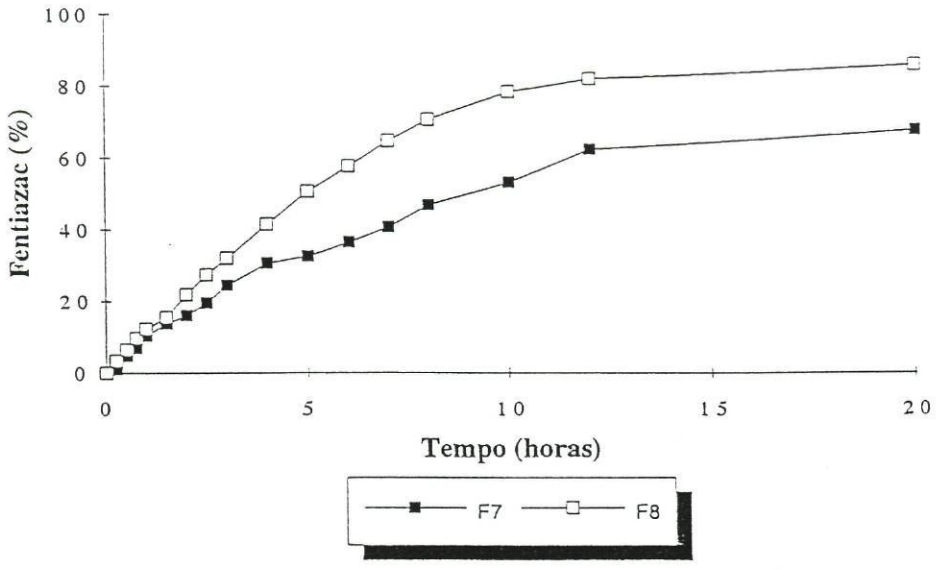


fig.30. Curvas de cedência do Fentiazac referentes às F7 e F8 durante 20 horas.

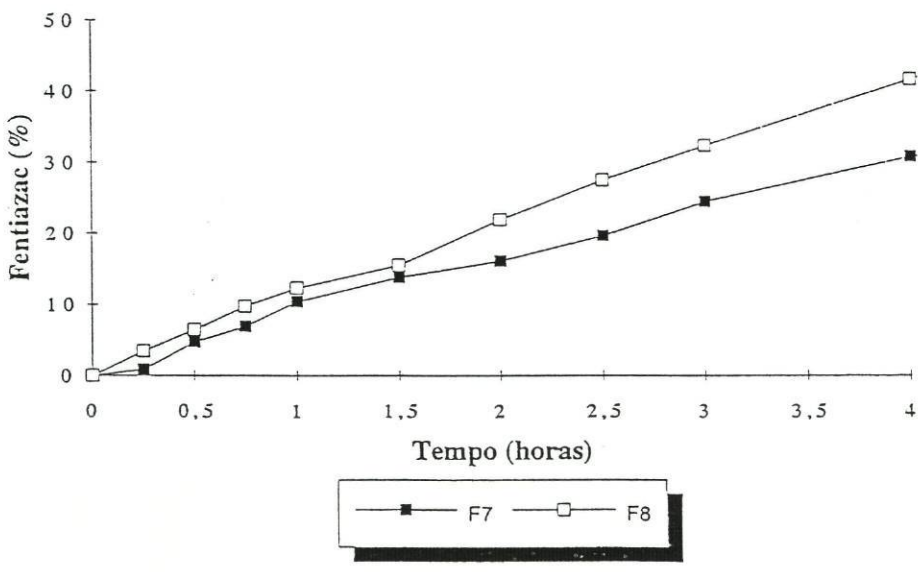


fig.31. Curvas de cedência do Fentiazac referentes F7 e F8 durante 4 horas.

3.3. Discussão de resultados

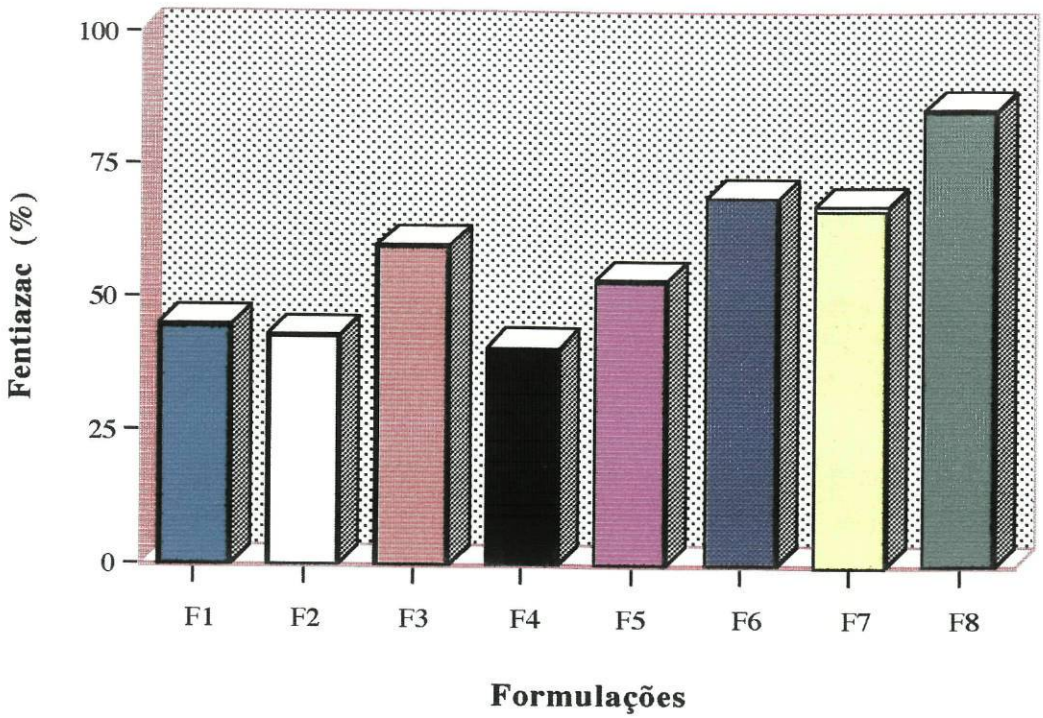


fig.32. Histograma relativo aos níveis de cedência obtidos com as 8 formulações.

Atendendo às vantagens que se reconhecem aos polímeros carboxivinílicos, comercialmente designados por Carbopol, prepararam-se oito formulações gelificadas com esses excipientes contendo fentiazac ácido a 5%.

Pretendeu-se resolver um problema de ordem tecnológica que consistia no facto das formulações gelificadas fluidificarem quando se adicionava o fentiazac ácido.

Inicialmente foi usado o Carbopol 934 numa concentração que garantisse uma consistência apropriada após incorporação de fentiazac. Optou-se por preparar duas formulações F1 e F2 com a mesma quantidade de Carbopol 934 (3,7%) variando apenas o humectante (propilenoglicol e glicerina) na composição do veículo, já que tanto o agente de neutralização (trietanolamina) como as quantidades de álcool e de conservante eram idênticas.

Os resultados dos ensaios efectuados demonstraram que a fórmula F1 apresentava um nível de cedência ligeiramente superior ao da fórmula F2.

Foi então preparada uma terceira formulação F3, ainda com Carbopol 934, mas em concentração inferior (2,5%). Este gele apresentou menor consistência relativamente aos anteriores embora com características ainda aceitáveis.

Os resultados obtidos com a formulação F3 foram de facto bem mais significativos, comprovados aliás por 60% de substância activa cedida ao fim de 20 horas para a F3 e por 45% e 43% correspondentes, respectivamente, às fórmulas F1 e F2.

Prepararam-se outras formulações com Carbopol 940, o que permitiu reduzir substancialmente a concentração de polímero na obtenção do gele.

Nas formulações F4 e F5 usaram-se, respectivamente, concentrações de Carbopol 940 de 0,5% e 0,25% e ainda uma pequena quantidade de carbowax 4000 (15%), diminuindo a quantidade de propilenoglicol em cerca de 50%. Como agente de neutralização utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio a 1%.

Os resultados obtidos com estas duas preparações mostraram valores francamente inferiores relativamente à formulação F3, como se pode verificar no histograma anterior.

A diferença de cedência entre as formulações F4 e F5 resulta da diminuição da quantidade de polímero para metade na formulação F5. Verificou-se, sem dúvida, um aumento da cedência do fentiazac, havendo a assinalar, entretanto, que a preparação final não reunia as melhores características relativas ao aspecto; a fórmula F5 não apresentou, de facto, a consistência própria de uma forma dérmica semi-sólida.

Finalmente, formularam-se mais três preparações (F6, F7 e F8) todas elas com a mesma composição qualitativa, diferindo apenas relativamente às quantidades de metilcelulose 400 (F6) e agente de neutralização da formulação (F7).

Estas preparações apresentaram boas características não só em termos de cedência do princípio activo (superior às restantes) como também no que se refere ao aspecto e consistência.

Das três preparações, a formulação F6 apresentou-se com pouco mais consistência a um exame visual, facto que poderá justificar a diferença relativamente à formulação F8, atendendo a que a única alteração se verifica apenas na quantidade de metilcelulose 400 presente (3,3% para a F6 e 2,2% para a F8).

Já no que respeita à formulação F7 há a considerar um aspecto curioso, visto que diferindo apenas da formulação F8 no tipo de agente de neutralização (trietanolamina substituindo a solução de hidróxido de sódio), evidenciou uma menor cedência de fentiazac. Este decréscimo não pode ser justificado pela viscosidade, já que as duas preparações se apresentaram bastante semelhantes neste aspecto, pelo que esse facto deverá ser atribuído pura e simplesmente à base utilizada na neutralização do Carbopol.

A neutralização pelo hidróxido de sódio permitiu, sem dúvida, obter níveis de cedência superiores devido ao facto do hidróxido de sódio apresentar um carácter básico mais forte do que a trietanolamina. Isto poderá traduzir-se numa maior "agressividade" para as membranas, tornando-as mais permeáveis ao fentiazac.

Por outro lado, e dado o seu menor poder neutralizante, a quantidade de trietanolamina necessária para elevar a 7 o valor de pH é substancialmente maior, facto que poderá originar o aprisionamento de moléculas de fentiazac, dificultando assim a respectiva cedência.

3.4. Conclusão

1. O fentiazac é cedido em veículo constituído por gele de Carbopol.

2. A constituição do veículo mais adequado para a cedência do anti-inflamatório e manutenção das propriedades de textura da forma dérmica, revelou ser o Carbopol 940 e a metilcelulose 400, coadjuvados com propilenoglicol - Formulações **F7** e **F8**.

4. VERIFICAÇÃO DO GELE DE FENTIAZAC (F_8)

Os ensaios que podem ser executados nas preparações semi-sólidas são tão diversificados que as especificações para a sua verificação não foram ainda oficialmente definidas. Há a considerar, no entanto, determinados parâmetros que pela sua importância e informação que fornecem tornam imprescindível a sua avaliação.

Os aspectos sensoriais (caracteres organolépticos, consistência), as características fisico-químicas (pH, teor em água, identificação e doseamento do princípio activo e do conservante), a facilidade de cedência medicamentosa e o controlo microbiológico constituem os requisitos mais importantes a considerar no controlo de um gele com acção anti-inflamatória, uma vez que estão directamente relacionados com a estabilidade, eficácia e segurança da preparação.

4.1. Aspectos sensoriais

As características organolépticas constituem o primeiro indicativo para se proceder à apreciação da qualidade de um gele e detectar possíveis alterações, nomeadamente através de um simplificado exame olfacto-visual. De facto, o triângulo aspecto, cor e aroma pode fornecer indicações valiosas sobre o estado de conservação de um gele, não só no que respeita à homogeneidade da preparação, mas também a eventuais alterações de ordem fisico-química, microbiológica ou enzimática.

O gele de fentiazac é um produto homogéneo, branco, inodoro, de consistência branda gelificada, que apresenta fácil espalmabilidade.

4.2. pH

A determinação do pH constitui um ensaio extremamente importante, atendendo a que a preparação deve apresentar um pH compatível com a zona de aplicação. Por outro lado, fornece indicações valiosas relativamente a eventuais alterações químicas que podem ocorrer, por exemplo, durante o período de armazenagem.

Na determinação do pH do gele de fentiazac foi utilizado um potenciómetro (METROHM - 605).

Técnica: Preparar com o gele uma solução a 5% em água neutralizada e proceder à determinação.

O pH está compreendido entre 6,0 e 6,5.

4.3. Teor em água

A principal importância da determinação do teor em água das preparações semi-sólidas, reside no facto de possibilitar a avaliação da capacidade humectante do respectivo agente utilizado na fórmula. De facto, o papel que o humectante exerce sobre uma formulação poderá reflectir-se, entre outras coisas, na estabilidade física, no comportamento viscoelástico e, em última análise, na biodisponibilidade da preparação.

A determinação do teor em água do gele de fentiazac foi efectuada pelo processo de Karl-Fisher (METROHM 652 KF - Coulometer)

O gele de fentiazac apresenta um teor em água de 79,2 $\pm$ 1,3% (9 leituras).

4.4. Controlo microbiológico

A presença de fases aquosas e oleosas contendo substâncias como proteínas e hidratos de carbono em produtos para aplicação tópica, pode propiciar o desenvolvimento de bactérias e fungos que, para além de deteriorarem essas preparações, originam muitas vezes fenómenos de toxicidade e infecção.

Naturalmente que este problema se torna mais pertinente em formas farmacêuticas de uso parenteral e ocular, mas se a inquinação for protagonizada por microrganismos como Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus, criam-se situações de elevado risco. Daí, ser importante conservar as formulações tópicas de forma a garantir a sua segurança e eficácia mesmo que quando aplicadas em áreas da pele com perfeita integridade.

4.4.1. Técnica

4.4.1.1. Aparelhagem e material necessário.

a) *Aparelhagem:*

- autoclave
- agitador mecânico
- homogeneizador mecânico
- hote estéril de fluxo de ar laminar
- tesoura, pinças, espátulas e escalpelos estéreis
- balança analítica.
- bico de Bunsen.

b) *Material de vidro:*

- balões de 100 ml
- frascos de boca larga para colheita de 250 ml
- pipetas Pasteur
- pipetas de 1 ml graduadas em 0,1 ml.
- placas de Petri estéreis.

c) *Diluente*

Triptona ..... 1,0 g

Cloreto de sódio ..... 8,5 g

Água destilada q.b.p. 1000 ml

Dissolver os compostos na água destilada à ebulição; ajustar para pH 7,0; repartir em balões de 100 ml e esterilizar em autoclave a 120 ^{o}C durante 20 minutos.

Utilizar dentro de 24 horas.

d) ***Meios de cultura.***

Manitol Salt Agar (MSA) - Específico para pesquisa de S. aureus.

Gelose piociânica - Específico para pesquisa de P. aeruginosa.

4.4.1.2. Preparação da amostra.

Mergulhar em álcool a extremidade da parte posterior da bisnaga que contém a preparação durante 20 minutos. Evaporar e flamejar. Seccionar a base da bisnaga com uma tesoura estéril. Utilizando uma espátula estéril, recolher para um frasco de boca larga 10 g do gele.

a) ***Preparação da suspensão-mãe***

Homogeneizar a amostra (10 g) com uma espátula estéril. Adicionar 90 ml de diluente. Agitar com agitador mecânico, previamente lavado com álcool de 70º durante 5 minutos. Ajustar, se necessário, o pH (6,5-7,5). Agitar mecanicamente durante 45 minutos a 20-25 ºC para efectuar a revivificação. Obtém-se, assim, a suspensão-mãe que deverá ser utilizada imediatamente.

b) ***Pesquiza de*** **Pseudomonas aeruginosa** ***e de*** **Staphylococcus aureus**

Distribuir os dois meios de cultura por várias placas de Petri. Em cada uma dessas placas aplicar 0,2 ml de suspensão-mãe. Colocar na estufa a 35-37 ºC durante 48 horas. Proceder à contagem de colónias sempre que haja desenvolvimento.

O gele de fentiazac não apresentou quaisquer vestígios daqueles microrganismos nem mesmo ao fim de 3 anos de armazenagem, o que demonstra a eficácia do conservante utilizado.

4.5. Identificação e doseamento do fentiazac no gele.

4.5.1. Identificação

A identificação pode ser efectuada por cromatografia em camada fina,

a) ***Reagentes, Soluções e Equipamento***

- Placas de gele de sílica silanizada, Merk 60, sem indicador de fluorescência, pré-lavadas com Benzeno + Acetato de etilo + Ácido. acético (80:20:1).

-Fase móvel - Benzeno + Acetato de etilo + Ácido acético (80:20:1).

-Solvente A: Clorofórmio + Etanol (70:30).

-Solução Padrão: Pesar 20 mg de fentiazac (substância padrão) e dissolver em 100 ml de Solvente A.

-Solução em análise: Pesar 1g de gele e dissolver em 250 ml de Solvente A.

b) ***Técnica:*** Aplicar na placa 10 µl de cada solução e deixar desenvolver. Retirar a placa e secar em corrente de ar quente. Visualizar à luz U.V. em 254 nm.

A solução em análise deve revelar uma mancha correspondente ao Rf da solução padrão.

4.5.2. Doseamento espectrofotométrico

O doseamento do fentiazac pode ser efectuado por espectrofotometria na região do U.V.

a) ***Reagentes e Equipamento.***

- Solvente: metanol (Merck)
- Espectrofotómetro UV Hitachi U-2000
- Centrífuga ECCO Type E II/11

b) ***Preparação da solução padrão e da solução problema***

Solução padrão - Pesar rigorosamente de 25,0 mg de fentiazac e transferir para balão volumétrico de 100. Dissolver em metanol e completar o volume com o mesmo solvente.

Transferir 5,0 ml da solução obtida para balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com metanol..

Solução problema - Pesar rigorosamente 5,0 g de gele de fentiazac para goblet de 250 ml, adicionar cerca de 50 ml de água e submeter a agitação durante 10 minutos. Transferir quantitativamente para tubo de centrífuga de 100 ml e centrifugar a 3000 r.p.m. durante aproximadamente 15 minutos até obter uma solução sobrenadante límpida. Decantar e rejeitar a fase aquosa. Repetir no resíduo a agitação com 50 ml de água, seguida de centrifugação, decantação e rejeição da camada aquosa límpida.

Tomar o resíduo quantitativamente, utilizando metanol, e transferir para balão volumétrico de 100 ml. Completar o volume com as lavagens do tubo e misturar. Transferir 10,0 ml da solução obtida para balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com metanol. Retirar 5,0 ml desta solução para balão de 100 ml e completar novamente o volume com metanol.

c) ***Técnica.***

Proceder à leitura das absorvências das soluções padrão e problema, respectivamente, utilizando metanol como líquido de compensação.

d) ***Cálculos***

$$(\%)\ \text{Fentiazac} = A_1/A_2 \times 100$$

A_1 = absorvência da solução problema
A_2 = absorvência da solução padrão

4.6. Resultados e conclusões.

Quadro VIII - Resumo dos parâmetros determinados para a verificação do gele de fentiazac em função do tempo e temperatura de armazenagem.

	após preparação	1 ano	2 anos	3 anos	
Consistência	Adequada	s/ alteração	s/ alteração	´+ consistente	
Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	
Ens. Microbiológico	Conforme*	s/ alteração	s/ alteração	s/ alteração	5° C
Teor de água (%)	79,2	79,1	79,2	78,9	
pH	6,5	6,5	6,4	6,3	
Teor em p.a. (%)	99,3	99,1	99,3	98,9	
Consistência	Adequada	s/ alteração	´+ consistente	´++ consistente	
Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	
Ens. Microbiológico	Conforme*	s/ alteração	s/ alteração	s/ alteração	25° C
Teor de água (%)	79,2	78,9	78,7	78,6	
pH	6,5	6,4	6,2	6,1	
Teor em p.a. (%)	99,3	99,0	98,1	97,4	
Consistência	Adequada	s/ alteração	´++ consistente	´+++ consistente	
Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	
Ens. Microbiológico	Conforme*	s/ alteração	s/ alteração	s/ alteração	37° C
Teor de água (%)	79,2	78.8	78,6	77,9	
pH	6,5	6,4	6,2	5,9	
Teor em p.a. (%)	99,3	97,6	96,2	94,4	

* - Ausência de Pseudomonas aeruginosa e de Staphylococcus aureus

(+); (++); (+++) - Aumento da consistência comparativamente à formulação, após preparação (exame visual).

A análise dos resultados encontrados permite verificar que relativamente ao exame visual o produto sofre alguma alteração com o tempo, sobretudo com o aumento da temperatura. O aumento da consistência não pode ser atribuído a uma possível perda de

água, porquanto a determinação desse teor não revelou alterações significativas, o que prova inclusivamente a excelente eficácia dos humectantes utilizados. Esse aumento de consistência poderá ser explicado pela formação de ligações ao nível das cadeias dos dois polímeros que constituem a base do gele (Carbopol e metilcelulose).

É de realçar também a grande homogeneidade evidenciada pelo produto durante todo o período em que decorreram os ensaios.

Do ponto de vista microbiológico não se registaram quaisquer alterações ao fim de três anos, o que revela boa estabilidade da preparação e eficácia do conservante utilizado.

Relativamente à variação do teor de fentiazac em função do tempo de armazenagem, não há a registar alterações significativas, mesmo para a temperatura mais alta de armazenagem, facto que demonstra a excelente estabilidade do produto neste capítulo.

Finalmente, no que respeita à variação do pH verifica-se uma ligeira diminuição desse valor à medida que aumentam o tempo e a temperatura de armazenagem, podendo justificar-se essse fenómeno pela presença de grupos carboxilo do Carbopol que ao ligarem-se à água libertam H_3O^+, acidificando o meio.

5. REOLOGIA

A reologia é o capítulo da física que estuda as condições de fluidez e de deformação da matéria. Aplica-se, fundamentalmente, às preparações líquidas e semi-sólidas, porquanto a deformação de pós ou granulados para a obtenção de comprimidos diz mais respeito à física de compressão.

No âmbito da reologia estudam-se e determinam-se características complexas das substâncias, como a viscosidade, a consistência, a plasticidade, a elasticidade, etc. Estas podem relacionar-se não só entre si, mas também com outros factores, de tal forma que a consistência, por exemplo, mesmo dependendo de vários parâmetros pode ser apreciada pela viscosidade e pela plasticidade (161).

Segundo a Lei de Newton, para os líquidos ideais a viscosidade η pode ser determinada através da expressão:

$$\eta = \gamma / \dot{\gamma} \qquad \text{(Eq.22)}$$

em que γ representa a deformação e $\dot{\gamma}$ a velocidade de corte.

No caso dos sólidos elásticos ideais aquela característica segue a Lei de Hooke:

$$G = \tau / \gamma \qquad \text{(Eq.23)}$$

onde G representa o módulo e τ a tensão cortante.

Nenhuma forma farmacêutica está tão dependente da importância da consistência como as pomadas. Esta propriedade está relacionada com a selecção de matérias primas e tecnologia de fabrico das preparações, com o tipo de acondicionamento a adoptar, com a estabilidade em função do tempo e da temperatura de armazenagem e ainda com outros parâmetros muito importantes como a cedência dos princípios activos (162).

A consistência traduz a resistência às deformações permanentes evidenciada pelos corpos quando uma determinada carga é exercida sobre eles. No caso dos fluídos (gases e líquidos newtonianos) a resistência à deformação depende da respectiva viscosidade que, sendo uma grandeza física definida é mensurável. Relativamente aos sólidos, a resistência à deformação pode ser avaliada pela dureza que, neste caso é uma grandeza empírica. Entre estes dois extremos há a considerar os líquidos não newtonianos e os sistemas semi-sólidos.

5.1. Sistemas não newtonianos

As propriedades reológicas dos materiais que apresentam este tipo de comportamento constitui a resultante de um conjunto de factores tais como: forças de adesão e de coesão, elasticidade, viscosidade, tixotropia e estrutura micelar. Estas características físicas estão relacionadas de forma recíproca.

Um ensaio empírico frequentemente utilizado para a determinação da consistência de um sistema baseia-se no teste de penetrometria.

A fórmula empírica avançada por Velon, confirmada posteriormente na prática por Delonca at al., veio provar a existência de uma relação de função linear entre a penetração e o logarítmo do tempo de ensaio, quando as determinações se processam em penetrómetros de forma cónica. Delonca e col. definiram então consistência como uma força que se opõe no seio de um fluído ao avanço de um móvel com 1 cm^2 de secção num plano perpendicular ao seu eixo de deslocamento, sendo animado de uma velocidade constante de 1 cm por segundo.

A consistência pode, pois, exprimir-se em $dine.cm^{-2}$ e determinar-se através da seguinte equação:

$$\textbf{Consistência} = P_a / KSV_\infty \qquad \text{(Eq.24)}$$

em que P_a representa o peso aparente do móvel penetrante; **S** a área da secção obtida num plano que corta perpendicularmente o eixo de deslocação; **K** é um factor indicado de acordo com a forma do aparelho utilizado; V_∞ é a velocidade limite correspondente ao deslocamento uniforme do móvel. Esta só é atingida quando o peso do corpo é igual à resistência que se lhe opõe.

Relacionadas com a consistência, há ainda a referir a espalmabilidade e a extensibilidade, através das quais a consistência é avaliada pela resistência ao movimento relativo entre dois planos paralelos, representados um, pela superfície onde é colocado o produto, e outro pela camada do mesmo que é aplicada nessa área.

Existem relações estreitas entre a consistência e a viscosidade, pelo que a determinação desta pode fornecer indicações precisas quanto ao valor daquela.

A viscosidade dinâmica ou coeficiente de viscosidade η é a força tangencial por

unidade de superfície, designada tensão cortante τ (shear stress, shearing stress, stress) expressa em Pascals, necessária para deslocar paralelamente ao plano de deslizamento uma camada de líquido de 1 m^2 a uma velocidade (**v**) de 1 $m.s^{-1}$ em relação a uma camada paralela situada à distância (**x**) de 1 metro.

A relação **dv/dx** representa a velocidade de corte $\dot{\gamma}$ ou (Shear rate, rate of shear) expressa em segundo recíproco (s^{-1}).

pascal segundo (Pa.s = $N.s.m^{-2}$) $\qquad \eta = G/\dot{\gamma}$ (Eq.25)

Poise (P = $dine.s.cm^{-2}$) = 0,1 Pa.s

O recíproco da viscosidade é a fluidez, e representa-se habitualmente pelos símbolos Φ ou Ψ.

A viscosidade cinemática ν, expressa em metros quadrados por segundo, é obtida através da razão entre a viscosidade dinâmica η e a massa volúmica ρ do líquido, expressa em kilogramas por metro cúbico e medida à mesma temperatura.

$$\nu=\eta/\rho \qquad \text{(Eq.26)}$$

A indicação da temperatura é importante dado que se verificam variações de viscosidade por alteração da temperatura (163).

Os líquidos complexos e as preparações semi-sólidas apresentam, como se sabe, comportamento não newtoniano, o qual é caracterizado por variações de viscosidade (viscosidade aparente - η_a) em função da velocidade de corte $\dot{\gamma}$ aplicada à amostra.

$$\eta = \tau/\dot{\gamma} \qquad \text{(Eq.27)}$$

Os sistemas podem ser classificados quanto ao tipo de escoamento em plásticos, pseudoplásticos e dilatantes. Estes três tipos de escoamento estão muitas vezes associados a estruturas sobre as quais, à diminuição da tensão exercida não lhe corresponde imediatamente a tendência ao estado estrutural de menor deformação do sistema, de tal forma que as curvas descendente e ascendente do traçado do reograma não se sobrepõem. Os sistemas que apresentam este tipo de comportamento designam-se tixotrópicos. Tixotropia é uma característica que define a capacidade de certos materiais modificarem a sua estrutura interna por agitação, retomando-a por repouso, e foi definida por Freundlich em 1935 como uma transformação isotérmica reversível de sole-gele. A variação da tixotropia evidenciada por uma

formulação ou formulações idênticas é naturalmente influenciada por determinados factores, tais como a temperatura, o tempo de armazenagem, a composição e a concentração dos excipientes e ainda por eventuais interacções entre os componentes das fórmulas. O grau de tixotropia pode ser determinado através da área delimitada pelas duas curvas do reograma, e que se designa por histerese (164).

Green e Weltman usaram uma equação que permite encontrar um coeficiente de quebra tixotrópica " B"

$$B = S_1 - S_2 \,/\, \ln(t_2/t_1) \qquad \text{(Eq.28)}$$

onde S_1 e S_2 representam os valores das tensões cortantes, respectivamente nos tempos t_1 e t_2 em contínuo movimento para dado valor arbitrário de velocidade de escoamento (165).

Nas figuras 33 e 34 representam-se as curvas de escoamento que traduzem diferentes tipos de comportamento apresentados por sistemas semi-sólidos em função, respectivamente, da tensão cortante *versus* velocidade de corte e viscosidade *versus* velocidade de corte (166).

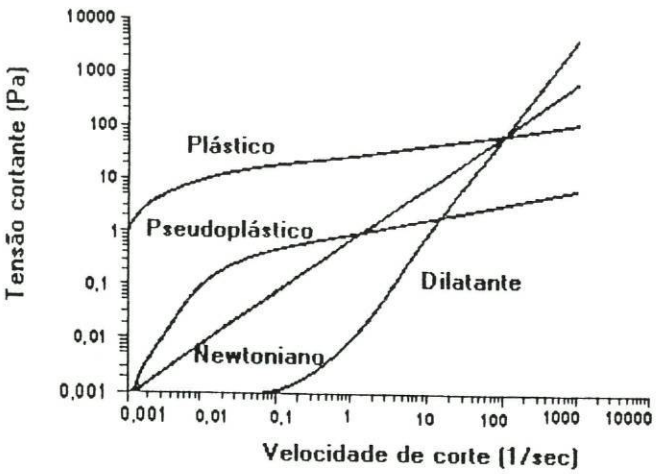


fig.33

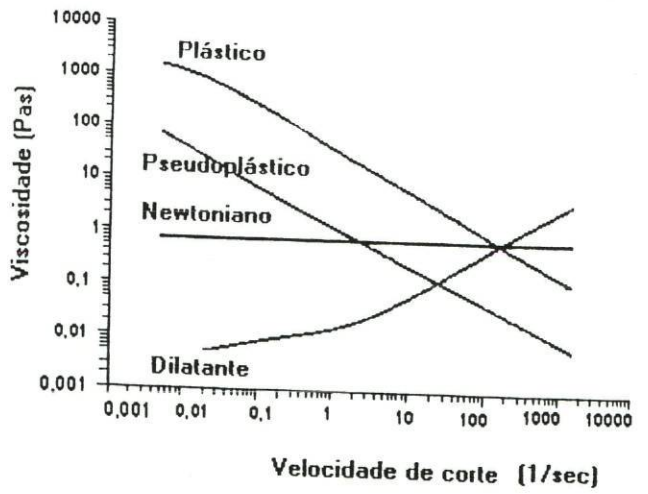


fig.34

Quando uma preparação apresenta escoamento a partir de uma tensão mínima, designada por valor ou tensão de cedência, diz-se que tem comportamento **plástico** (167).

É próprio dos sistemas com este comportamento apresentarem partículas com tendência a aglomerarem, formando um retículo tridimensional com valor de cedência, devido às pontes contínuas interparticulas que se criam no seio da preparação.

Sempre que as preparações deste tipo são submetidas a tensões superiores ao valor de cedência, elas fluem livremente como se fossem líquidos. O valor de cedência é de grande importância sobretudo em preparações para as quais se pretende que mantenham a sua forma até se atingir a tensão suficiente para serem espalhadas sobre a pele e mucosas.

O comportamento **pseudo-plástico** caracteriza-se pela proporcionalidade que se verifica entre a diminuição da viscosidade e o aumento da tensão exercida no sistema.

As soluções poliméricas, como as de carboximetilcelulose, polivinilpirrolidona e de Carbopol apresentam habitualmente este tipo de comportamento, sendo este fenómeno resultante do facto das partículas dispersas estarem dispostas num arranjo casual, entrelaçadas e ligadas com as moléculas da fase externa. Quando submetidas a uma determinada pressão, as partículas alinham-se e aproximam-se, diminuindo entre elas a quantidade de líquido constituinte da fase externa. Nestas circunstâncias a viscosidade do sistema diminui proporcionalmente com o aumento da tensão (168).

As preparações que apresentam comportamento **dilatante** são constituídas por partículas que formam um sedimento agregado, em que a quantidade de líquido presente é apenas a necessária para preencher os espaços inter-partículas. Sob a acção de uma força externa, as partículas expandem-se, resultando daí um aumento de resistência ao escoamento, pelo que a viscosidade aumenta com a velocidade de corte (169).

5.2. Viscoelasticidade

O comportamento viscoelástico é característico de uma vasta gama de sistemas com propriedades reológicas intermédias entre o comportamento clássico de um líquido ideal e o de um sólido elástico. A sua análise pode ser traduzida através da resposta dos sistemas quando sobre eles são exercidos movimentos oscilatórios ou tensões de corte de pequena intensidade

mas constantes, durante um determinado período de tempo.

Existem processos de analisar a viscoelasticidade, nomeadamente através de **ensaios oscilatórios** e **ensaios de fluência** *(creep-compliance)* (170).

As propriedades viscoelásticas dos sistemas podem ser determinadas submetendo-os a **tensões oscilatórias** de baixa amplitude.

Para um sólido elástico ideal as curvas de tensão e de deformação estão em fase formando um ângulo δ igual a 0º, pois toda a energia é armazenada (G´´=0). Pelo contrário, no caso de um líquido ideal sem propriedades elásticas, toda a energia é dissipada sob a forma de calor (G´=0) e, portanto, a tensão e a deformação estão desfazadas formando um ângulo de 90º (fig.35). G´e G´´correspondem, pois, aos *moduli* de armazenagam "storage modulus" e de perda "loss modulus", respectivamente (171).

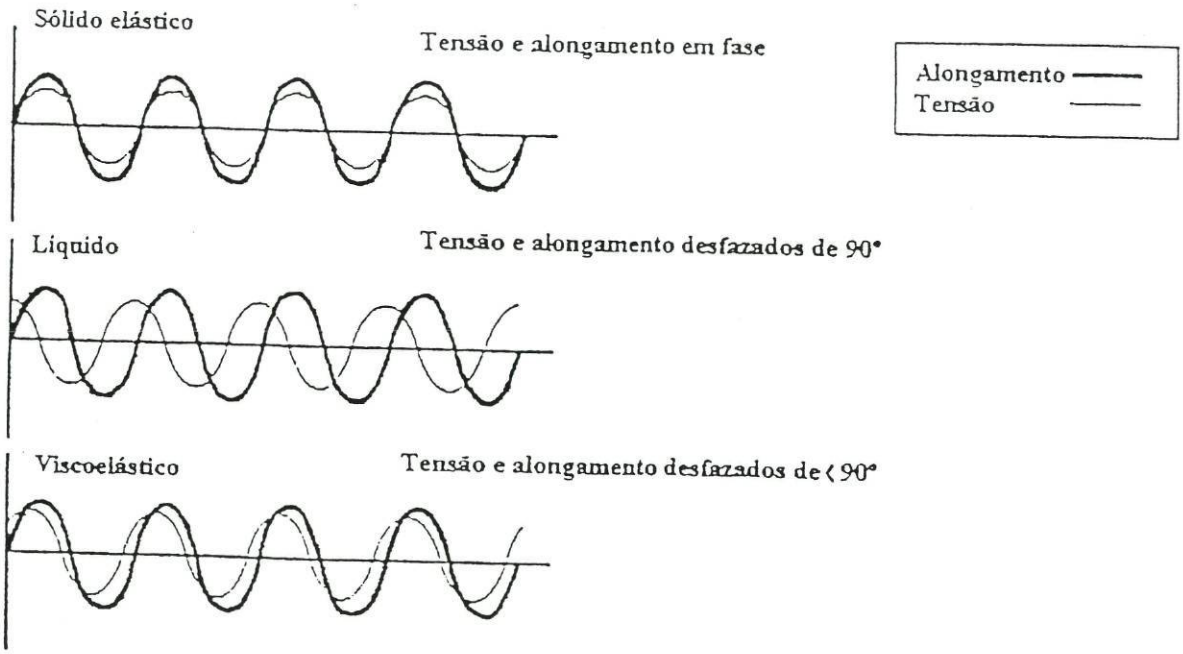


fig. 35. Curvas de tensão e alongamento

Num sistema viscoelástico, o ângulo δ que se forma entre as curvas de tensão e de deformação está compreendido entre 0º e 90º, sendo o sistema tanto mais elástico quanto mais próximo de zero for esse ângulo e, obviamente, mais viscoso quanto mais próximo de 90º.

Quando um material viscoelástico é submetido a uma tensão sinusoidal, a uma determinada frequência **f**, a deformação complexa γ^* é definida pela expressão:

$$\gamma^*=\gamma_o.e^{i\omega t} \qquad \text{(Eq.29)}$$

onde ω frequência angular ($\omega=2\Pi.f$), **t** é o tempo, **i** é $\sqrt{-1}$

De igual modo a tensão complexa τ^* pode ser representada da seguinte forma:

$$\tau^*= \tau_o.e^{i\omega t+\delta} \qquad \text{(Eq.30)}$$

em que δ é o ângulo de fase.

A deformação e a tensão complexas são vectores em planos complexos. Assim, teremos:

$$\gamma^*=\gamma'+i\gamma'' \qquad \text{(Eq.31)} \qquad \text{e} \qquad \tau^*=\tau'+i\tau'' \qquad \text{(Eq.32)}$$

O módulo complexo $G^*=\tau^*/\gamma^*$ engloba as propriedades elásticas e viscosas inerentes ao comportamento reológico, bem como o ângulo de fase que se forma. Deste modo,

$$G^*=G'+iG'' \qquad \text{(Eq.33)}$$

O valor absoluto do módulo complexo é definido por:

$$|G^*|= [(G'^2) + (G''^2)]^{1/2} \qquad \text{(Eq.34)}$$

$$G'= |G^*|\cos\ \delta \qquad \text{(Eq.35)}$$

$$G''= |G^*|\text{sen}\ \delta \qquad \text{(Eq.36)}$$

A razão entre a energia dissipada e a energia armazenada é traduzida pela expressão:

$$\tan\ \delta = G''/G' \qquad \text{(Eq.37)}$$

Estas relações podem ser apresentadas em função da viscosidade complexa μ^*

$$\mu^*=\mu' - i\mu'' \qquad \text{(Eq.38)}$$

em que μ' é a viscosidade dinâmica e relaciona-se com G''do seguinte modo:

$$\mu'=G''/\omega \qquad \text{(Eq.39)}$$

enquanto $$\mu''=G'/\omega \qquad \text{(Eq.40)}$$

É importante referir que se G´é muito maior que G´´, o material comporta-se como um sólido, ou seja, a deformação é essencialmente elástica ou recuperável. Todavia, se G´´é muito maior que G´, a energia utilizada na deformação do material é em grande parte dissipada.

O módulo viscoelástico determinado acima de certos valores de frequência indica as zonas de transição correspondentes aos processos de relaxamento que são dependentes da estrutura dos materiais (172).

Os ensaios de **fluência *(creep-compliance)*** representam um tipo de estudo que procura traduzir a resposta dos sistemas quando sobre eles é exercida uma pequena tensão cortante mas constante, durante um certo período de tempo. O valor dessa tensão que se exerce sobre os sistemas pode ser menor que o valor de cedência, pelo que as alterações das respectivas estruturas internas são mínimas (173).

Atendendo a que na língua portuguesa não existe tradução para a expressão *creep-compliance* avançamos com o termo *fluência* , que sugere movimento lento e um certo arrastamento. De facto, este parâmetro relaciona a deformação ou alongamento com uma tensão constante que é exercida sobre o sistema.

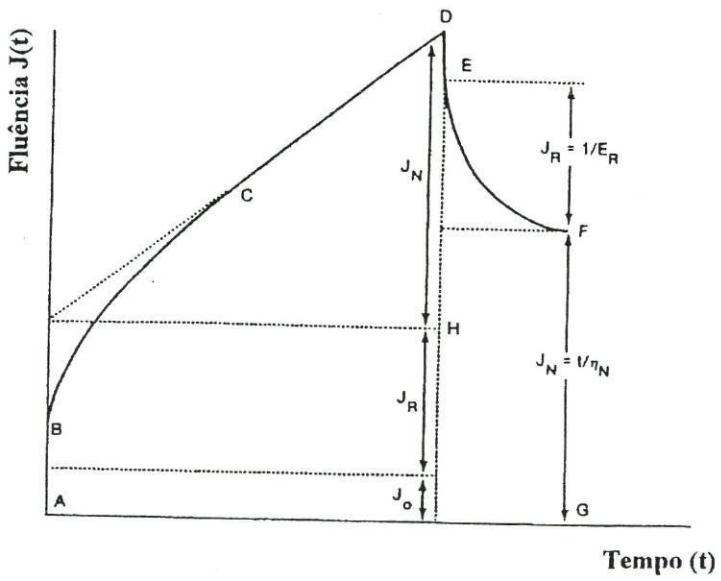


fig.36. Curva de fluência versus tempo

A (fig.36) que representa a curva de fluência versus tempo de um material viscoelástico permite identificar várias regiões distintas.

A deformação do material submetido à tensão corresponde à diferença entre o comprimento sob tensão **Ls** e o comprimento inicial **Lo**, o que é igual ao comprimento resultante após a interrupção da tensão aplicada e pode exprimir-se como uma fracção do comprimento inicial **(Ls-Lo)/Lo.**

Logo após a aplicação de uma tensão surge uma deformação imediata correspondente à região **AB** e que se designa por fluência elástica instantânea (J_o). Se a tensão for interrompida em **B**, e atendendendo ao curto período de tempo, o material não acusa qualquer tipo de modificação. Depois de **B** a curva diminui ligeiramente até ao ponto **C**, para além do qual se verifica um aumento linear da fluência em função do tempo. **BC** representa, pois, a fluência elástica retardada (J_R) e **CD** a fluência newtoniana (J_N). Interrompendo a tensão em **D**, acontece uma reconversão que numa primeira fase é do tipo elástica instantânea **DE**, passando depois a elástica retardada **EF**.

A distância vertical **FG** representa a deformação não reconvertível por unidade de tensão e que se relaciona com o grau de alteração da estrutura do material durante o ensaio.

Assim, a fluência total **J(t)** para o tempo **t** e para uma tensão constante que é aplicada ao sistema, é dada por:

$$J(t) = J_o + J_R + J_N \qquad \text{(Eq.41)}$$

e quando $t \dashrightarrow 0$ $\qquad J(t) = J_o \qquad$ (Eq.42)

Quando se submetem os materiais a ensaios desta natureza verifica-se que os líquidos viscoelásticos escoam livremente, pelo que a deformação aumenta linearmente com o tempo, enquanto que para os sólidos viscoelásticos a deformação pode considerar-se praticamente nula.

No caso das preparações tópicas de aspecto semi-sólido, o seu estudo viscoelástico é tratado seguindo os modelos teóricos concebidos para os líquidos viscoelásticos.

5.3. Alterações reológicas com o tempo e temperatura de armazenagem.

As modificações reológicas das preparações devem-se numa primeira análise à estrutura de cada material, aos rearranjos estruturais resultantes das interligações dos compostos, ao pH do meio, à eventual inquinação microbiana, à acção de agentes físicos, à tecnologia de fabrico e às condições e tempo de armazenagem.

Durante o período de armazenagem as características reológicas das formulações podem alterar-se de uma forma mais ou menos notória. Quando os desvios ao comportamento reológico inicial são pronunciados, podem ser considerados casos de eventual envelhecimento. Torna-se, pois, indispensável identificar quais os factores que mais concorrem para o envelhecimento mais rápido das preparações.

O tempo e a temperatura de armazenagem constituem indubitavelmente dois dos principais factores que poderão intervir naquele fenómeno, tendo por isso merecido particular destaque na análise ao gele de Fentiazac por nós efectuada.

5.4. Análise reológica do gele de Fentiazac

No protocolo seguido para a análise reológica do gele de Fentiazac foram considerados os seguintes parâmetros:

- **Exame preliminar** (como consta em **4.1.**)
- **Escoamento**
- **Viscoelasticidade:** aplicação dos *móduli* viscoelásticos G´ e G´´ e ensaios de fluência *"creep compliance"*.

O estudo dos parâmetros acima indicados foi efectuado em função da temperatura e do tempo de armazenagem e servimo-nos para o efeito de um reómetro com as características que seguidamente apresentamos.

5.4.1. Aparelhagem utilizada.

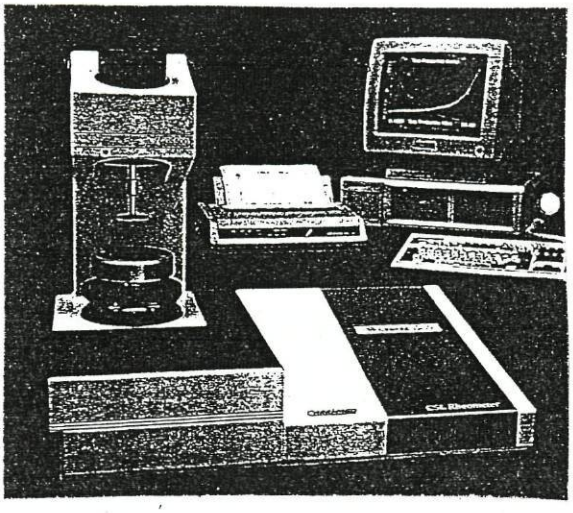


fig.37. CARRIMED CSL 50

No estudo reológico do gele de fentiazac foi utilizado um sistema integrado composto por um reómetro rotativo de tensão controlada e geometria cone/prato (CARRIMED CSL 50), um computador, uma impressora e um sistema de tratamento de dados fornecidos pelo construtor do aparelho (fig.37).

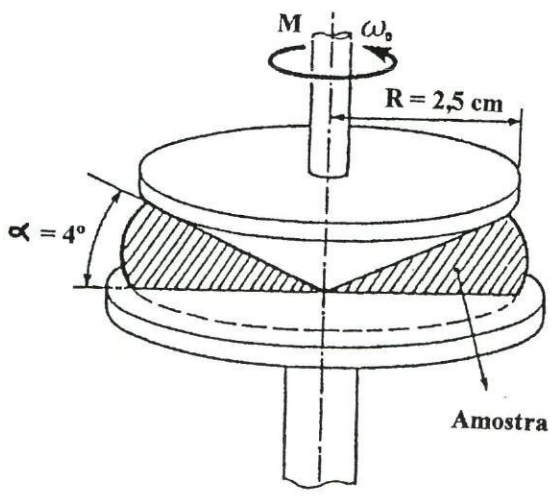


fig.38. Esquema do cone/prato do CARRIMED CSL 50

O material a analisar é aprisionado entre o prato e o cone de revolução, de raio **R**, no qual o eixo se encontra perpendicular ao plano do prato (fig.38). O ângulo α que se forma

entre o cone e o prato é de **4º**. O movimento laminar de corte é obtido submetendo o cone a uma velocidade de rotação ω_o mantendo o prato fixo. Perante o movimento a substância dispõe-se em camadas, constituídas por cones de revolução com a mesma altura e o mesmo eixo do cone sólido, animados de velocidades angulares de rotação diferentes, variando continuamente de 0 (zero) (para a camada em contacto com o prato) a ω_o (para a camada em contacto com o cone sólido).

Em consequência do movimento relativo das camadas umas em relação às outras,, existe em todos os pontos da amostra uma velocidade de corte γ e uma tensão cortante τ . Para os reómetros deste tipo (cone/prato) o ângulo α é pequeno (< 5°) podendo considerar-se, por isso, a velocidade e a tensão cortante constantes em todos os espaços ocupados pela amostra entre o cone e o prato. A grande vantagem deste aparelho reside precisamente neste facto.

No entanto, podem referir-se outras vantagens tais como:

- a exigência de volumes muito pequenos de amostra a ensaiar
- a possibilidade de determinar velocidades de corte elevadas.

Como desvantagem pode referir-se o facto de não ser conveniente a utilização deste tipo de aparelhos no estudo de materiais com estrutura muito complexa ou demasiado frágil, pois há o perigo de ser destruída no pequeno volume compreendido entre o cone e o prato. Por outro lado, há a considerar a simetria cónica de escoamento (fluxo) laminar, que é muito sensível, particularmente à posição da extremidade do cone sobre o prato (174).

5.4.2. Ensaios de escoamento

Através dos ensaios de escoamento determinou-se o tipo de comportamento reológico do gele de Fentiazac relativamente à temperatura e tempo de armazenagem. Para o efeito esses ensaios realizaram-se às temperaturas de **5 ºC**; **25 ºC** e **45 ºC** ao fim de **1 mês**; **2 anos** e **3 anos** após a preparação do gele.

Os reogramas obtidos, representados nas (figs.39, 40, 41 e 42) são indicados e comentados nas páginas seguintes.

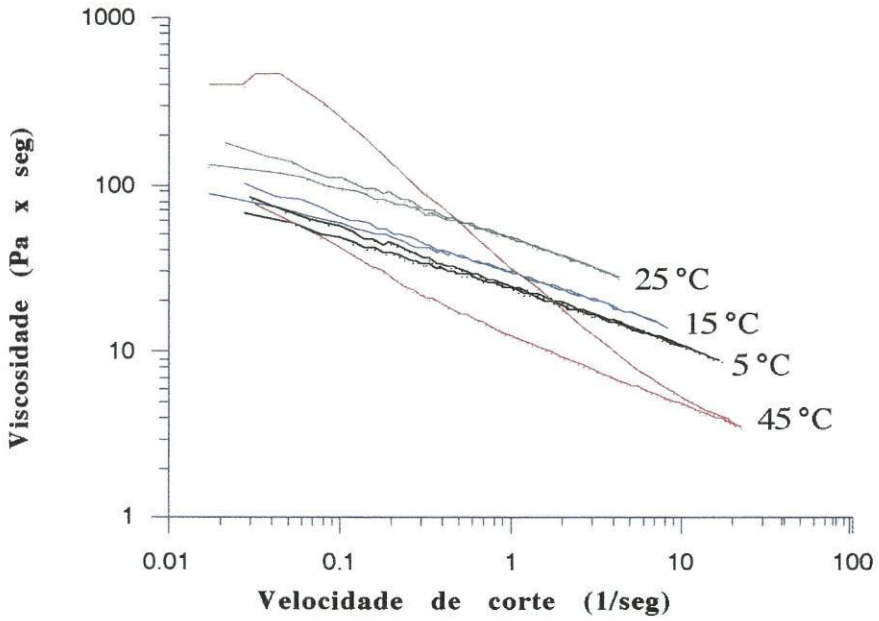


fig.39. Reograma obtido com o gele de Fentiazac em função da temperatura **1 mês** após a sua preparação.

Relativamente ao ensaio de escoamento, a análise do reograma anterior obtido com o gele de Fentiazac em função da temperatura, permite caracterizar o tipo de comportamento do sistema com base no efeito da velocidade de corte sobre a viscosidade.

Trata-se de uma preparação que evidencia comportamento pseudoplástico e que apresenta alguma tixotropia. É visível o aumento de viscosidade com a elevação da temperatura.

A 45 °C o sistema exibe uma maior tixotropia, provavelmente relacionada com a alteração da sua estrutura, e igualmente um comportamento pseudoplástico mais pronunciado.

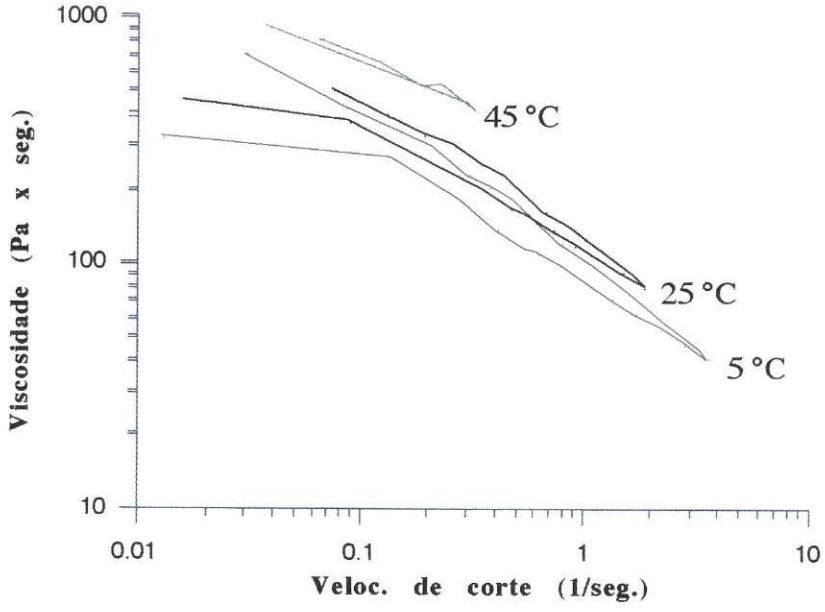


fig.40. Reograma obtido com o gele de Fentiazac em função da **temperatura 2 anos** após a sua preparação.

Confirma-se o tipo de escoamento pseudoplástico com tixotropia do produto, 2 anos após a sua preparação, ressaltando uma vez mais o aumento da viscosidade em função da temperatura.

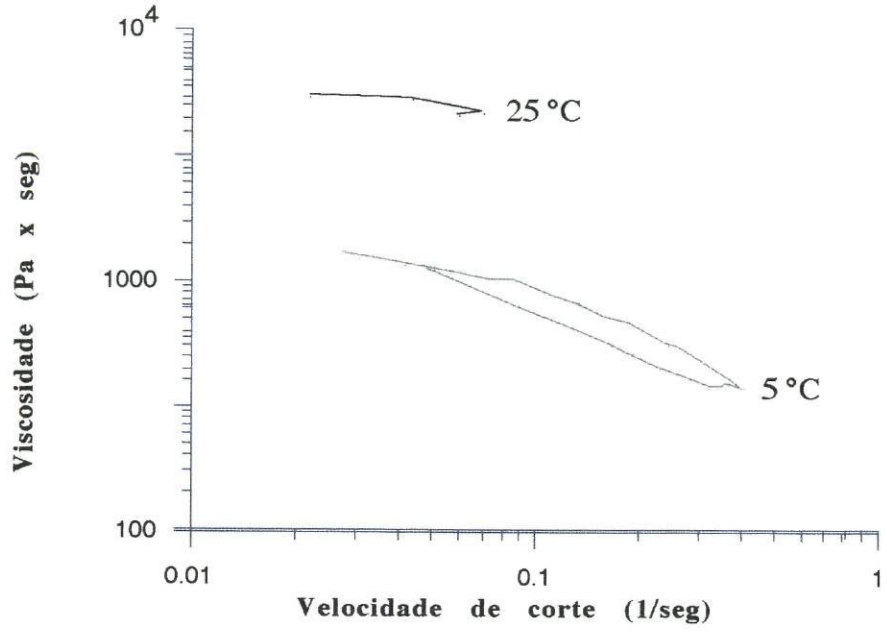


fig.41. Reograma obtido com o gele de Fentiazac em função da **temperatura, 3 anos** após a sua preparação.

Ao fim de 3 anos a viscosidade aumenta de uma forma mais drástica, o que perante a sensibilidade do aparelho e as condições de ensaio utilizadas, não se torna possível o registo do traçado da curva referente à temperatura de 45 °C.

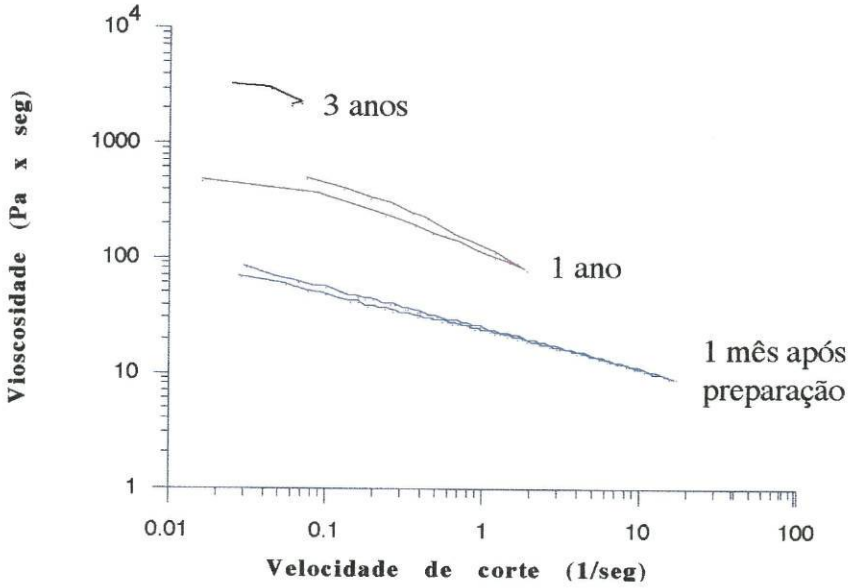


fig.42. Reograma obtido com o gele de Fentiazac em função do tempo de armazenagem à temperatura de 25 °C.

A Figura anterior apresenta o aumento da viscosidade do produto à temperatura de 25 °C com o tempo de armazenagem.

O gele de Fentiazac mantém o tipo de comportamento pseudoplástico com tixotropia.

5.4.3. Ensaios viscoelásticos

Para a determinação das características viscoelásticas pode recorrer-se a vários métodos.

No presente trabalho foram efectuados ensaios oscilatórios para a determinação dos *móduli* viscoelásticos (G´ e G´´) e ensaios de fluência (*creep-compliance*) tendo por objectivo a análise do comportamento viscoelástico do gele de fentiazac face à temperatura e tempo de armazenagem.

5.4.3.1. *Móduli* G´ e G´´

5.4.3.1.1. Influência da temperatura e do tempo de armazenagem.

Tendo em vista o estudo da influência destes dois parâmetros foram efectuados ensaios às temperaturas de **5 °C**; **25 °C** e **45 °C** ao fim de **1 mês** ; **2 anos** e **3 anos** após a preparação do gele.

Os espectros mecânicos obtidos com os *moduli* G´e G´´ representados nas (figs. 43, 44, 45 e 46) são indicados e comentados nas páginas seguintes.

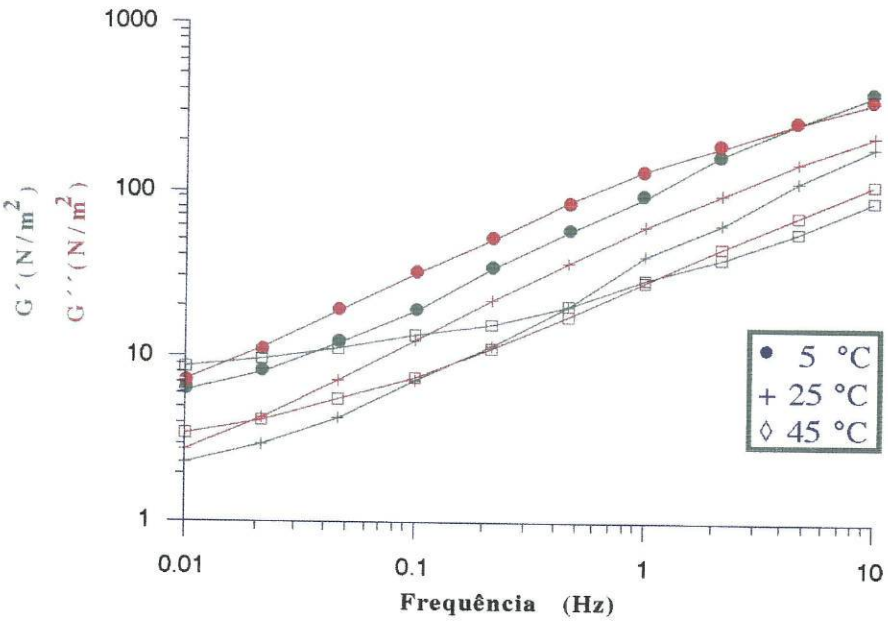


fig.43. Espectro mecânico obtido com os *móduli* G´e G´´ em função da **temperatura**, **1 mês** após a preparação do gele de Fentiazac.

Às temperaturas de 5 °C e 25 °C o sistema não pode ser considerado, em termos reológicos, como um verdadeiro gele, atendendo a que praticamente em toda a faixa de frequência utilizada, G´´> G´.

A 45 °C o sistema encontra-se muito próximo da transição sole-gele, verificando-se para pequenas frequências a formação do "plateau elástico" do módulo G´.

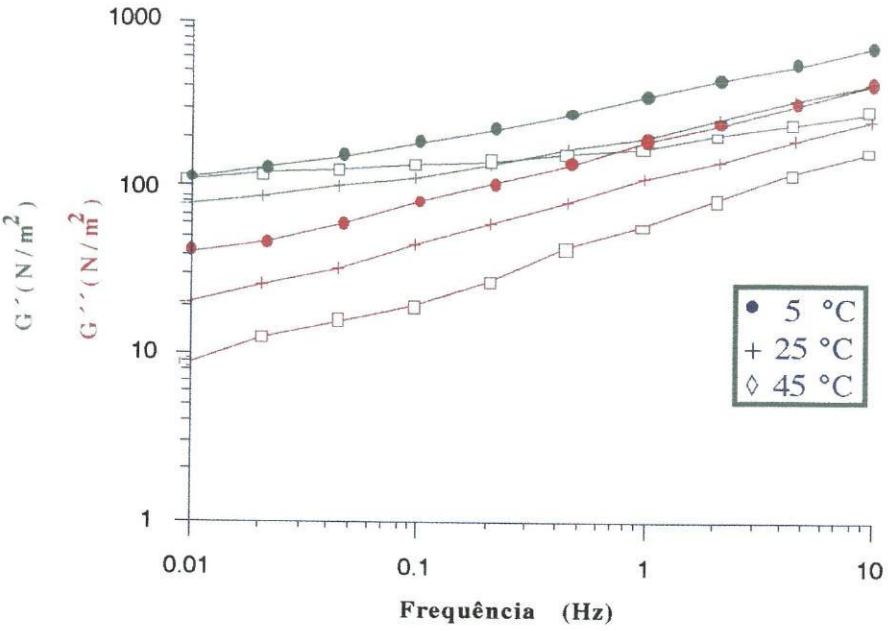


fig.44. Espectro mecânico obtido com os *moduli* G´e G´´em função da **temperatura, 2 anos** após a preparação do gele de Fentiazac

Se bem que os módulos G´e G´´sejam maiores a 5 °C, verifica-se que o sistema adquire claramente propriedades elásticas mais intensas pelo aumento da temperatura, ou seja, aumenta a diferença entre G´e G´´, diminuindo o declive G´versus frequência (ω).

Pode concluir-se que o sistema é mais elástico (rígido) a 45 °C, isto é, a rede tridimensional do gele é menos afectada pela frequência traduzindo, portanto, uma menor mobilidade das cadeias poliméricas.

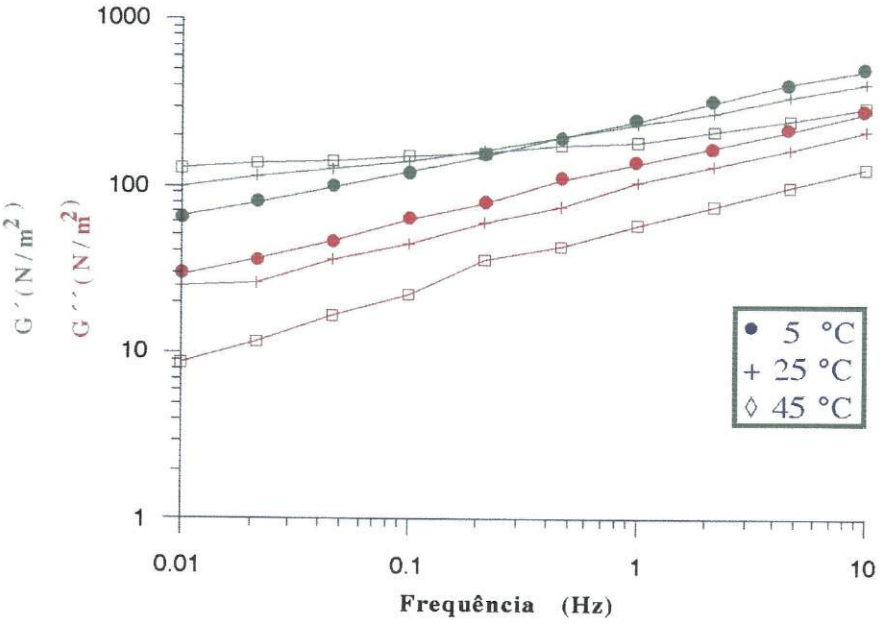


fig.45. Espectro mecânico obtido com os *moduli* G´e G´´em função da **temperatura, 3 anos** após a preparação do gele de Fentiazac.

Tal como se referiu na análise da fig.44 verifica-se aqui também, de uma forma ainda mais notória, o aumento das características elásticas do sistema com a temperatura, traduzindo novamente a diminuição da mobilidade macromolecular no interior do gele.

De uma forma um pouco simplista pode dizer-se que se intensificam as características de "sólido" com a temperatura e tempo de armazenagem.

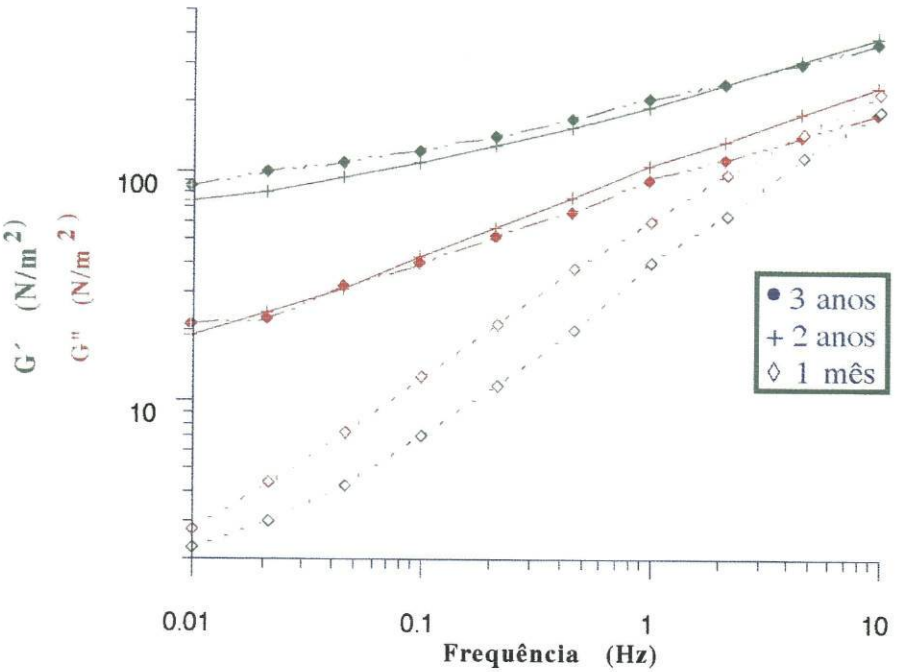


fig.46. Espectro mecânico obtido com os *moduli* G´e G´´em função do **tempo de armazenagem** à temperatura de **25 °C**.

Um mês após a preparação do gele verifica-se que à temperatura de armazenagem de 25 °C o módulo G´´é maior que G´, caracterizando um líquido viscoelástico que vai evoluindo, em função do tempo de armazenagem, até um sólido viscoelástico (G´>G´´) com características de gele fraco, pois a diferença entre os módulos é pequena.

Essa evolução pode ser apreciada, como se pode observar na figura anterior, pela diminuição do declive G´versus frequência.

5.4.3.2. Fluência *(Creep-compliance)*

5.4.3.2.1. Influência da temperatura e do tempo de armazenagem

O estudo destes parâmetros foi efectuado de forma idêntica ao referido em 5.4.3.1.1..

Os gráficos obtidas nos ensaios de fluência, representados nas (figsuras 47, 48 e 49) são indicados e comentados nas páginas seguintes.

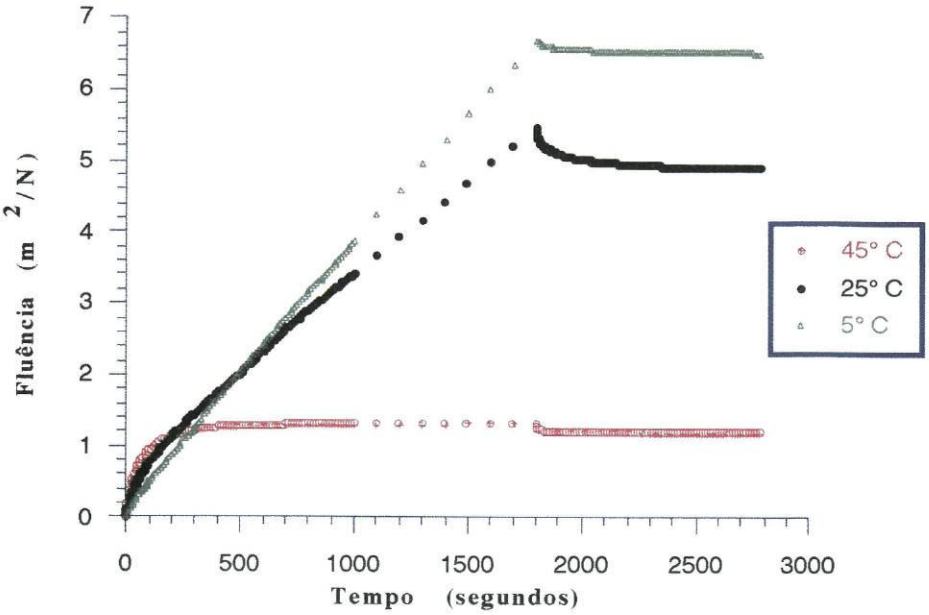


fig.47. Representação gráfica do ensaio de **fluência** obtido com o gele de Fentiazac em função da **temperatura**, **1 mês** após a sua preparação.

A deformação verificada no sistema após a aplicação de uma tensão constante é influenciada pela temperatura. A análise da Figura anterior permite observar que com a elevação da temperatura aumenta a rigidez do sistema, diminuindo consequentemente o grau da deformação resultante da tensão aplicada.

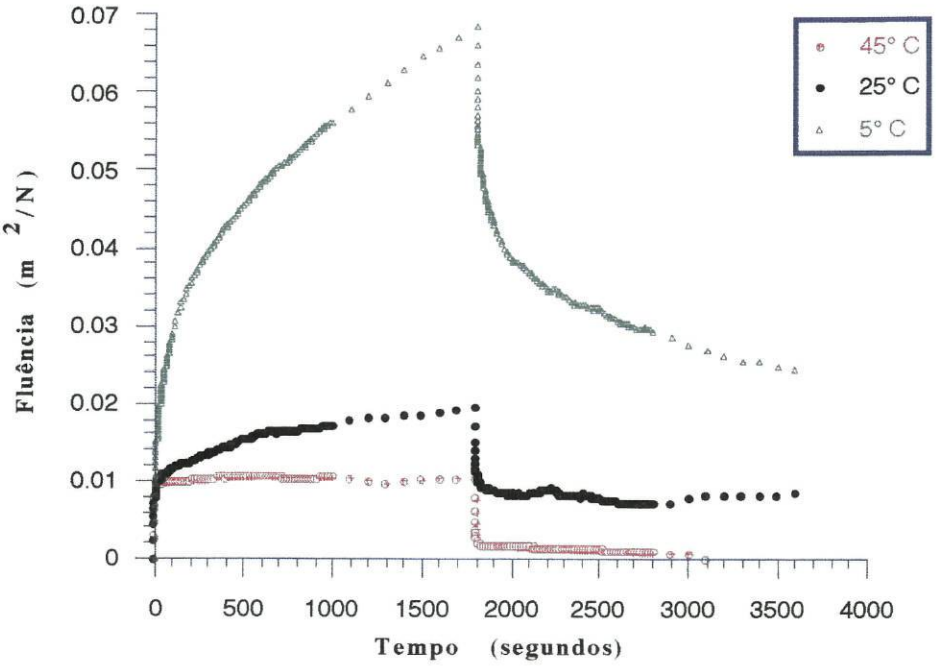


fig.48. Representação gráfica do ensaio de **fluência** obtido com o gele de Fentiazac em função da **temperatura**, **2 anos** após a sua preparação.

A figura anterior revela uma vez mais que a rigidez do sistema aumenta com a temperatura e tempo de armazenagem, atendendo a que a elasticidade é menor a 5 °C e os valores de fluência correspondentes à deformação sofrida pelo sistema diminuem com o tempo de armazenagem.

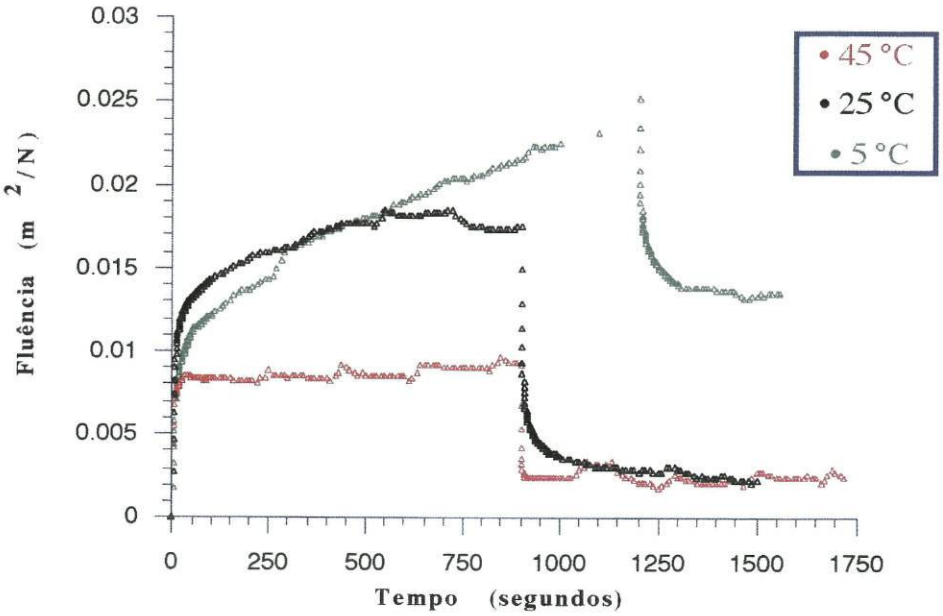


fig.49. Representação gráfica do ensaio de **fluência** obtido com o gele de Fentiazac em função da **temperatura**, **3 anos** após a sua preparação.

Ao fim de 3 anos continuam a verificar-se alterações nas características viscoelásticas do sistema, embora menos acentuadas que as registadas nos dois primeiros anos. O sistema apresenta-se, contudo, cada vez mais rígido com o aumento da temperatura e tempo de armazenagem.

5.5. Discussão de resultados e conclusões

Chegados a este ponto passamos a discutir os resultados obtidos nos ensaios reológicos efectuados com o gele de fentiazac.

Atendendo a que por razões de sistematização a interpretação dos resultados foi feita individual e directamente após a apresentação de cada figura, importa agora analisá-los de uma forma global. Procurou-se relacionar os parâmetros que foram determinados tendo em vista tirar conclusões sobre a estabilidade reológica do gele em função da temperatura e tempo de armazenagem.

A análise efectuada anteriormente permite-nos dizer que o tempo e temperatura de armazenagem influenciam, de facto, as características viscoelásticas do produto.

Com o aumento da temperatura deverão ocorrer modificações na estrutura molecular do sistema, provocadas pelas interacções entre as cadeias poliméricas que levam por sua vez a um aumento da elasticidade e rigidez do material analisado.

Conforme se demonstra nos ensaios de escoamento, a elevação da temperatura leva a um aumento da agregação e estruturação dos polímeros, traduzindo-se este facto no aumento da tixotropia e no comportamento pseudoplástico mais pronunciado.

Ao fim de 3 anos a preparação continua a apresentar consistência própria de um gele, mas as características viscoelásticas são afectadas podendo, por isso, influenciar a cedência do fentiazac. Oportunamente demonstraremos esta afirmação.

6. ESTABILIDADE.

6.1. Cedência do fentiazac veiculado no gele de Carbopol. Influência da temperatura e tempo de armazenagem.

Apesar das preparações não evidenciarem por vezes alterações significativas relativamente à diminuição do teor em princípio activo e aos parâmetros reológicos, podem, contudo, não possuir a necessária eficácia ao fim de um certo tempo. Não é suficiente, portanto, apertar os limites de variação relativos ao doseamento da substância activa e à conservação das características do produto para se avaliar a eficácia do medicamento. É necessário que essa garantia se mantenha com o tempo pois a proporcionalidade numérica entre a manutenção das características fisico-químicas e a eficácia, do ponto de vista fisiológico, nem sempre se verifica.

Embora em Tecnologia Farmacêutica seja prática corrente proceder a ensaios que simulem as condições reais, devem no entanto ser estabelecidas condições mais drásticas de forma a garantir maior segurança de resultados.

Nesta perspectiva foram efectuados ensaios "in vitro" com o gele de fentiazac submetido a diferentes condições de armazenagem, de modo a verificar o seu comportamento relativamente à cedência do anti-inflamatório em função da temperatura e tempo de armazenagem.

6.1.1. Ensaio "in vitro"

Os ensaios foram realizados em amostras de gele de Fentiazac acondicionado em bisnagas de alumínio submetidas a diferentes condições de temperatura de armazenagem: 5ºC (frigorífico), 25ºC e 37ºC (estufa).

Este estudo decorreu num período de três anos durante o qual foram efectuados regularmente vários ensaios.

A aparelhagem, os reagentes, as membranas e o processo analítico utilizados, bem

como o estudo estatístico dos resultados, esteve de acordo com o que se estabeleceu no ponto **3** (**Pág.61**).

6.1.2. Resultados e discussão.

Os resultados dos ensaios realizados constam dos **Quadros X, XI e XII**, e estão representados graficamente nas (**figs. 50, 51 e 52**).

A sua análise permite verificar a diminuição da cedência do anti-inflamatório com o tempo e temperatura de armazenagem.

Se bem que as diferenças para as temperaturas de 5 e 25ºC não sejam muito relevantes, já para a temperatura de 37 ºC o decréscimo em termos de cedência é bem mais significativo.

Verifica-se também, através do **Quadro I X**, uma descida do valor de pH com o tempo e temperatura de armazenagem, sobretudo para a temperatura de 25 ºC e mais ainda para a temperatura de 37 ºC. Este facto leva-nos a pensar que a diminuição da cedência do fentiazac poderá estar relacionada com o pH, já que a descida deste valor leva a uma diminuição da solubilidade do anti-inflamatório e, por conseguinte, a um decréscimo da quantidade que é cedida.

Por outro lado, com a elevação da temperatura e com o tempo de armazenagem a consistência do produto aumenta, reflectindo-se, naturalmente, na cedência do fentiazac e, sobretudo, como se pode verificar na (fig.) no período de lactência.

Quadro IX - Variação do pH em função do tempo e temperatura de armazenagem.

Tempo (meses)	pH		
	5°C	25 °C	37 °C
1	6,5	6,5	6,5
12	6,5	6,4	6,4
24	6,4	6,2	6,2
36	6,3	6,1	5,9

Quadro X - Níveis de Fentiazac obtidos "in vitro" cedido a partir de um gele conservado à temperatura de 5 °C.

Tempo (horas)	Fentiazac (%) 1 mês	12 meses	24 meses	36 meses
0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,25	3,4 ± 0,4	3,1 ± 0,3	2,9 ± 0,2	2,3 ± 0,5
0,5	6,5 ± 0,6	5,8 ± 0,7	4,6 ± 0,4	3,1 ± 0,3
0,75	9,7 ± 0,3	9,1 ± 0,5	8,5 ± 1,1	6,0 ± 1,0
1	12,3 ± 1,2	13,8 ± 1,7	11,2 ± 0,9	8,7 ± 2,1
1,5	15,5 ± 1,8	15,3 ± 1,8	14,3 ± 1,8	12,1 ± 2,2
2	21,9 ± 1,4	21,4 ± 1,3	20,1 ± 2,7	19,3 ± 1,9
3	32,2 ± 1,7	29,5 ± 2,1	30,4 ± 1,9	28,4 ± 2,7
4	41,5 ± 1,9	44,4 ± 1,9	41,7 ± 3,2	37,5 ± 3,1
6	57,6 ± 2,3	58,5 ± 2,8	56,5 ± 2,9	52,3 ± 2,8
10	78,2 ± 2,4	78,1 ± 3,0	76,6 ± 3,5	68,8 ± 3,2
12	81,9 ± 1,8	79,9 ± 2,7	78,0 ± 2,2	73,3 ± 2,6
20	85,6 ± 2,8	84,7 ± 3,1	81,2 ± 2,8	78,9 ± 3,7
AUC (t=20 h)	1287,4 ± 41,6	1277,6 ± 51,1	1237,5 ± 51,8	1156,7 ± 56,9

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05
N = 5

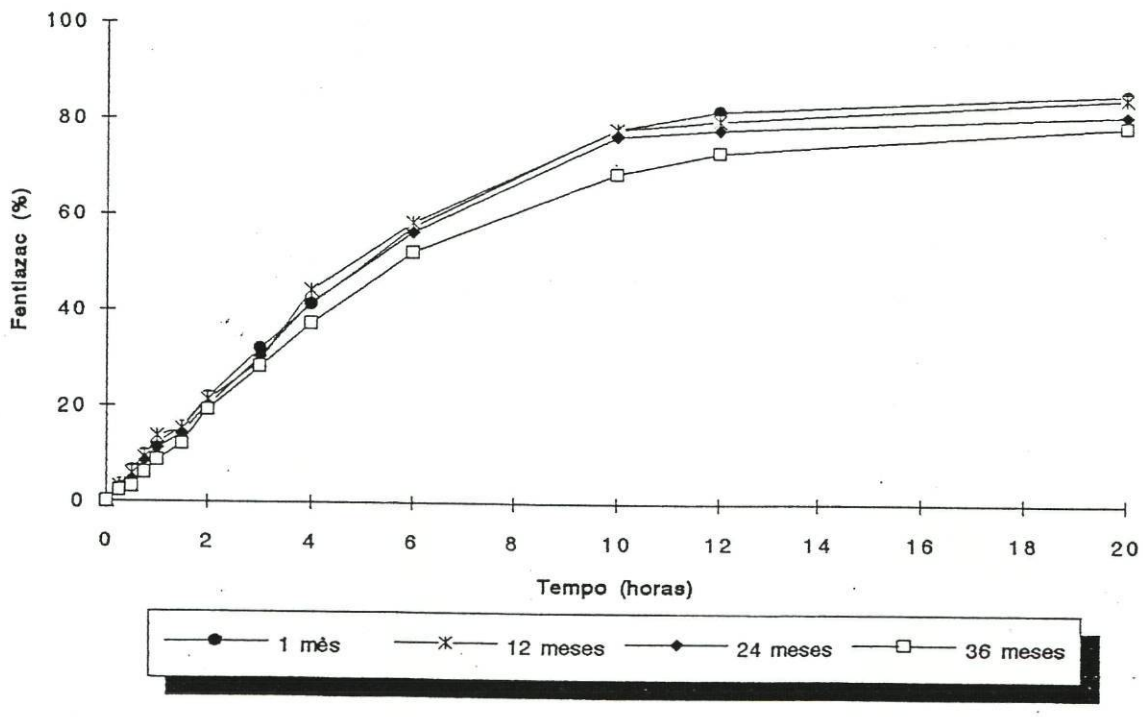


fig.50. Curvas de cedência de Fentiazac correspondentes aos registos do Quadro X.

Quadro XI - Níveis de Fentiazac obtidos "in vitro" cedido a partir de um gele conservado à temperatura de 25 ºC.

Tempo (horas)	Fentiazac (%) 1 mês	12 meses	24 meses	36 meses
0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,25	3,4 ± 0,4	3,0 ± 0,9	2,3 ± 0,4	1,3 ± 0,5
0,5	6,5 ± 0,6	6,1 ± 0,7	4,8 ± 0,5	2,9 ± 0,6
0,75	9,7 ± 0,3	9,1 ± 0,4	6,4 ± 0,9	4,8 ± 0,4
1	12,3 ± 1,2	12,7 ± 1,2	8,5 ± 1,1	7,3 ± 1,0
1,5	15,5 ± 1,8	15,8 ± 1,3	12,0 ± 2,1	10,7 ± 1,5
2	21,9 ± 1,4	22,0 ± 0,9	16,7 ± 1,3	12,1 ± 1,6
3	32,2 ± 1,7	33,6 ± 1,4	22,8 ± 1,9	15,4 ± 2,1
4	41,5 ± 1,9	42,4 ± 1,7	35,3 ± 1,7	22,6 ± 2,3
6	57,6 ± 2,3	57,2 ± 2,1	49,4 ± 1,8	37,2 ± 2,1
10	78,2 ± 2,4	79,3 ± 2,8	72,8 ± 2,3	55,4 ± 2,5
12	81,9 ± 1,8	81,6 ± 2,5	77,5 ± 1,9	64,6 ± 2,6
20	85,6 ± 2,8	84,4 ± 2,1	81,8 ± 2,3	70,1 ± 3,4
AUC (t=20 h)	1287,4 ± 41,6	1286 ± 41,8	1182,1 ± 38,3	949,9 ± 48,7

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05
N = 5

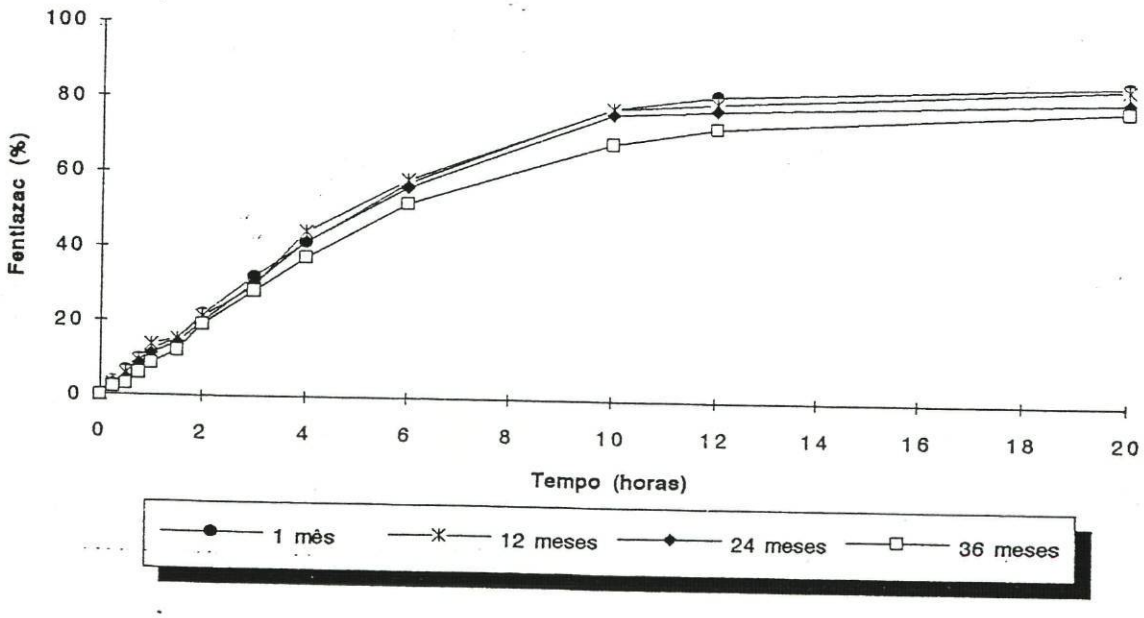


fig.51. Curvas de cedência de Fentiazac correspondentes aos registos do Quadro XI.

Quadro XII - Níveis de Fentiazac obtidos "in vitro" cedido a partir de um gele conservado à temperatura de 37 °C.

Tempo (horas)	Fentiazac (%) 1 mês	12 meses	24 meses	36 meses
0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,25	3,4 ± 0,4	3,2 ± 0,8	1,9 ± 0,2	0,0 ± 0,0
0,5	6,5 ± 0,6	5,9 ± 0,4	4,7 ± 0,7	0,2 ± 0,1
0,75	9,7 ± 0,3	9,8 ± 0,3	8,1 ± 0,5	2,2 ± 0,3
1	12,3 ± 1,2	11,5 ± 0,7	10,8 ± 0,8	4,4 ± 0,8
1,5	15,5 ± 1,8	14,2 ± 1,1	12,7 ± 1,1	9,8 ± 1,1
2	21,9 ± 1,4	20,7 ± 0,8	18,1 ± 0,9	14,3 ± 0,9
3	32,2 ± 1,7	30,2 ± 1,3	27,3 ± 1,3	21,5 ± 2,1
4	41,5 ± 1,9	39,3 ± 1,2	32,8 ± 1,8	23,6 ± 1,8
6	57,6 ± 2,3	55,8 ± 1,4	48,5 ± 1,9	34,1 ± 2,3
10	78,2 ± 2,4	79,3 ± 1,5	69,2 ± 1,7	49,7 ± 2,4
12	81,9 ± 1,8	80,5 ± 2,8	74,8 ± 3,1	60,1 ± 2,7
20	85,6 ± 2,8	83,7 ± 3,5	78,0 ± 2,9	65,7 ± 3,4
AUC (t=20 h)	1287,4 ± 41,6	1263,4 ± 41,6	1143,3 ± 43,8	889,5 ± 47,6

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05
N = 5

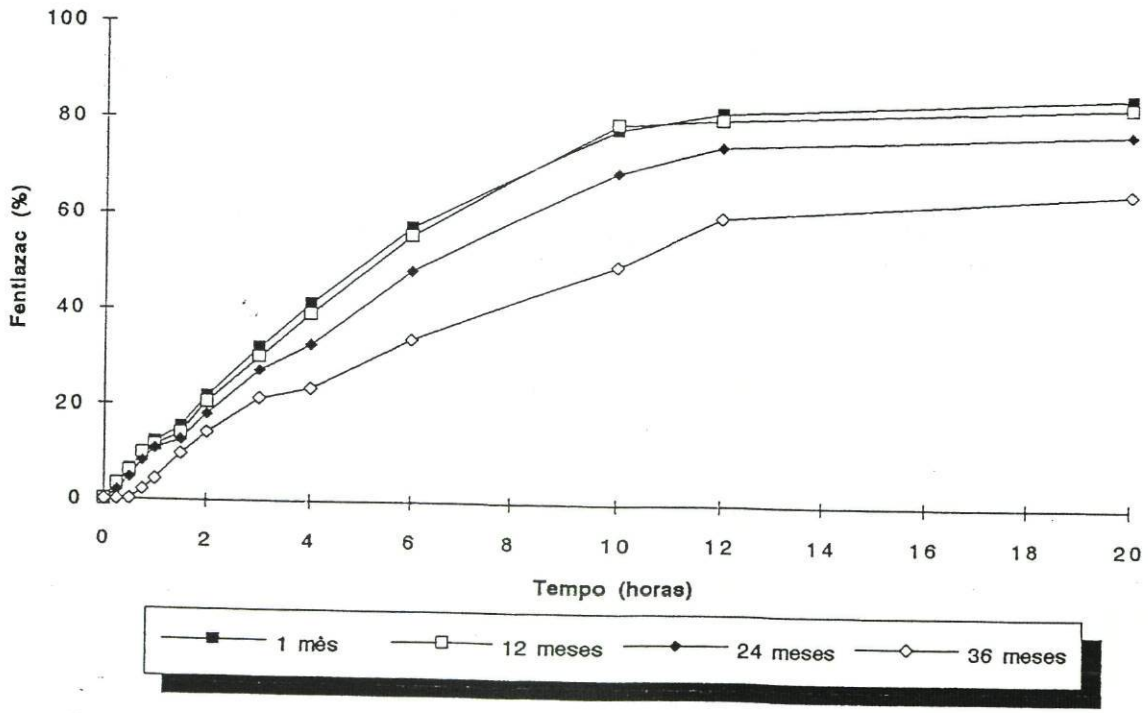


fig.52. Curvas de cedência de Fentiazac correspondentes aos registos do Quadro XII.

6.1.3. Conclusão

Concluindo, pode considerar-se a estabilidade do gele de fentiazac bastante satisfatória ao fim de 3 anos à temperatura ambiente, sendo de recomendar, no entanto, a sua armazenagem em locais frescos.

7. ENSAIOS "in vitro" E "in vivo"

7.1. Difusão "in vitro" do fentiazac através de pele humana de indivíduos com diferentes idades.- Efeito da congelação.

A verificação das formas farmacêuticas pode ser efectuada através de ensaios realizados "in vitro" e "in vivo".

Se bem que já anteriormente tivéssemos apresentado estudos "in vitro" sobre a cedência do fentiazac (Pág.60), utilizando para o efeito membranas epidérmicas artificiais (SARTORIUS), entendemos que seria interessante desenvolver experiências usando membranas biológicas. Recorremos, por isso, ao Serviço de Anatomia Patológica do HGSA que gentilmente, embora com as naturais limitações, colocou à nossa disposição alguns fragmentos de pele humana.

Considerámos que um estudo exaustivo e completo da difusão do fentiazac "in vitro" através de pele humana deveria contemplar factores de variação intra-individuais (por exemplo, diversas regiões de aplicação) e inter-individuais (como o sexo, a idade, entre outros), o que se nos afigurava deveras extenso e de morosa execução. Optámos, por isso, por estudar apenas o efeito da congelação numa região anatómica (o ombro) e consoante a idade do indivíduo. Deste modo, o estudo não tem o rigor do significado que a estatística exige, mas fornece indicações úteis para um eventual desenvolvimento futuro. Finalmente, referimos que a escolha do ombro se deve ao facto de esta região apresentar menores diferenças inter-individuais de comportamento, certamente por não se tratar de uma zona pilosa por excelência.

7.1.1. Material e métodos.

7.1.1.1. Aparelhagem

- aparelho de dissolução de formas farmacêuticas orais sólidas oficializado na (F.P. V) a cuja haste se adaptou uma câmara apropriada para colocação da pele.

- placas de Petri.

- balança de precisão - Mettler AE 200.

7.1.1.2. Reagentes.

- solução tampão de fosfatos pH 7,0 (USP XXI) - fase receptora.

- solução de Ringer.

7.1.1.3. Obtenção e preparação da pele.

As amostras de pele humana foram obtidas durante as autópsias, correspondendo sempre à mesma região anatómica (ombro). A cada fragmento foi retirada a hipoderme e, posteriormente, lavado com solução de Ringer. De seguida foi dividido em duas fracções: uma para ser utilizada imediatamente; outra para congelar a -20 ^{o}C durante 48 horas. Após esse período, a pele foi descongelada à temperatura ambiente, seguindo-se o ensaio de difusão.

7.1.1.4. Ensaio de difusão.

Aplicaram-se uniformemente sobre a epiderme tratada 378 mg de pomada (formulação F8).

Adaptou-se a pele bem esticada à câmara, mergulhando seguidamente na fase receptora, e submetendo à agitação de 100 r.p.m. à temperatura de 37 ^{o}C

Recolheram-se amostras de 0,5 ml da fase receptora 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após o início do ensaio, procedendo-se à determinação da quantidade acumulada de fentiazac.

7.1.1.5. Doseamento

A determinação da quantidade acumulada de fentiazac foi efectuada por HPLC, cuja técnica se encontra descrita na (Pág.119).

Quadro XIII - Difusão "in vitro" do fentiazac (%) através de pele humana com diferentes idades em função do tratamento por congelação.

Tempo (horas)	1 - 6 meses		7 - 12 anos		25 - 35 anos		65 - 80 anos	
	A	B	A	B	A	B	A	B
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1,7	1,9	0,9	1,1	0,3	0,8	-	0,2
4	3,1	4,7	1,8	2,1	1,1	2,2	0,4	0,9
6	4,5	5,1	2,9	2,8	2,3	3,4	1,1	1,8
8	6,7	7,4	3,7	3,9	3,1	4,3	2,1	2,4
12	8,9	10,6	5,8	6,3	3,9	5,1	2,9	4,1
24	16,3	18,9	11,7	12,4	7,2	10,4	4,8	6,2

A - **Sem congelação**

B - **Congelação/descongelação**

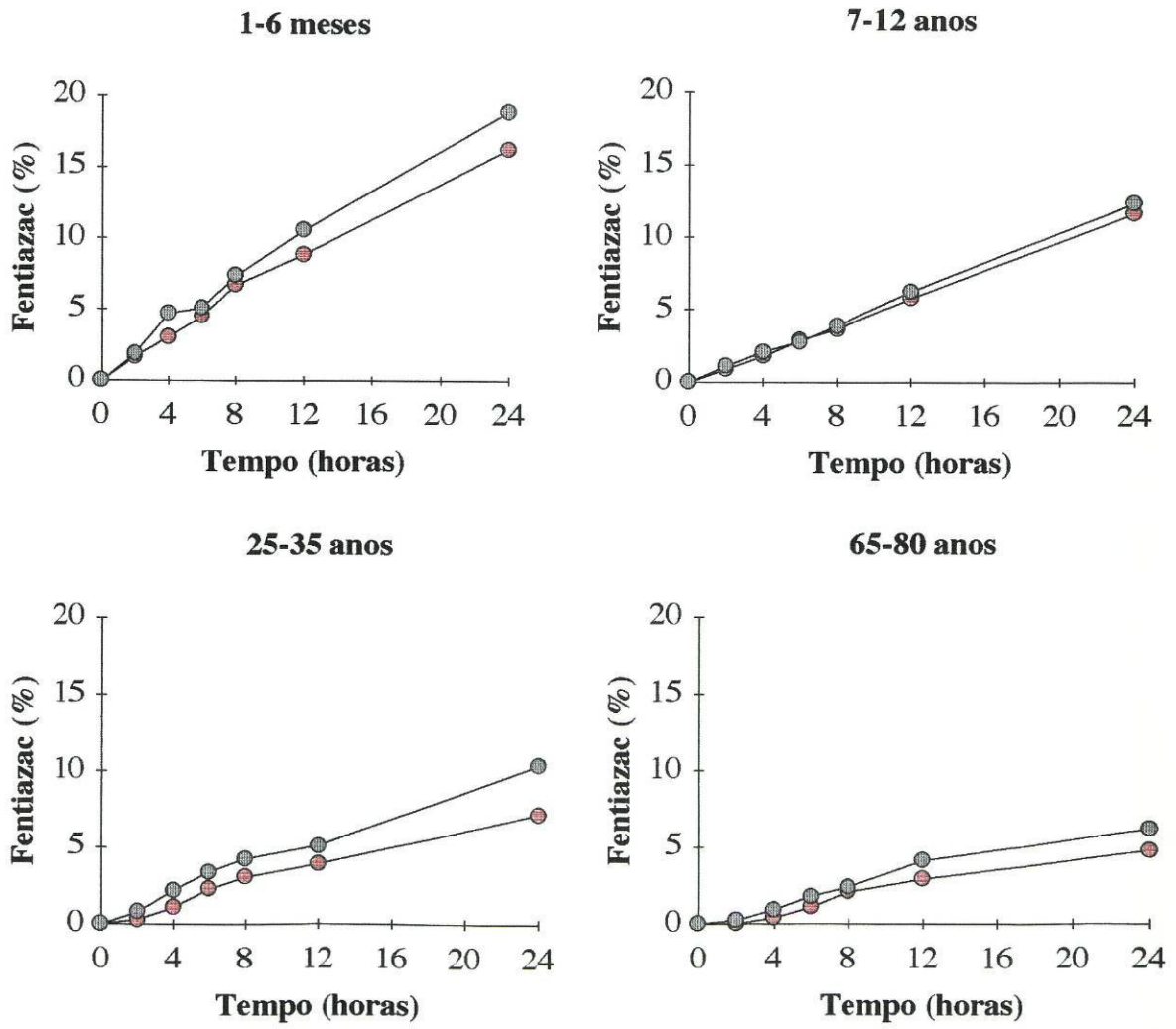


fig. 53 Curvas referentes aos ensaios de difusão registados no Quadro anterior.

7.1.2. Resultados e discussão.

Os resultados obtidos estão indicados no **Quadro XIII** e graficamente representados na **fig.53**. Como se pode verificar, é notório o efeito da congelação/descongelação. Na realidade, em todos os grupos etários, sempre que foi utilizada pele submetida a congelação seguida de descongelação, a taxa de fentiazac difundido foi ligeiramente superior. Este facto poderá ser explicado pela orientação e disposição que as fibras adquirem após a congelação/descongelação da pele.

Não só a diferente disposição das fibras pode proporcionar um aumento da permeabilidade da pele, como até mesmo a eventualidade de algumas delas se romperem pelo tratamento a que foram submetidas pode contribuir para o mesmo resultado.

Relativamente a indivíduos com idades diferentes, pode verificar-se que os desvios se notam ao nível da pele de bébé e da pele proveniente de indivíduos geriátricos.

Ao nível dos jovens (7-12 anos) e dos adultos (25-35 anos), as diferenças registadas não são notórias para o número de casos estudados.

Através da pele de idosos, as concentrações de fentiazac difundido são inferiores, atendendo a que uma pele senil é pouco espessa também, mas é muito menos hidratada e, relativamente mais fibrosa e compacta.

7.2. Absorção "in vivo".

Realizaram-se ensaios "in vivo" em indivíduos humanos saudáveis e de ambos os sexos, de forma a avaliar a absorção percutânea do fentiazac veiculado em geles de Carbopol 940 neutralizados com trietanolamina e com solução de hidróxido de sódio, correspondentes. respectivamente, às formulações (F7) e (F8) já referidas na (Pág. 59).

As duas formulações apesar de se apresentaraem qualitativa e quantitativamente idênticas, diferindo apenas no agente de neutralização, proporcionaram níveis de cedência do anti-inflamatório bastante diferentes, como comprovam os ensaios "in vitro", anteriormente efectuados e comentados na (Pág. 72).

Tendo por princípio, que nem sempre o que se verifica "in vitro" traduz o que sucede "in vivo", procuramos confirmar os resultados anteriormente obtidos.

7.2.1. Material e métodos.

Os ensaios foram efectuados em indivíduos com idade compreendida entre 21 e 47 anos, de ambos os sexos e não submetidos a qualquer outro esquema terapêutico.

Aos 8 voluntários foram aplicadas 4 x 4 gramas da formulação **F8** conforme está indicado na **fig.56**, tendo sido efectuadas colheitas de sangue 8, 12, 24 e 36 horas após a 1ª aplicação.

Em 4 dos 8 voluntários anteriores repetiu-se o ensaio, agora com a formulação **F7**, seguindo um protocolo idêntico.

7.2.2. Processo analítico.

a) Aparelhagem

- Cromatógrafo líquido de alta pressão de mistura binária Varian 5000, equipado com detector U.V. de comprimento de onda variável e ligado a integrador Varian, modelo 4290.
- Centrífuga ECCO Type: EII/11.
- Rotavapor Buchi RE111, incluindo um banho termostatado Buchi 461.
- Frigorífico Agni.

b) Reagentes e soluções

Todos os reagentes usados eram de grau de pureza p.a., Merck. As soluções de fentiazac e de carbamazepina (padrão interno) foram preparadas com metanol Lichrosolv na concentração de 100 μg/ml e, a partir destas prepararam-se soluções de trabalho contendo 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 μg/ml de fentiazac e de padrão interno.

Estas soluções foram conservadas em frigorífico, retiradas apenas no momento da injecção e sempre protegidas da luz.

As soluções de fentiazac eram renovadas todas as semanas.

c) Amostras de soro para análise.

Os soros usados na validação da técnica de análise do fentiazac foram obtidos de indivíduos que não estavam submetidos a qualquer esquema terapêutico. Foi efectuado um "pool" de várias amostras e, a partir deste, foram tomadas as fracções necessárias para adição de diferentes concentrações de fentiazac. Seguiu-se a extracção e o estudo da recuperação.

d) Condições cromatográficas.

- Pré-coluna C_{18} Altech, 30-40 μm

- Coluna RP-18, Spherisorb, com 25 cm de comprimento, 4,5 mm de diâmetro interno e 10 μm de tamanho de partícula.

- Eluente - constituído por uma mistura de metanol e tampão de acetato de amónio 0,1% (65-35 v/v), pH 6,9.

- Velocidade de fluxo - 0,7 ml/min

- Detecção - espectrofotométrica (245 nm)

- Volume de líquido injectado - 20 μl

- Sistema de registo - Integrador Varian, modelo 4290

Os tempos de retenção médios foram **oito** minutos para o fentiazac e **dez** para a carbamazepina (padrão interno)

e) Preparação dos extractos de soro.

Técnica: Para tubo de centrífuga medir 0,5 ml de soro, 0,5 ml de solução de padrão interno e acidificar com HCl 5N até pH 2. Extrair o fentiazac e o padrão interno com 4 ml de diclorometano, agitando em Vortex 3 minutos. Centrifugar durante 15 minutos a 2000 r.p.m. Regeitar a fase aquosa e levar à secura a fase orgânica, retomando o resíduo com 0,5 ml de metanol e analisar por HPLC.

f) Estudo de recuperação.

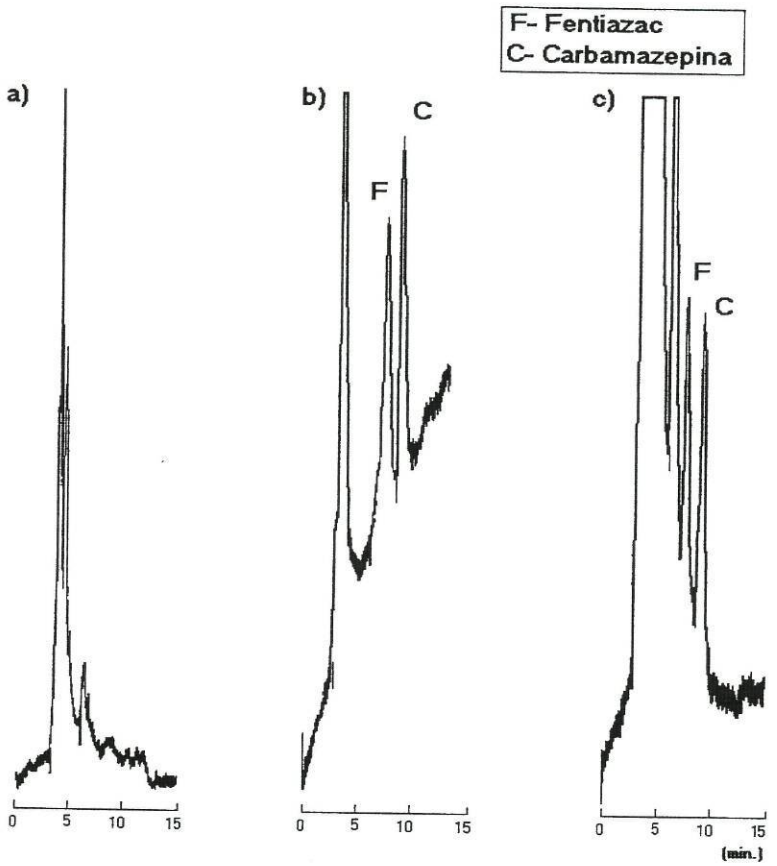
A soro humano isento de medicamentos adicionou-se fentiazac e carbamazepina nas concentrações de 0,25; 1,0 e 2,0 μg/ml. Depois de submetido ao processo extractivo descrito anteriormente, obtiveram-se os respectivos extractos. Depois de analisados, calcularam-se as recuperações considerando as razões das alturas dos picos cromatográficos do fentiazac e do padrão interno nos respectivos cromatogramas, e relacionando com os valores registados nos cromatogramas padrão nas concentrações estudadas. Este estudo processou-se separadamente com 5 amostras do mesmo soro, o que permitiu também avaliar a exactidão do método através da determinação do coeficiente de variação.

Fentiazac (μg/ml)	$\bar{X}$ (%)	**C.V.** (%)	**Xmáx** (%)	**Xmín** (%)	**N**
0,25	93	3,3	98	90	5
1,0	92	2,4	95	90	5
2,0	90	3,8	92	85	5

c.v. - coeficiente de variação.

N - nº de ensaios.

CROMATOGRAMAS



a) Cromatograma de um extracto de soro sem fentiazac submetido ao processo extractivo. (branco)

b) Cromatograma de uma solução padrão de fentiazac e carbamazepina na concentração de 0,25 μg/ml.
F- fentiazac; C- carbamazepina

c) Cromatograma de um extracto de soro de um indivíduo submetido a tratamento com fentiazac.
F- fentiazac; C- carbamazepina

Quadro XIV- Concentrações séricas de fentiazac obtidas com indivíduos voluntários, em função do tempo, após aplicação das formulações F7 e F8.

fentiazac (ng/ml)								
	M1		**F1**		**M2**		**F2**	
Horas	Triet. (F7)	NaOH (F8)	Triet. (F7)	NaOH (F8)	Triet. (F7)	NaOH (F8)	Triet. (F7)	NaOH (F8)
8	-	89	-	21	-	33	-	12
12	41	160	35	135	13	73	14	68
24	55	148	81	169	46	94	99	160
36	27	72	47	98	6	85	77	110

M1 - ind. sexo masculino; 29 anos; 70 Kg.
F1 - ind. sexo feminino; 32 anos; 70 Kg.
M2 - ind. sexo masculino; 34 anos; 87 Kg.
F2 - ind. sexo feminino; 21 anos; 50 Kg.

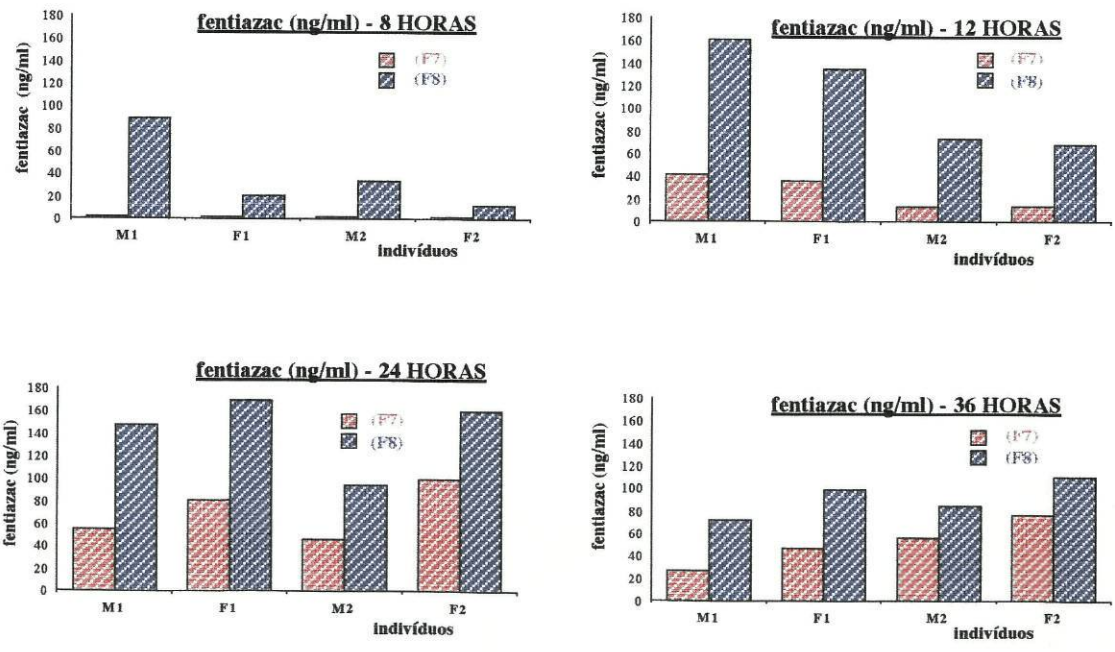
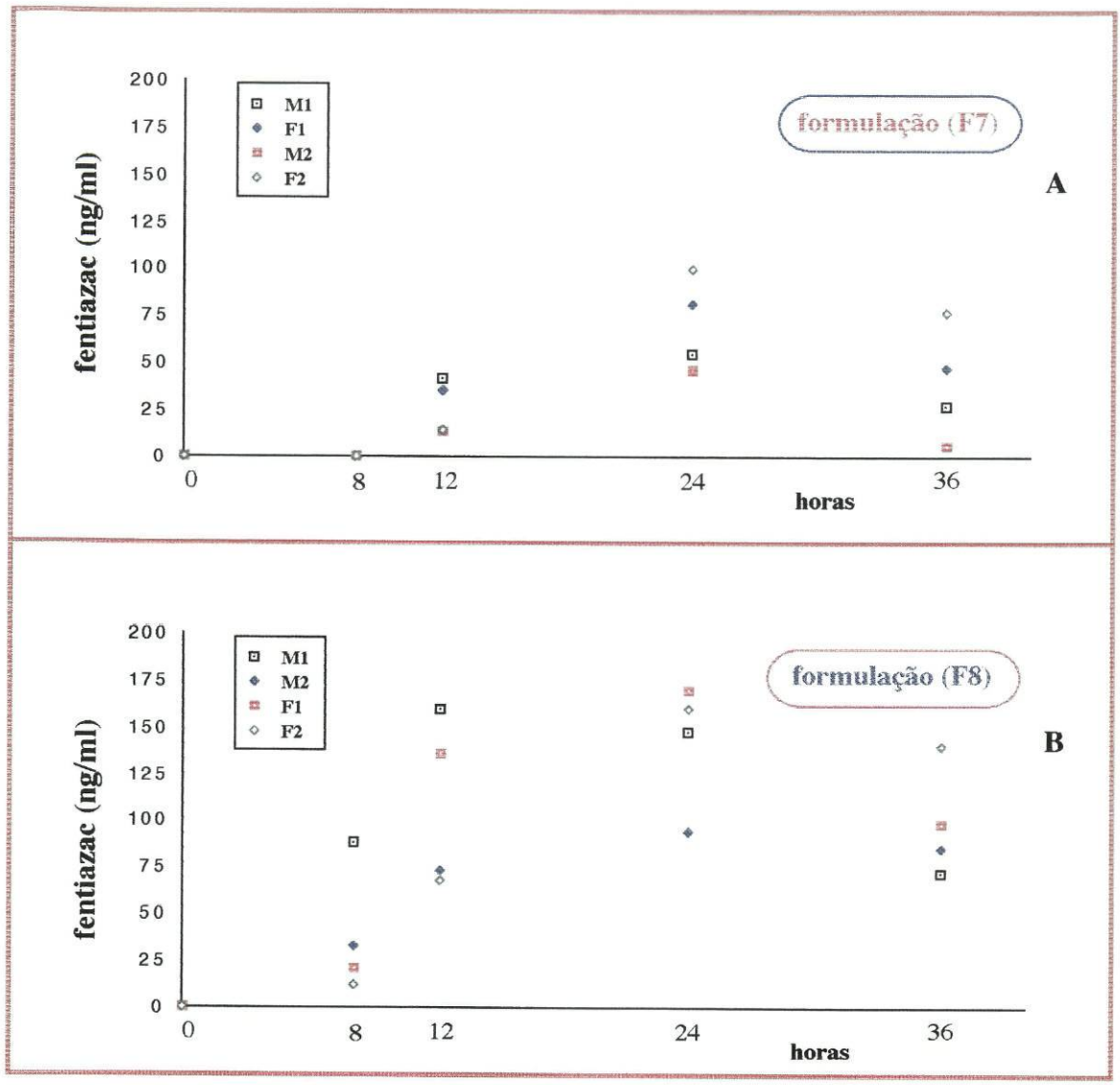
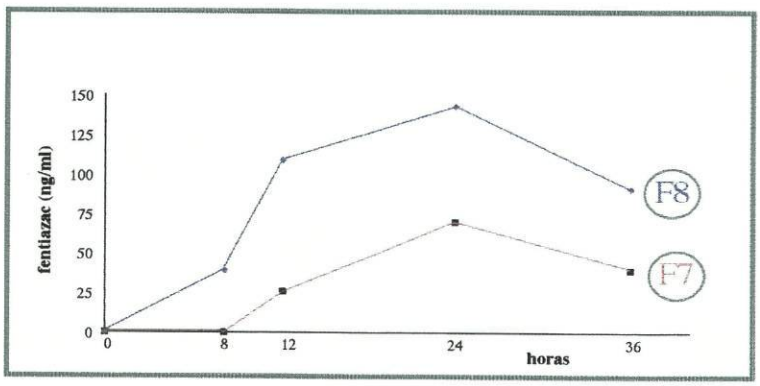


fig 54. Representação gráfica referente ao **Quadro XIV.**





C

fig. 55 . Representação gráfica das concentrações séricas obtidas com voluntários humanos.

A e **B** - Representação das concentrações séricas de fentiazac obtidas individualmente após aplicação da formulação F7 e F8, respectivamente.

C - Representação dos valores médios das concentrações séricas de fentiazac obtidas após aplicação das formulações F7 e F8.

Quadro XV - Concentrações séricas de fentiazac obtidas com indivíduos voluntários, em função do tempo, após aplicação da formulação F8

fentiazac (ng/ml)								
Horas	**M1**	**M2**	**M3**	**F1**	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**
8	89	33	32	21	12	-	-	17
12	160	73	48	135	68	41	32	79
24	148	94	195	169	160	87	141	137
36	72	85	45	98	110	40	40	101

M1 - ind. sexo masculino; 29 anos; 70 Kg.
M2 - ind. sexo masculino; 34 anos; 87 Kg.
M3 - ind. sexo masculino; 33 anos; 67 Kg.
F1 - ind. sexo feminino; 32 anos; 70 Kg.
F2 - ind. sexo feminino; 21 anos; 50 Kg.
F3 - ind. sexo feminino; 47 anos; 70 Kg.
F4 - ind. sexo feminino; 34 anos; 50 Kg.
F5 - ind. sexo feminino; 32 anos; 62 Kg.

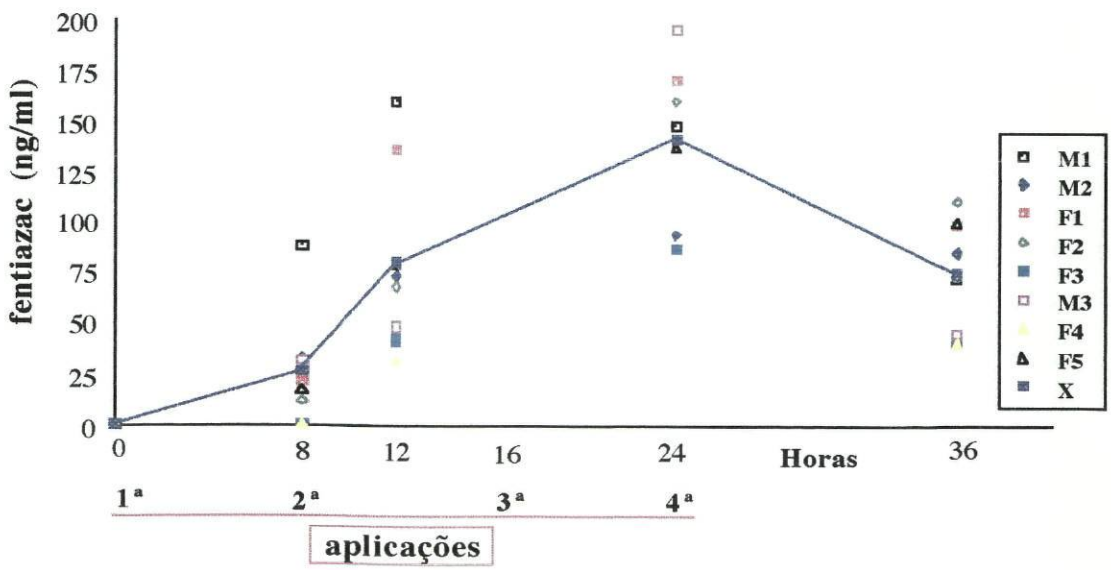


fig. 56. Representação gráfica do Quadro anterior.

7.2.3. Discussão de resultados

Os resultados dos ensaios biológicos são sempre muito variáveis, pelo que a análise dos mesmos se deve circunscrever apenas a este caso concreto e às condições de ensaio praticadas.

A neutralização do Carbopol pelo hidróxido de sódio (**F8**) traduz, de facto, um aumento da quantidade total de fentiazac absorvida.

Ao fim de **8 horas** já existe uma concentração superior à obtida ao fim de **12 horas** com a trietanolamina.

A neutralização com esta base, como se pode observar através do **Quadro XIV** e das (figs.54 e 55), retarda o início da absorção. Ao fim de **8 horas** não foi detectado fármaco no sangue, evidenciando um período de latência (lag-time) mais dilatado. Na (fig.31) da Pág.69 pode ser observado esse período de lactência.

A concentração máxima é atingida ao fim de **24 horas** , quer se use valores médios para cada tempo (fig.55-C), quer individualmente (figs. 54 e 55-A e B).

Na discussão de resultados apresentada no ponto **3.4** (Pág.72) referimos que o facto da trietanolamina evidenciar um menor poder neutralizante relativamente ao hidróxido de sódio, implica que a quantidade necessária à neutralização do Carbopol seja maior, o que significa que a mobilidade das moléculas de fentiazac seja menor dado o aprisionamento a que estão submetidas. Nestas circunstâncias a cedência do referido fármaco diminui. Por outro lado, devido ao carácter básico mais forte do hidróxido de sódio, a permeabilidade celular é afectada, facilitando por isso a passagem do fentiazac.

Do ponto de vista biológico não é significativa a diferença detectada no voluntário **M1** (160-148 ng/ml), o que faz com que as curvas tenham sensivelmente a mesma configuração gráfica, não ocorrendo uma antecipação do tempo ao fim do qual se atinge a concentração máxima. Esta constatação é confirmada através das áreas sob as curvas (955 e 2666 com trietanolamina e com NaOH, respectivamente).Sabe-se que a última tomada de ensaio corresponde às **36 horas**, altura em que existe ainda uma concentração significativa de fentiazac. Mas até essa altura a área obtida com a formulação **F8** (neutralização com NaOH) é

cerca de 3 vezes superior à conseguida com a formulação **F7** (neutralização com trietanolamina), o que implica a absorção de uma quantidade de fentiazac muito maior.

Além disso, as concentrações são significativamente diferentes. Referimos já que ao fim de **8 horas**, com a **F8**, se tem uma concentração superior à obtida ao fim de **12 horas** com a a **F7**. Assinalamos também que decorridas **12 horas** a concentração obtida com a **F8** é maior que a concentração máxima conseguida com a **F7** ao fim de **24 horas**, e que a concentração passadas **36 horas** com a **F8** (já em plena fase de eliminação) é ainda superior à concentração máxima obtida com a **F7**.

Dada a influência do veículo na farmacocinética do fentiazac, pode concluir-se que, em princípio, as concentrações de fentiazac encontradas no sangue dos indivíduos atingirão níveis superiores, com menor tempo de lactência, quando se procede à neutralização do Carbopol com hidróxido de sódio em substituição da trietanolamina.

8. EFEITO PROMOTOR

A presença de determinados compostos, actuando por mecanismos diversos, pode proporcionar variações no fluxo de um fármaco através da pele, mediante modificações na estrutura das membranas celulares, alterações dos coeficientes de difusão e dos coeficientes de partilha estrato córneo/veículo, influência mais marcada no conteúdo hídrico cutâneo, diminuição das tensões interfasiais e ainda outros parâmetros.

Refira-se, entretanto, que tais substâncias devem ser inócuas, farmacologicamente inactivas, não interagirem com os princípios activos nem modificarem as propriedades físicas da forma farmacêutica. Algumas dessas substâncias, conhecidas como promotores, aceleradores, activadores ou modificadores da absorção foram objecto de estudo no presente trabalho.

8.1.Influência da Dimetilformamida (DMF), Laurilsulfato de sódio (LsS) e do Tween 80 (T80).

A formulação (F8) constituída por um gele de Carbopol 940 e fentiazac foi adicionada de alguns desses aditivos em concentrações variadas, e por técnica "in vitro" foi quantificada a cedência do anti-inflamatório. As substâncias utilizadas representam, respectivamente, um solvente - Dimetilformamida (DMF) e dois tensioactivos - um aniónico -Laurilsulfato de sódio (LsS) e outro não iónico - Tween 80 (T80).

A DMF pode graças ao seu poder dissolvente, alterar a permeabilidade das membranas celulares, promovendo a passagem dos fármacos.

Quanto aos tensioactivos, sabe-se que as suas moléculas em solução aquosa tendem a formar micelas quando a sua concentração atinge a concentração micelar crítica (CMC). A capacidade destas micelas incluirem no seu interior moléculas pouco solúveis em água possibilita a sua solubilização, facilitando, assim, a passagem dos princípios activos através das membranas ou dos espaços intercelulares. Uma vez transposta a barreira, é desejável a disponibilidade dos fármacos para haver eficácia do efeito terapêutico. A libertação só se efectua, porém, quando é quebrada a estrutura micelar ou desfeita de algum modo a ligação fármaco tensioactivo. Esta

transição depende da maior ou menor influência das modificações sobre a energia do sistema administrado perante as novas condições inerentes ao meio fisiológico.

8.1.1.Ensaio com membranas epidérmicas artificiais (Sartorius)

8.1.1.1. Material e métodos.

-Aparelhagem, reagentes, processo analítico e membranas epidérmicas artificiais - conforme descrito em **3.2** (Pág. 61).

- À formulação base de Carbopol 940 e fentiazac (F8) foi adicionada, respectivamente, DMF, LsS e T80, nas concentrações de 0,025%; 0,05%; 0,25%; 0,5% e 1%.

Quadro XVI - Cedência de fentiazac (%) veiculado em gele através de membranas artificiais (SARTORIUS), em função da concentração de DMF.

		DMF (%)				
Tempo (horas)	**Sem Promotor**	**0.025**	**0.050**	**0.250**	**0.500**	**1.000**
0	0	0	0	0	0	0
0,25	3,4 ± 0,4	2,5 ± 0,7	2,6 ± 0,5	2,9 ± 0,3	4,1 ± 1,3	3,9 ± 0,7
0,5	6,5 ± 0,6	4,7 ± 0,5	4,9 ± 1,1	5,7 ± 0,6	5,6 ± 0,9	6,5 ± 0,8
0,75	9,7 ± 0,3	9,6 ± 0,8	9,9 ± 2,3	8,8 ± 1,1	10,4 ± 2,3	11,3 ± 2,3
1,0	12,3 ± 1,2	12,4 ± 1,8	12,8 ± 2,1	11,8 ± 0,9	13,5 ± 1,7	15,1 ± 2,7
1,5	15,5 ± 1,8	18,3 ± 2,1	18,7 ± 1,9	17,1 ± 2,3	18,3 ± 2,8	24,3 ± 3,1
2,0	21,9 ± 1,4	20,9 ± 2,8	21,3 ± 3,0	22,4 ± 3,1	28,4 ± 3,1	32,5 ± 2,1
3,0	32,2 ± 1,7	31,4 ± 1,9	32,5 ± 3,2	35,2 ± 0,9	41,1 ± 1,9	47,0 ± 0,9
4,0	41,5 ± 1,9	40,6 ± 3,1	40,8 ± 2,4	48,6 ± 2,3	53,0 ± 2,7	59,4 ± 2,1
6,0	57,6 ± 2,3	58,9 ± 0,5	59,2 ± 1,1	62,5 ± 1,0	64,5 ± 0,8	73,6 ± 1,3
8,0	70,4 ± 2,8	71,5 ± 2,7	71,5 ± 3,5	76,0 ± 1,9	71,2 ± 3,1	85,2 ± 1,7
10,0	78,2 ± 2,9	77,6 ± 2,6	77,9 ± 2,9	79,8 ± 2,8	82,6 ± 2,7	89,4 ± 1,9
AUC (t=10 h)	462,3 ± 20,4	464,2 ± 19,9	467,5 ± 23,9	499,0 ± 17,3	515,1 ± 21,9	590,7 ± 17,0

(±) intervalo de confiança - 95% t = 0,05 N = 4

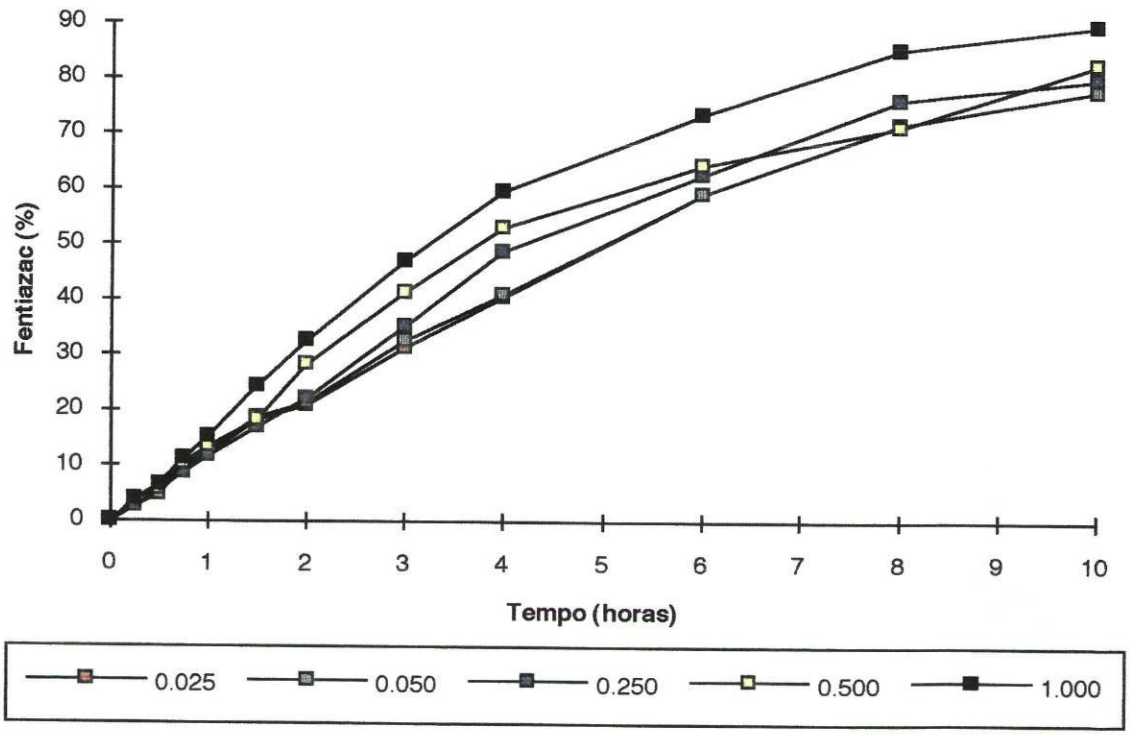


fig. 57. Curvas de cedência de fentiazac veiculado em gele na presença de DMF, através de membranas artificiais (SARTORIUS).

Quadro XVII - Cedência de fentiazac (%) veiculado em gele através de membranas artificiais (SARTORIUS), em função da concentração de LsS.

		LsS (%)				
Tempo (horas)	**Sem Promotor**	**0.025**	**0.050**	**0.250**	**0.500**	**1.000**
0	0	0	0	0	0	0
0,25	3,4 ± 0,4	2,8 ± 0,4	3,2 ± 1,3	3,4 ± 1,0	3,8 ± 0,3	10,5 ± 2,7
0,5	6,5 ± 0,6	6,1 ± 0,7	6,3 ± 0,9	6,4 ± 0,9	7,6 ± 1,4	18,3 ± 2,1
0,75	9,7 ± 0,3	9,8 ± 1,1	10,1 ± 2,7	10,3 ± 2,1	14,5 ± 2,1	25,3 ± 0,9
1,0	12,3 ± 1,2	12,5 ± 0,9	13,0 ± 1,1	14,0 ± 2,2	21,3 ± 0,9	34,5 ± 0,7
1,5	15,5 ± 1,8	15,1 ± 2,3	20,3 ± 0,9	20,6 ± 3,1	30,7 ± 2,7	44,3 ± 2,1
2,0	21,9 ± 1,4	20,7 ± 2,7	28,5 ± 1,2	27,6 ± 0,9	41,8 ± 2,6	50,2 ± 3,1
3,0	32,2 ± 1,7	32,6 ± 2,4	42,9 ± 2,3	39,0 ± 2,1	49,7 ± 2,1	55,8 ± 1,9
4,0	41,5 ± 1,9	40,9 ± 2,2	53,2 ± 3,1	49,2 ± 3,1	55,0 ± 1,1	58,3 ± 2,1
6,0	57,6 ± 2,3	58,1 ± 0,9	64,6 ± 1,2	55,3 ± 0,8	68,1 ± 1,3	63,2 ± 1,0
8,0	70,4 ± 2,8	70,6 ± 3,6	77,3 ± 2,7	70,8 ± 2,1	73,8 ± 2,4	64,8 ± 3,7
10,0	78,2 ± 2,9	77,8 ± 3,4	82,2 ± 2,1	79,6 ± 3,0	77,4 ± 3,9	65,4 ± 3,0
AUC (t=10 h)	462,3 ± 20,4	461,6 ± 23,7	530,8 ± 21,4	486,9 ± 19,6	554,8 ± 19,6	550,9 ± 22,5

(±) intervalo de confiança - 95% t = 0,05 N = 4

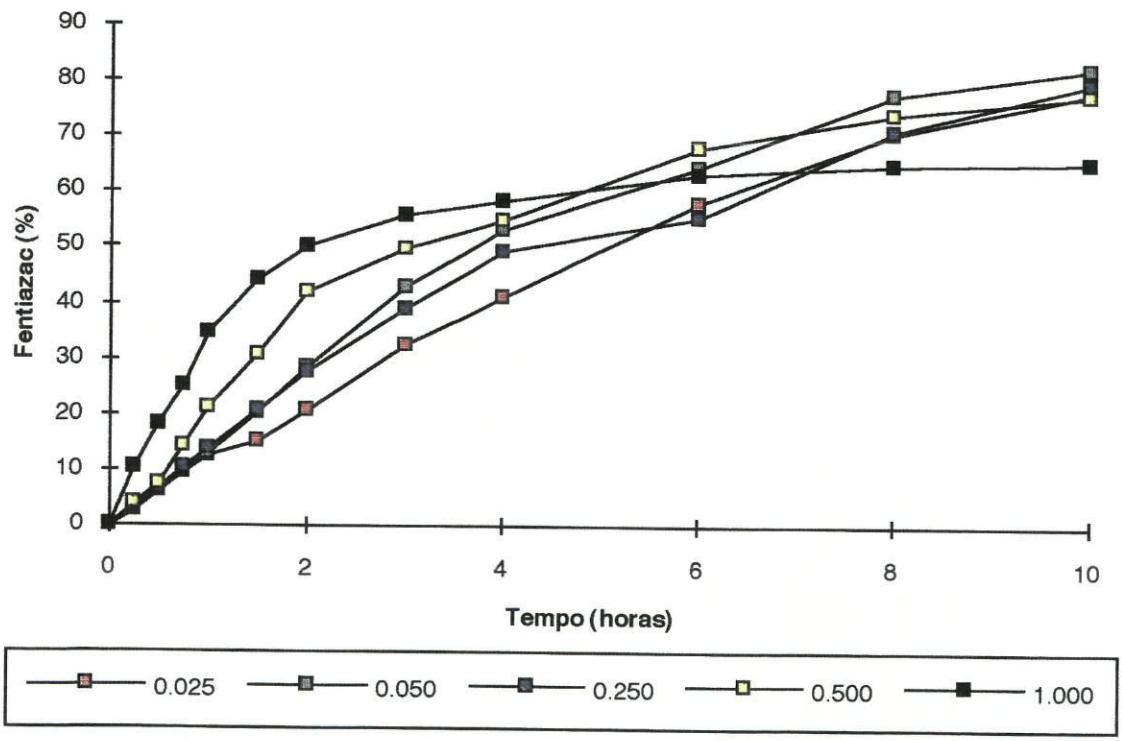


fig. 58. Curvas de cedência de fentiazac veiculado em gele na presença de LsS, através de membranas artificiais (SARTORIUS).

Quadro XVIII - Cedência de fentiazac (%) veiculado em gele através de membranas artificiais (SARTORIUS), em função da concentração de T80.

		Tween 80(%)				
Tempo (horas)	**Sem Promotor**	**0.025**	**0.050**	**0.250**	**0.500**	**1.000**
0	0	0	0	0	0	0
0,25	3,4 ± 0,4	4,4 ± 1,0	4,3 ± 0,9	4,2 ± 0,8	3,6 ± 1,1	9,4 ± 1,9
0,5	6,5 ± 0,6	8,7 ± 0,9	8,7 ± 1,4	7,3 ± 1,7	9,3 ± 2,1	15,7 ± 2,3
0,75	9,7 ± 0,3	11,3 ± 1,7	14,4 ± 2,1	12,3 ± 2,3	14,4 ± 2,8	19,3 ± 1,8
1,0	12,3 ± 1,2	14,3 ± 2,1	18,0 ± 0,9	15,8 ± 3,1	20,4 ± 3,1	23,3 ± 2,3
1,5	15,5 ± 1,8	21,0 ± 1,8	27,0 ± 2,3	25,0 ± 2,8	26,8 ± 3,2	34,5 ± 2,1
2,0	21,9 ± 1,4	29,0 ± 2,5	34,0 ± 3,7	32,8 ± 1,9	39,3 ± 1,3	44,6 ± 0,9
3,0	32,2 ± 1,7	38,7 ± 3,2	49,6 ± 2,9	49,7 ± 2,7	55,3 ± 1,8	50,3 ± 2,7
4,0	41,5 ± 1,9	47,6 ± 3,1	62,0 ± 2,2	62,3 ± 3,1	60,5 ± 2,1	58,9 ± 1,7
6,0	57,6 ± 2,3	62,3 ± 1,3	70,3 ± 0,9	69,5 ± 0,8	65,2 ± 0,9	63,1 ± 1,0
8,0	70,4 ± 2,8	72,7 ± 2,9	83,8 ± 1,2	76,2 ± 1,9	68,7 ± 3,7	67,5 ± 2,6
10,0	78,2 ± 2,9	75,8 ± 3,2	85,7 ± 2,3	77,3 ± 2,4	72,1 ± 3,9	69,4 ± 3,1
AUC (t=10 h)	462,3 ± 20,4	499,6 ± 23,9	589,1 ± 18,1	560,8 ± 20,3	543,3 ± 23,3	539,8 ± 19,2

(±) intervalo de confiança - 95% t = 0,05 N = 4

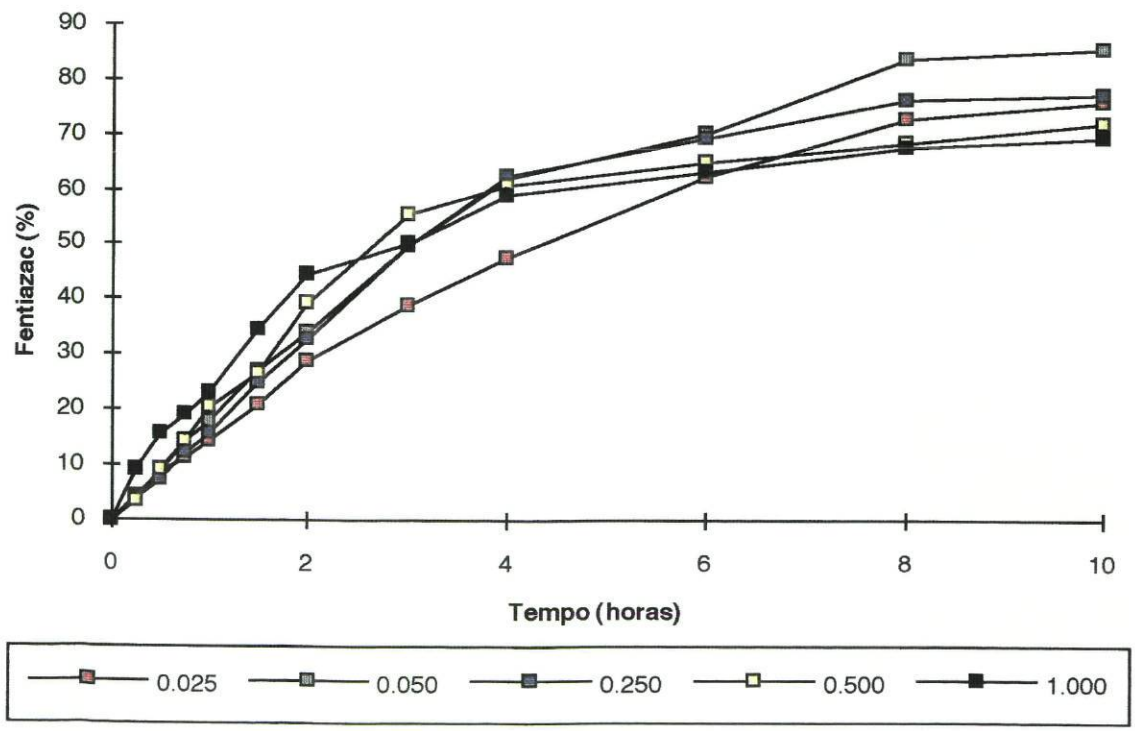


fig. 59. Curvas de cedência de fentiazac veiculado em gele na presença de T80, através de membranas artificiais (SARTORIUS).

Quadro XIX. Cedência de fentiazac (%) veiculado em gele através de membranas artificiais em função dos promotores utilizados, após 6 horas de ensaio.

	Concentração do promotor (%)					
	0	0.025	0.050	0.250	0.500	1.000
DMF	57,6 ± 1,3	58,8 ± 0,5	59,2 ± 1,1	62,5 ± 1,0	64,5 ± 0,8	73,6 ± 1,3
LsS	57,6 ± 1,3	58,1 ± 0,9	64,3 ± 1,2	55,3 ± 0,8	68,1 ± 1,3	63,2 ± 1,0
T80	57,6 ± 1,3	62,3 ± 1,3	70,3 ± 0,9	69,5 ± 0,8	65,2 ± 0,9	63,1 ± 1,0

DMF - Dimetilformamida
LsS - Laurilsulfato de sódio
T80 - Tween 80

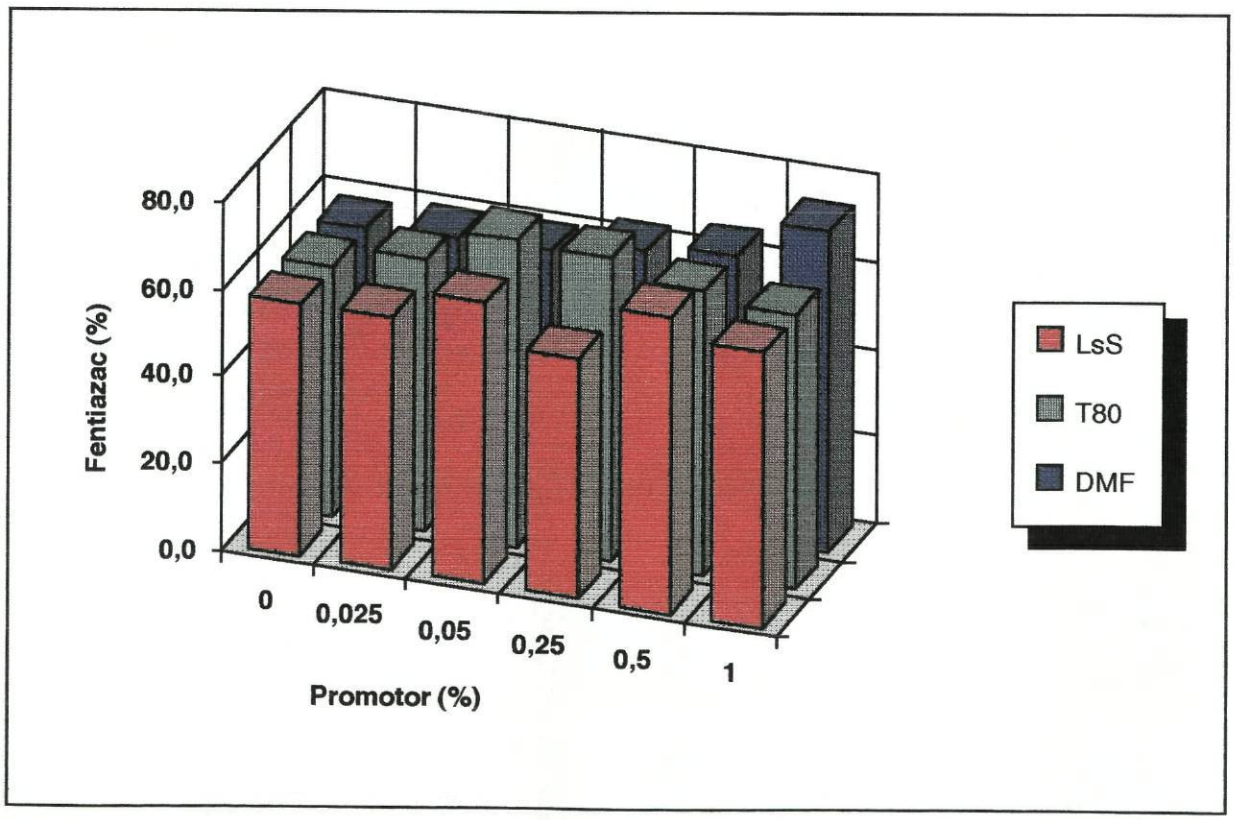


fig. 60. Variação da cedência de fentiazac em função da concentração dos promotores.

8.1.1.2. Resultados e Discussão

Os resultados dos ensaios realizados constam dos Quadros XVI, XVII, XVIII e XIX e estão representados graficamente nas figuras 57, 58, 59 e 60.

Em relação à DMF verifica-se que a um progressivo aumento da sua concentração corresponde sempre uma maior cedência de fentiazac, principalmente para concentrações de DMF superiores a 0,5%, situação que poderá ser explicada pelo facto deste promotor provocar um enfraquecimento da estrutura das membranas. Essa alteração foi visivelmente notada em todos os ensaios efectuados para concentrações superiores, sobretudo na membrana lipófila, atendendo ao grande poder dissolvente da DMF que facilita, por certo, cada vez mais a passagem do princípio activo.

Relativamente ao LsS pode observar-se, para concentrações compreendidas entre 0,025 e 0,05%, um aumento da cedência do fentiazac, que poderá ser devido a um estado de energia elevado em que se encontra o sistema, permitindo assim uma maior libertação do princípio activo. Entre 0,05 e 0,25% regista-se uma diminuição acentuada da cedência para 55,3%, verificando-se novamente uma subida para 68,1%, correspondente à concentração de 0,5% em LsS.

Nos ensaios referentes ao T80 registou-se sempre um aumento da difusão do fentiazac relativamente à formulação base (sem promotor). O valor máximo de cedência (70,3%) foi encontrado com a concentração de 0,05% de T80, verificando-se uma diminuição ligeira, mas gradual, para concentrações mais elevadas.

Os resultados obtidos com estes dois tensioactivos, e sobretudo o seu comportamento relativamente às concentrações em que foram utilizados, poderá ser devido à configuração das micelas que depende, como se sabe, da quantidade de tensioactivo. Assim, e segundo Rehbinder, para pequenas concentrações de agente tensioactivo as micelas adquirem forma esférica, passando à forma de bastonete até formar uma dupla camada, consoante aumenta a quantidade de agente tensioactivo. Por outro lado, a fixação do fármaco na molécula do tensioactivo, que depende também das próprias características de polaridade do princípio activo, poderá influenciar a sua maior ou menor mobilidade micelar. Poderá assim justificar-se a importância que a configuração da micela representa não só na quantidade de fármaco que nela se fixa, como também na facilidade como dela se liberta.

8.1.1.3. Conclusões

A análise dos resultados obtidos permitiu tirar as seguintes conclusões:

1 - Para as condições e sistemas ensaiados, a utilização de DMF como promotor de absorção não é aconselhável, pois o aumento da cedência do fármaco resulta da destruição irreversível das membranas.

2 - O LsS apresentou condições para ser utilizado como promotor, mas para a concentração em que é mais evidente tal propriedade (0,5%) pensamos ser imprescindível um estudo "in vivo" adequado, de forma a testar o seu grau de tolerabilidade cutânea.

3 - O T80 foi de todos o que melhores resultados evidenciou, já que para concentrações mais baixas (0,025-0,05%) proporcionou o maior índice de cedência (70,3%).

8.1.2. Ensaio com pele depilada de cobaio.

8.1.2.1. Material e métodos.

- Pele depilada de cobaio (região dorsal) e lavada com solução de Ringer após remoção do tecido adiposo adjacente.

- À formulação base de Carbopol 940 e fentiazac (F8) foi adicionada, respectivamente, DMF, LsS e T80 nas concentrações de: 0,05%; 0,25% e 0,5%.

8.1.2.1.1. Aparelhagem: Conforme descrito em **3.2.**(Pág. 61).

8.1.2.1.2. Doseamento: Conforme indicado (Pág.116).

Quadro XX - Cedência de fentiazac (%) veiculado em gele através de pele depilada de cobaio, em função da concentração de DMF.

		DMF (%)		
Tempo (horas)	**Sem Promotor**	**0.050**	**0.250**	**0.500**
0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,25	5,8 ± 1,4	5,6 ± 1,5	5,9 ± 1,7	6,3 ± 0,9
0,5	7,3 ± 1,7	7,5 ± 1,4	7,8 ± 2,1	9,8 ± 1,9
0,75	8,9 ± 0,9	9,1 ± 2,3	10,4 ± 3,4	12,5 ± 2,3
1,0	10,8 ± 2,7	11,1 ± 2,5	12,6 ± 2,1	13,7 ± 2,8
2,0	13,3 ± 3,1	14,8 ± 2,1	15,7 ± 2,4	16,8 ± 1,9
3,0	16,4 ± 4,1	17,5 ± 1,9	18,3 ± 0,9	20,5 ± 3,1
4,0	19,2 ± 3,1	21,8 ± 2,4	23,2 ± 2,3	25,3 ± 2,7
5,0	20,1 ± 2,2	25,4 ± 3,7	30,1 ± 3,5	33,4 ± 3,2
6,0	27,3 ± 2,1	29,4 ± 4,1	36,2 ± 4,0	40,7 ± 4,1
8,0	31,6 ± 3,4	35,8 ± 3,9	40,6 ± 3,8	45,4 ± 2,8
10,0	40,5 ± 3,9	43,1 ± 4,3	49,7 ± 5,2	58,9 ± 3,9
12,0	42,3 ± 5,1	45,3 ± 4,8	57,4 ± 5,3	67,3 ± 4,1
AUC (t=12 h)	314,7 ± 38,3	339,2 ± 40,3	393,5 ± 41,5	448,5 ± 37,6

(±) - Intervalo de confiança - 95% t - 0,05 N = 4

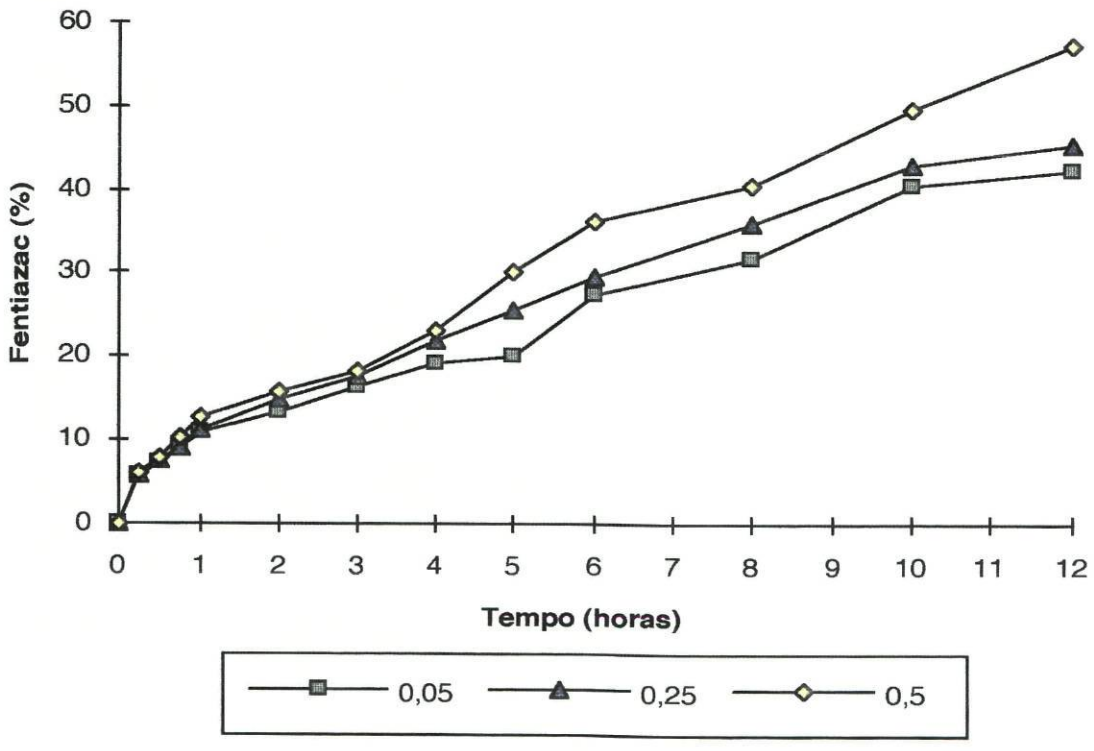


fig. 61. Curvas de cedência de fentiazac (%) veiculado em gele na presença de DMF, através de pele depilada de cobaio.

Quadro XXI - Cedência de fentiazac (%) veiculado em gele através de pele depilada de cobaio, em função da concentração de LsS.

		LsS (%)		
Tempo (horas)	**Sem Promotor**	**0.050**	**0.250**	**0.500**
0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,25	5,8 ± 1,4	5,7 ± 0,7	5,9 ± 1,2	6,3 ± 0,8
0,5	7,3 ± 1,7	7,5 ± 0,5	7,8 ± 1,7	9,1 ± 0,9
0,75	8,9 ± 0,9	8,6 ± 1,3	9,5 ± 1,6	10,3 ± 1,1
1,0	10,8 ± 2,7	11,1 ± 2,7	10,8 ± 2,3	14,1 ± 1,3
2,0	13,3 ± 3,1	12,8 ± 1,9	13,9 ± 2,7	16,8 ± 1,8
3,0	16,4 ± 4,1	15,8 ± 3,3	18,4 ± 1,9	20,7 ± 3,1
4,0	19,2 ± 3,1	19,3 ± 2,4	23,2 ± 3,1	25,3 ± 2,7
5,0	20,1 ± 2,2	22,3 ± 3,5	27,5 ± 2,8	28,2 ± 2,6
6,0	27,3 ± 2,1	29,8 ± 2,7	32,4 ± 3,5	30,6 ± 3,2
8,0	31,6 ± 3,4	35,4 ± 3,1	35,7 ± 3,6	33,8 ± 3,5
10,0	40,5 ± 3,9	40,9 ± 3,4	39,4 ± 4,3	37,8 ± 4,7
12,0	42,3 ± 5,1	42,8 ± 4,9	41,4 ± 4,7	39,3 ± 3,9
AUC (t=12 h)	314,7 ± 38,3	322,7 ± 35,4	345,0 ± 38,8	334,6 ± 36,8

(±) - Intervalo de confiança - 95% t - 0,05 N = 4

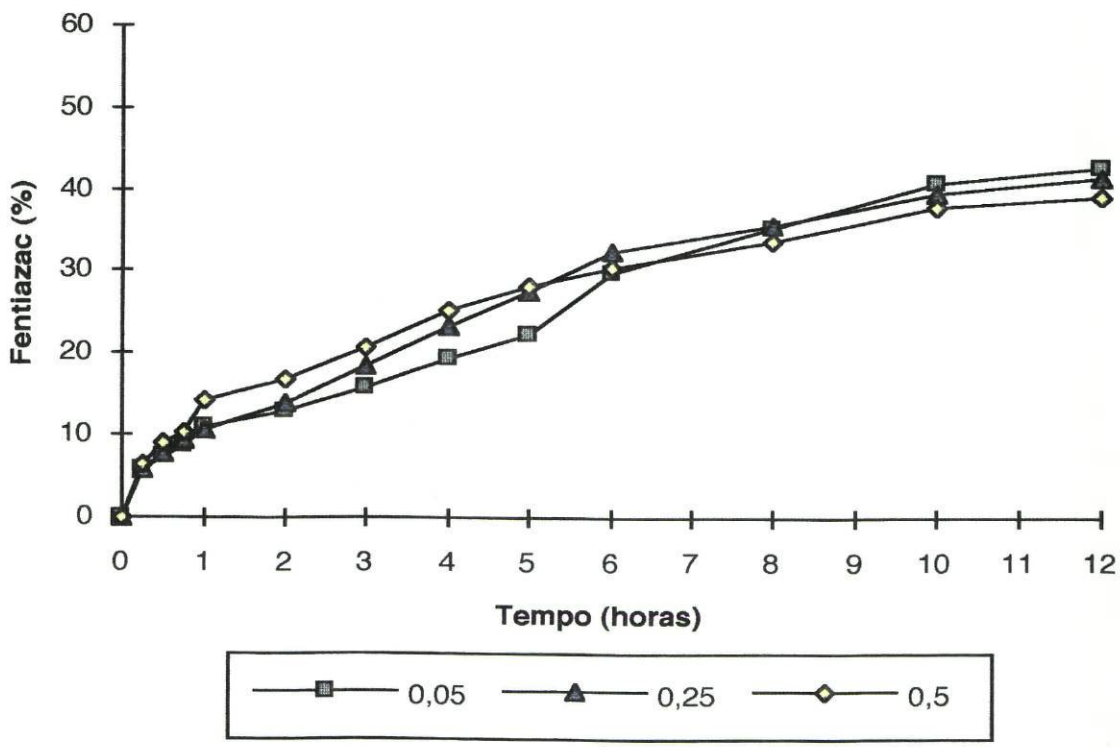


fig. 62. Curvas de cedência de fentiazac (%) veiculado em gele na presença de LsS, através de pele depilada de cobaio.

Quadro XXII - Cedência de fentiazac (%) veiculado em gele através de pele depilada de cobaio, em função da concentração de T80.

		Tween 80 (%)		
Tempo (horas)	Sem Promotor	0.050	0.250	0.500
0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,25	5,8 ± 1,4	5,5 ± 2,0	6,1 ± 1,0	4,1 ± 1,6
0,5	7,3 ± 1,7	7,8 ± 0,8	9,3 ± 0,9	5,2 ± 2,3
0,75	8,9 ± 0,9	8,7 ± 1,1	11,5 ± 1,1	6,4 ± 3,1
1,0	10,8 ± 2,7	11,2 ± 2,3	12,7 ± 2,3	8,9 ± 2,7
2,0	13,3 ± 3,1	12,8 ± 1,9	14,8 ± 3,7	12,3 ± 4,1
3,0	16,4 ± 4,1	16,5 ± 3,1	18,5 ± 2,9	15,4 ± 3,9
4,0	19,2 ± 3,1	18,9 ± 2,7	21,3 ± 4,1	16,8 ± 2,7
5,0	20,1 ± 2,2	20,8 ± 3,5	22,5 ± 4,3	18,7 ± 3,5
6,0	27,3 ± 2,1	27,5 ± 3,6	28,7 ± 3,7	24,6 ± 3,1
8,0	31,6 ± 3,4	30,9 ± 4,1	33,1 ± 5,1	29,3 ± 3,7
10,0	40,5 ± 3,9	41,5 ± 3,8	45,8 ± 4,7	39,3 ± 4,1
12,0	42,3 ± 5,1	42,8 ± 4,7	48,3 ± 3,3	40,7 ± 3,9
AUC (t=12 h)	314,7 ± 38,3	310,2 ± 39,5	340,9 ± 45,6	287,5 ± 41,6

(±) - Intervalo de confiança - 95% t - 0,05 N = 4

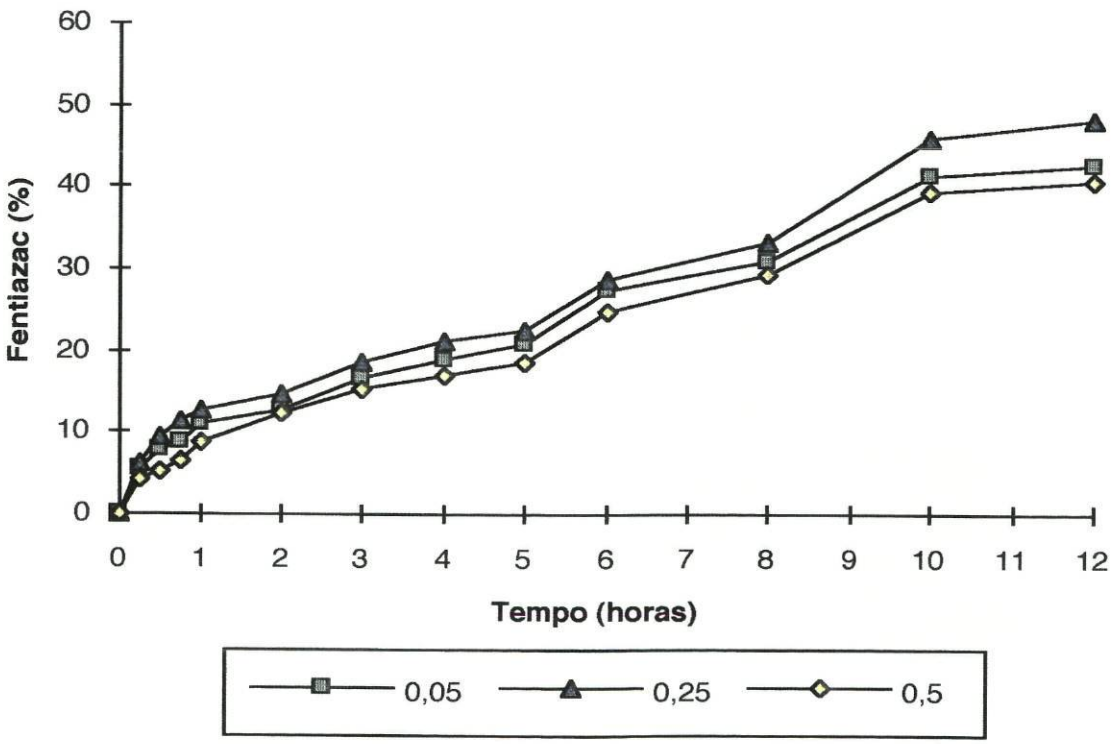


fig. 63. Curvas de cedência de fentiazac (%) veiculado em gele na presença de T80, através de pele depilada de cobaio.

Quadro XXIII - Cedência de fentiazac (%) veiculado em gele através de pele depilada de cobaio, em função dos promotores utilizados, após 6 horas de ensaio.

	Concentração do promotor (%)			
	0	0.05	0.25	0.50
DMF	27,3 ± 2,1	29,4 ± 4,1	36,2 ± 4,0	40,7 ± 4,1
LsS	27,3 ± 2,1	29,8 ± 2,7	32,4 ± 3,5	30,6 ± 3,2
T80	27,3 ± 2,1	27,5 ± 3,6	28,7 ± 3,7	24,6 ± 3,1

DMF - Dimetilformamida
LsS - Laurilsulfato de sódio
T80 - Tween 80

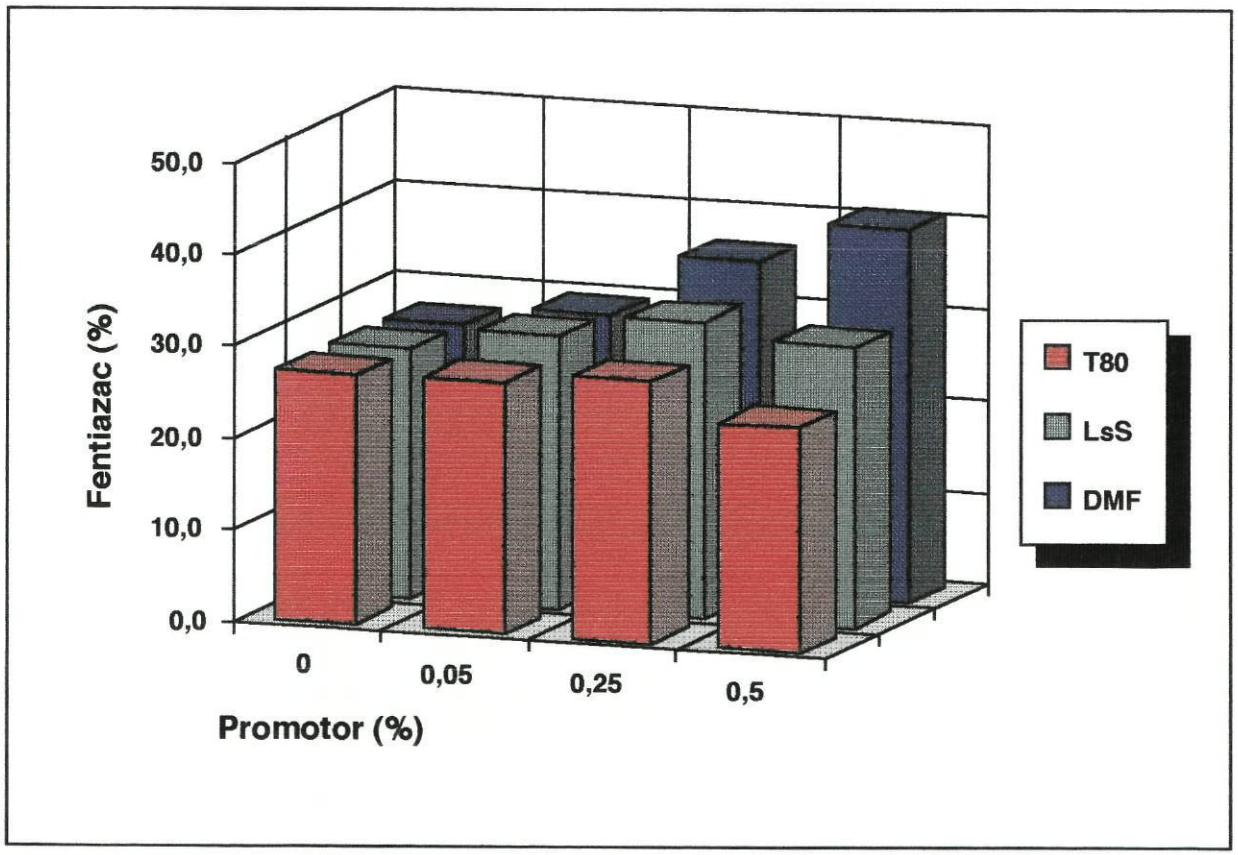


fig. 64. Variação da cedência de fentiazac (%), ao fim de 6 horas, em função da concentração dos promotores.

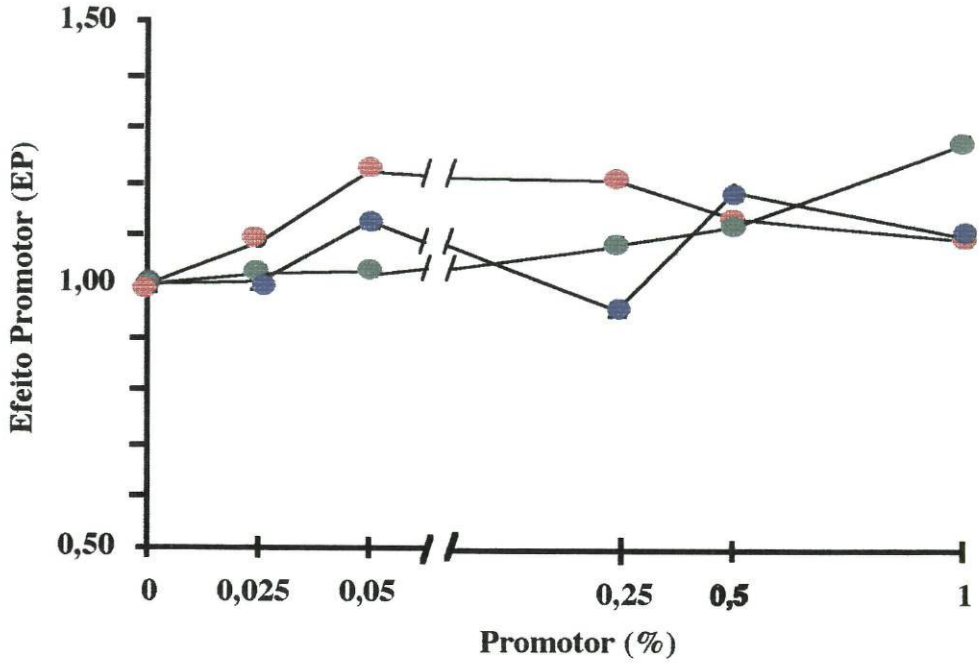


fig. 65. Variação do Efeito Promotor (EP) em função da concentração do agente promotor, utilizando membranas artificiais (SARTORIUS).

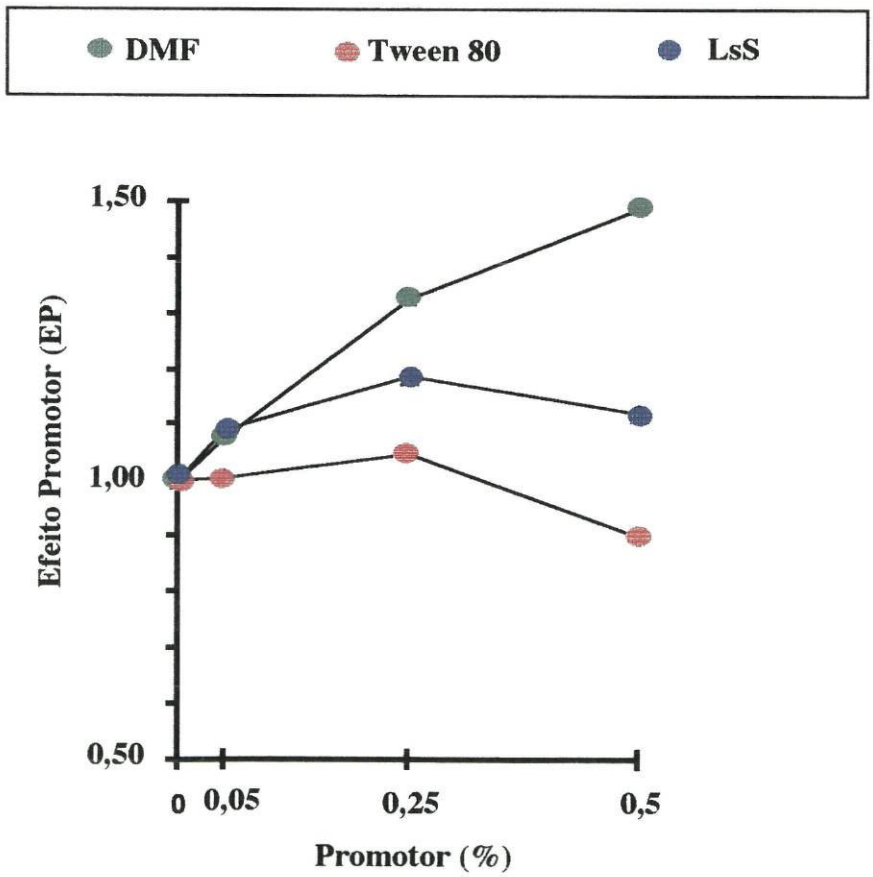


fig. 66. Variação do Efeito Promotor (EP) em função da concentração do agente promotor, utilizando pele depilada de cobaio.

8.1.2.2. Discussão de resultados.

Os resultados dos ensaios realizados estão registados nos Quadros XX, XXI, XXII e XIII e representados graficamente nas figuras. 61, 62, 63, 64, 65 e 66.

Como se pode verificar, a presença de DMF na formulação de Carbopol contendo fentiazac proporciona um aumento de cedência deste anti-inflamatório, confirmando aliás o que se tinha verificado já anteriormente nos ensaios em que foram utilizadas membranas epidérmicas artificiais. O poder dissolvente da DMF foi já demonstrado por alguns investigadores através das alterações irreversíveis que este solvente origina ao nível das membranas facilitando, por isso, a passagem das substâncias activas. Assim sendo, a utilização de solventes com estas propriedades não é a mais indicada, mesmo quando se pretende um efeito promotor da absorção. Esse poder deslipidizante é tanto mais evidente quanto maior é a concentração de DMF, como indica as figuras 61 e 64.

Relativamente aos tensioactivos sabe-se que têm tendência a formar micelas em solução aquosa logo que a sua alteração ultrapassa a concentração micelar crítica. Essas micelas, ao incluirem no seu interior moléculas de princípio activo, permitem a sua solubilização facilitando a passagem das substâncias através das membranas ou dos espaços intercelulares.

Os tensioactivos também fazem baixar as tensões interfasiais gele/membrana, incrementando, assim, a absorção pela via anexial, donde se obtém o efeito somatório.

Como se pode verificar através do Quadro XXI e da fig. 62 correspondente, o LsS proporcionou um aumento da cedência do fentiazac sobretudo na concentração de 0,25%, podendo esse fenómeno ser justificado pelo facto deste tensioactivo aniónico diminuir a resistência da camada córnea mediante alterações nas hélices da ceratina. Aliás, a capacidade aceleradora dos tensioactivos iónicos depende fundamentalmente da destruição que origina nas membranas epidérmicas, pois como têm afinidade para a α–ceratina podem formar complexos com esta provocando parcialmente a sua desnaturação em muitos casos reversível e, consequentemente, a distensão dos filamentos.

Admite-se que a diminuição da cedência de fentiazac para concentrações superiores a 0,25% possa ser atribuída à configuração que as micelas adquirem em função da concentração de LsS, o que vai reflectir-se na capacidade promotora da absorção.

Finalmente, os ensaios referentes ao outro tensioactivo de natureza não iónica permitiram verificar que o T80 numa concentração vizinha de 0,25% promove um ligeiro aumento da cedência do fentiazac, a qual diminui para concentrações superiores deste tensioactivo.

Entretanto, se compararmos com o que se verificou aquando dos ensaios com as membranas artificiais, através das quais se registou sempre um aumento da cedência do anti-inflamatório com as concentrações de polissorbato utilizadas, estes ensaios com pele depilada de cobaio não se apresentam coincidentes. De resto, isto vem confirmar certas divergências em publicações sobre a acção catalisadora dos tensioactivos não iónicos.

Segundo alguns investigadores, os resultados contraditórios obtidos com agentes não iónicos poderão ser justificados pelos tipos diferentes das membranas utilizadas.

A cedência do fentiazac apresentada no histograma da fig. 64 corresponde às 6 horas após o início do ensaio. A escolha deste período é justificada por representar, em média, o período posológico de aplicação para este tipo de agentes terapêuticos veiculados nas formas dérmicas.

Até ao tempo indicado, analisando o comportamento relativo das três variedades ensaiadas, as diferenças de libertação do fármaco não são relevantes. A partir das 6 horas verifica-se uma nítida diferenciação como pode observar-se pelo traçado das curvas.

A avaliação quantitativa do efeito promotor encontra-se representada na fig.66, e para concentrações superiores a 0,25% dos agentes promotores, as formas com LsS e T80 não apresentam grande vantagem pois o efeito acelerador decresce. Embora para a DMF, considerando as mesmas concentrações, esse efeito seja ascendente, já foram referidas anteriormente as causas que produzem tal situação, pelo que a aplicação dessas formulações não se afigura conveniente.

8.1.2.3. Conclusões

Os ensaios com pele depilada de cobaio nas condições em que foram efectuados permitem concluir o seguinte:

1 - É obtido efeito promotor na cedência de fentiazac pela presença de cada um dos agentes utilizados.

2 - A DMF não será de incluir neste tipo de preparações apesar de evidenciar maior influência na libertação do fármaco, pois danifica irreparavelmente as membranas.

3 - Os tensioactivos podem ser constituintes das formas dérmicas, uma vez que para concentrações até 0.25% exercem efeito promotor. O LsS apresenta vantagem sobre o T80.

III- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Rodrigo, F. G. et al. *Ciências Médicas e Humanismo*, Série III, **2** (6): 291 (1982).

2. Carruthers, C. *Biochemistry of Skin in Health and Disease*, Springfield (1962).

3. Lehninger, A., *Biochemistry,* Worth Pub. Inc., New York (1981).

4. L. Nogueira Prista, M. F. Guedes Bahia e Edmundo Vilar, *Dermofarmácia e Cosmética*, Ed. Nacional das Farmácias, I volume, 41 (1992).

5. Blume, U., Ferracin, J., Verschoore, M., Czernielewski, J.M., Schaefer, H., *Br. J. Dermatol.*, **124**, 21-28 (1991).

6. Bentley, J. P., *Advance in Biology of Skin*, Meredith, New York (1970).

7. Rothman, S., *Physiology and biochemistry of the skin,* Univ. Chicago Press, Chicago (1954).

8. L. Nogueira Prista, M. F. Guedes Bahia e Edmundo Vilar, *Dermofarmácia e Cosmética*, Ed. Nacional das Farmácias, I volume, 42 (1992).

9. Marzulli, F. and Maibacg, H., *Dermotoxicology*, Hemisphere Pub. Co, Washington (1987).

10. Nikkari, T., *J. Invest. Dermatol.*, **64**, 257 (1974).

11. L. Nogueira Prista, M. F. Guedes Bahia e Edmundo Vilar, *Dermofarmácia e Cosmética*, Ed. Nacional das Farmácias, I volume, 44 (1992)

12. Takemura, T., Wertz, P. W., Sato, K., *Br. J. Dermatol.*, **120**, 43-47 (1987).

13. A.L. Lehninger, *Bioquímica,* cap. 12, 325-329, Ed. Omega, S.A. Barcelona - - Espanha (1983)

14. A.L. Lehninger, *Bioquímica*, cap. 29, 834, Ed. Omega, S.A. Barcelona - - Espanha (1983)

15. L. Nogueira Prista, M. F. Guedes Bahia e Edmundo Vilar, *Dermofarmácia e Cosmética*, Ed. Nacional das Farmácias, I volume, 51 (1992).

16. L. Nogueira Prista, M. F. Guedes Bahia e Edmundo Vilar, *Dermofarmácia e Cosmética*, Ed. Nacional das Farmácias, I volume, 52-53 (1992).

17. Montagna, W., *The Structure and Function of Skin,* Academic Press, New York (1962).

18. Ronald, C., Wester, PhD., *Cosmetics & Toiletries*, Ed. Portuguesa, 7 (2): 22-24 (1995).

19. Barry, W. B., *Dermatological Formulations,* vol. 18, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 17 (1983).

20. Noble, W.C., and Somerville, D.A., *Microbiology of Human Skin*, Saunders, Philadelphia (1974)

21. Prista, L.N., Alves, A.C.A., Morgado, R.R., *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica* , vol. I, 3ª Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 578-579 (1992).

22.Eduardo A.F. Barata, *A Cosmetologia*, Ed. Escher, cap.II, 20-21 (1991).

23. Garret, E. R., Chemburkar, P. B. *J. Pharm. Sci.*, **57**: 944-948 (1968).

24. Durrheim, H., Flyinn, G. L., Higuchi, W. L. and Behl, C. R., *J. Pharm. Sci.*, **69**: 781-785 (1990).

25. Barry, W. B., *Dermatological Formulations*, vol. 18, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 234-295 (1983).

26. Tojo, K., *Transdermal Controlled Systemic Medications*, vol. 31, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 127-158 (1987).

27. Chien, Y. W., *Novel Drug Delivery Systems*, vol. 14, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 149-218 (1982).

28. Poulsen, B. J. and Flynn G. L., *Percutaneous Absorption - Dermatology*, vol. 6, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 431-459 (1983).

29. Hanson, W. A., *Hansen Research*, rev. 5/91.

30. Cleary, G. W., *Skin Permeation- Fundamentals and Application* - Joel L. Zatzz, Allured Publishing Corp. Wheaton, IL, 207-237 (1993)-

31. Chien, Y. W., *Transdermal Controlled Systemic Medications*, vol. 31, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 25-81 (1987).

32. Cesare Bruno e Gianni Proserpio, *Interfarma*, nº 78: (1990).

33. Barry, W. B., *Dermatological Formulations*, vol. 18, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 112-115 (1983).

34. Cesare Bruno e Gianni Proserpio, *Interfarma*, **78**: 11(1990).

35.Joel Zatz, P, *Skin Permeation - Fundamentals and Application*, Ed. Joel L. Zatz., Allured Publiching Corporation - Wheaton, IL 60189, 15-17 (1993).

36. Munro, D.D., and Stoughton, R.B., *Arch. Dermatol.*, **92**: 585 (1965).

37. Vickers, C.F.H., *Br. J. Dermatol.*, **81**: 902 (1969).

38. Vickers, C.F.H., *Adv. Biol. Skin*, **12**: 177 (1972).

39. Stoughton, R.B., *Arch. Dermatol.*, **94**: 646 (1966).

40.A.D.Pozzo, G. Donzelli, E. Liggeri and L. Rodriguez, *J. Pharm. Sci.*,**80**: 54 (1991).

41. B.D.Anderson and P.V. Raykar, *J. Invest. Dermatol.*, **93**: 280 (1989).

42. R.H. Guy and J. Hadgraft, *Pharm. Res.* , **5**: 753 (1988).

43. G.P. Kushla and J.L. Zatz, *Int. J. Pharm.* , **71**: 167 (1991).

44. J.L. Zatz, *J. Soc. Cosm. Chem.* , **43**: 37 (1992).

45. G.L. Flynn, S.H. Yalkowsky and T.J. Roseman, *J. Pharm. Sci.*, **63**: 479-510 (1974).

46. P.H. Dugard, *Dermatoxicology and percutaneous absorption,* Ch 22, F.N. Marzulli and H.I. Maibach, eds, New York; John Wiley & Sons (1977).

47. R.J. Feldman and H.I. Maibach, *Arch. Dermatol.* , **91**: 661 (1965).

48. K.C. Moon, R.C. Wester and H.I. Maibach, *Dermatologica,* **180**: 8 (1990).

49. P. Brisson, Percutaneous Absorption, *CMA Journal,* **110**: 1182 (1974).

50. P. Klemp. and J. Bojsen, *J. Invest. Dermatol.* **86**: 109 (1986).

51. G. Stuttgen, *Dermal and Transdermal Absorption,* R. Brandau and H. Lippold, esd, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellsschaft , 27 (1982).

52. T.J. Ryan, *Boichemistry and Physiology of Skin,* vol.2, L.A. Goldsmith, Ed. New York: Oxford University Press , 87 (1983).

53. I.M. Braverman and A Keh-Yen, *J. Invest. Dermatol.*, **82**: 1 (1984).

54. A. Bollinger, J. Frey, K. Jager, J. Furrer, J. Seglias and W. Siegenthaler, *New Engl. J . Med.* , **307**: 1305 (1982).

55. R.J. Scheuplein, *J. Invest. Dermatol.* , **45**: 334 (1965).

56. R.J. Scheuplein, *J. Invest. Dermatol.* **48**: 79 (1967).

57. G.L.Flynn, Percutaneous Absorption, R.L. Bronaugh and H.I. Maibach, eds, New York: Marcel Dekker, Inc., 17 (1985).

58. D.E. Wurtser and S.F. Kramer, *J. Pharm Sci.* , **50**: 288 (1961).

59. R.J. Feldman and H.I. Maibach, Arch. Dermatol., **91**: 661 (1965).

60. G.R. Behl, G.L. Flynn, T. Kurihara, N. Harper, H. Smith, W.I. Higuchi, N.F.H. Ho and C. Pierson, J. *Invest. Dermatol.* , **75**: 346 (1980).

61. I.H. Blank, *Percutaneous Absorption* , R.L. Bronaugh and H.I. Maibach, eds, New York: Marcel Dekker , 97 (1985).

62. S.K. Chang and J.E. Riviere, *Fund. Apll. Toxicol.* , **17**: 494 (1991).

63. A. Danon, S. Ben-Shimon and Z.Ben-Zvi, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* , **31**: 49 (1986).

64. J.E. Riviere, B. Sage and N.A. Monteiro-Riviere, *Cutan. Ocular Toxicol.* ,**8:** 493 (1989-90).

65. J.E. Riviere, B. Sage and P.L. Williams, *J. Pharm. Sci.* , **80**: 615 (1991).

66. P.M. Elias, *J. Invest. Dermatol.* , **80**: 44 (1983).

67. D.R. Bickers, H. Mukhtar and S.K. Yang, *Chem. Biol. Interact.* **43**: 263 (1983).

68. J. Kao, J. Hall, L.R. Shugart and J.M. Holland, *Toxicol. Apll. Pharmacol.* ,**75**: 289 (1984).

69. J. Kao, J. Hall, 2*J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **241**: 482 (1987).

70. R.L. Bronaugh, R.F. Stewart and J.E. Storm, *Toxicol. Apll. Pharmacol.*, **99:** 534 (1989).

71. R.O. Potts, S.C. McNeill, C.R. Desbonnet and E. Wakskull, *Pharm. Res.* , **6**: 119 (1989).

72. M.P. Carver, P. Levi and J.E. Riviere, *Pesticide Biochem. Physiol.*, **38**: 245 (1990).

73. Benson, P.F., Pharoah, P.O.D., *Guy Hosp. Rep.*, **109**: 212 (1960).

74. Fanconi, V.G., *Helv. Paediatr. Acta.*, **17**: 267 (1962).

75. Feiwel, M., James, V.H.T., Barnet, E.S., *Lancet*, **1**: 485 (1969).

76. Harpin, V., Ratter, N. *Arch. Dis. Child.*, **57**: 477 (1982).

77. Schuman, R.M., Leech, R.W., Alvord, E.C., *Arch. Neurol.*, **32**: 320 (1975).

78. Wedig, J.H., Feldmann, R.J., Maibach, H.I., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **41**: 1-6 (1977).

79. Pershing, L.K., Lambert, L.D., Knutson, K., *Pharm. Res.*, **7** : 170 (1990).

80. Kurihara-Bergstrom, T., Knutson, K., De Noble, L.J., Goates, C.Y., *Pharm. Res.*, **7**: 762 (1990).

81. Berner, B., Mazzenga, G.C., Otte, J.H., Steffens, R.J., Juang, R.H., Ebert, C.D., *J. Pharm. Sci.*, **78** : 402 (1989)

82. Bodde, H.E., Verhoeven, J., van Driel, L.M.J., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **6:** 87 (1989).

83. Walters, K.A., Walker, M., Olejnik, O., *J. Pham. Pharmacol.*, **37:** 81P (1985).

84. Bond, J. R., Barry, B,W., *J. Invest. Dermatol.*, **90:** 810 (1988).

85. Behl, C.R., Flynn, G.L., Kurihara, T., Harper, N., Smith, W., Higuchi, W.I., Ho, N.F.H., Pearson, C.L., *J. Invest. Dermatol.*, **75** : 346 (1980).

86. Kai, T., Mak, V.H.W., Potts, R.O. Guy, R.H., *Mechanism of skin penetration enhancement, effect of n-alkanols on the permeability barrier*, Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioactive Mater., **15:** 211 (1988).

87. Hadgraft, J., Walters, K.A., Wotton, P.K., *Int. J. Pharm.*, **32:** 257 (1986).

88. BArry, B.W., The LPP theory of skin penetration, in In Vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications Bronaugh, R.L. and Maibach, H.I., Eds., CRC Press, Boca Raton , 165 (1991).

89. Barry, B.W., *J. Controlled Release, in press.*

90. Goodman, M., Barry, B.W., *Int. J. Pharm.*, **57:** 29 (1989).

91. Barry, B.W., *Int. J. Cosmet. Sci.*, **10:** 281 (1988).

92. A.C. Williams, Ph. D. and B.W. Barry, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **9** (3,4) : 305-353 (1992).

93. Kurihara -Bergstrom,T., Flynn, G.L., Higuchi, W.I.,*J. Invest. Dermatol.*, **89** : 274 (1987).

94. Al-Saidan, S. M. H., Selkirk, A.B., Winfield, A.J., Selkirk, A.B., *J . nvest. Dermatol.*, **89** : 430 (1987).

95. Kligman, A.M., *JAMA*, **193** : 796 (1965).

96. Kurihara - Bergstrom, T., Flynn, G.L., Higuchi, W.I., *J. Pharm. Sci.*, **75** : 479 (1986).

97. Sekura, D.L., Scala, J., *Adv. Biol. Skin*, **12 :** 257 (1972).

98. Cooper, E.R., *Effect of decylmethylsulfoxide on skin penetration, in Solution Behaviour of Surfactants: Theoretical and Applied Aspects*, Wittal, K.L. and Fendler, E.J., Eds., Plenum Press, New York. 1505 (1982).

99. Muset, P., Esteve, M.R.. *Experiencia*, **21**: 649-651 (1965).

100. Southwell, D., Barry, B.W., *J. Invest. Dermatol.*, **80** : 507 (1983).

101. Bemrett, S.L., Barry, B.W., Woodford, R.,*J. Pharm. Pharmacol.*, **37:** 298 ((1984).

102. Santos, D., Bahia, M.F.G., *Rev. Port. Farm.*, **43** (1) : (1993)

103. Munro, D.D., Stoughton, R.B., *Arch. Dermatol.*, **92** : 585 (1965)

104. Munro, D.D., *Br. J. Dermatol., 81 (Suppl.)* : **92** (1969)

105. Aungst, B.J., Rogers, N.J., Shefter, E., *Int. J. Pharm.*, **33** : 225 (1986)

106. Sasaki, H., Kojima, M., Mori, Y., Nakamura, J., Shibasaki, J., *Int. J. Pharm.*, **44** : 15 (1988)

107. Sasaki, H., Kojima, M., Mori,Y., Nakamura, J., Shibasaki, J., *Int. J. Pharm.*, **60** : 177 (1990)

108. Sasaki, H., Kojima, M., Nakamura, J. , Shibasaki, J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**: 196 (1990).

109. E.R. Cooper, *J. Pharm. Sci.*, **73**: 1153 (1984)

110. Yu, D., Sanders, L.M., Davidson, G.W., Marvin, M.J., Ling, T., *Pharm. Res.*, **5**: 457 (1988)

111. Saki, T., Kawaguchi, T., Sugibayashi, K., Juni, K., Morimoto, Y., *Int. J. Pharm.*, **57**: 73 (1989)

112. B. Ongpipattanakul, R.R., Burnette, R.O. , R.O. Potts, M.L. Francoeur, *Pharm. Res.*, **8**: 350 (1991)

113. Aungst, B.J., Blake, J.A., Hussain, M.A., *Pharm. Res.*, **7**: 712 (1990)

114. Kadir, R., Stempler, D., Liron, Z., Cohen, S., *J. Pharm. Sci.*, **76** : 774 (1987)

115. Kadir, R., Stempler, D., Liron, Z., Cohen, S., *J. Pharm. Sci.*, **77** : 409 (1988).

116. Wotton, P.K., Mollgaard, B., Hadgraft, J., Hoelgaard, A., *Int. J. Pharm.*, **24** : 19 (1985)

117. H.E. Boddé, H.L.G.M. Tienessen, H. Mollee, F.H.N. de Haan, H.E. Junginger. *Modeling percutaneous drug transport in vitro: The interplay between water, flux enhancers and skin lipids, Prediction of percutaneous Penetration,* R. C. Scott, R.H. Guy, J. Hadgraft, Eds. London, IBC Techical Services, 93 (1990).

118. Wiechers, J.W., Zeeuw, R.A., *Drug Design Delivery,* **6** : 87 (1990)

119. Lambert, W.J., Higuchi, W.I., Knutson, K., Krill, S.L., *Pharm. Res.*, **6** : 798 (1989).

120. Hou, S.Y., Flynn, G.L., *J. Invest. Dermatol.*, **93** : 774 (1989).

121. Chow, D.S.L., Kaka, I., Wang, T.I., *J. Pharm. Sci.*, **73** : 1794-1799 (1984)

122. Okamoto, H., Hashida, M., Sezaki, H., *J. Pharm. Sci.*, **77** : 418 (1988)

123. Okamoto, H., Tsukahara, H., Hashida, M., Sezaki, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **35** : 4605 (1987)

124. Okamoto, H., Muta, K., Hashida, M., Sezaki, M., *Pharm. Res.*, 7 : 64 (1990)

125. Ogiso, T., Ito, Y., Iwaki, M., Atago, H., *J. Pharm. Sci.*, **78** : 319 (1989)

126. Hadgraft, J., *Pharm. Intl.*, **5** : 252-254 (1984)

127. Woodford, R., Barry, B.W., *Curr. Ther. Res..*, **35** : 759 (1984)

128. Beastall, J., Guy, R.H., Hadgraft, J., Wilding, I.,.*Pharm. Res.*, **3** : 294 (1986)

129. Naito, S., Tsai, Y.H.. *Int. J. Pharm.*, **8** : 263 (1981)

130. Lippold, B.C., Hackemuller, D.. *Int. J. Pharm.*, **61** : 205 (1990)

131. Wong, O., Huntington, J., Konishi, R., Rytting, J.H., Higuchi, T. *J. Pharm. Sci.*, **77** : 967 (1988)

132. Wong, O., Tsuzuki, N., Ngheim, B., Kuehnhoff, J., Itoh, T., Masaki, K., Huntingdon, J., Konishi, R., Rytting, J.H., Higuchi, T., *Int. J. Pharm.*, **52** : 191 (1989)

133. Williams, A.C., Barry, B.W.. *Int. J. Pharm.*, **56** : 43 (1989).

134. Liao, W., Zatz, J.L.. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **31** : 107-121 (1990)

135. Sarpotdar, P.P., Zatz, J.L.. *J. Pharm. Sci.*, **75** : 176-181 (1986)

136. Eagle, S.C., Barry, B.W., Scott, R.C.., *Prediction of Percutaneous Penetration:Methods, Measurements, Moddeling.*, Scott, R.C., Guy, R,H., Hadgraft, J.. Eds., IBC Technical Services Ltd., London, 417 (1990).

137. Sarpotdar, P.P., Zatz, J.L., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **12** : 1625 (1986)

138. Sarpotdar, P.P., Zatz, J.L., *J. Pharm. Sci.*, **75** : 176 (1986)

139. Rigg, P.C., Barry, B.W., *J. Invest. Dermatol.*, **94** : 235 (1990).

140. Michniak, B.B., Chapman, J.M., *Int. J. Cosm. Sci.*, **14** : 153-161 (1992)

141. McElnay, J.C., Mathews, M.P., Harland, R., McCafferty, D.F., *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, **20** ; 421-424 (1985).

142. Hwang, C.C., Danti,A.G., *J. Pharm. Sci.*, **72** : 857 (1983).

143. Spruance, S.L., McKeough, M.B., Cardinal, J.R., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **411** : 28 (1983).

144. Spruance, S.L., McKeough, M.B., Cardinal, J.R., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **25** : 10 (1984).

145. Spruance, S.C., Freeman, D.J., Sheth, N.V., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **28** : 203 (1985).

146. Aungst, B.J., Rogers, N.J., Shefter, E., *Int. J. Pharm.*, **33** : 225 (1986).

147. Kurihara-Bergstrom, T., Flynn, G.L., Higchi, W.I., *J. Pharm. Sci.*, **75** : 479 (1986).

148. Kurihara-Bergstrom, T., Flynn, G.L., Higchi,W.I., *J.Invest. Dermatol.* **89** : 274 (1987).

149. Scott, R,C., Guy, R.H., Hadgraft, J., *Prediction of Percutaneous Penetration: Methods, Measurements, Modeling*, Eds., IBC Techical Services Ltd., London, 412 (1990).

150. Clancy, M. J., Corish, J., Corrigan, I. O., *Intern. J. of Pharmaceutics*, **105**:47-56 (1994).

151. Brown, K., Patente nº 51823/66, Londres, 18 / Novembro (1966).

152. Brown, K., Cater, P.D., Cavalla, J.F., Green, D., Newberry, R,A., Wilson, A.B., *J. Med. Chem.*, **17**: 1177-1181 (1974).

153. Wyeth, J., Cavalla, J.F., Green, D., Wilson, A.B., *Nature*, **219:** 164 (1968).

154. Fumero, S., Mondino, A., Silvestri, S., Zanolo, G., Marchi, G., Pedrazzini, S., Arzneim - Forsch/*Drug Res.*, **30**: 1253 -1256 (1980).

155. Zanolo, G., Giacchetti, C., Mondino, A., Silvestri, S., Marchi, G., Gomarasca, P., *Boll. Chim. Farm.*, **119**: 209-220 (1980).

156. "*Drugs of Today*", **15**: 7 (1979).

157. Índice Nacional Terapêutico, Ed. Tupam (1995).

158. The Pharmaceutical Society of Great Britain, *Handbook of Pharmaceutical Excipients, The Parmaceutical* Press, London, 41-42 (1986).

159. Ruiz, M.A., Contreras, M.D., Parera, A., *Farm. Clin.*, **3**: 76:81 (1986).

160. Fischer, M., *Les Méthodes Statistiques Appliées à La Recherche Scientific,* Presses Universitaires de France, Paris , 57 (1947).

161. Prista, L.N., Alves, A.C.A., Morgado, R.R., *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica* , vol. 2, 3ª Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 420 (1990).

162. Barry, W. B., *Dermatological Formulations,* vol. 18, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 351-352 (1983).

163. Prista, L.N., Alves, A.C.A., Morgado, R.R., *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica* , vol. 1, 4ª Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 420 (1992).

164. Morton Pader, *Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries*, Vol. 13 (7), Marcel Dekker, Inc, New York and Basel, 256-258 (1993).

165. Green, H., Weltmann, R.N., *Thixotropy, In Colloid Chemistry*, vol. 6, Ed. J. Alexander Reinhold, New York, 328 (1946).

166. Hemi N. Nae, , *Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries*, Vol. 13 (2), Marcel Dekker, Inc, New York and Basel, 12-13 (1993).

167. L. Nogueira Prista, M. F. Guedes Bahia e Edmundo Vilar, *Dermofarmácia e Cosmética*, Ed. Nacional das Farmácias, I volume, 208 - 210 (1992).

168. Prista, L.N., Alves, A.C.A., Morgado, R.R., *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica* , vol.II, 3ª Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 420 - 422 (1990).

169. Barry, W. B., *Dermatological Formulations*, vol. 18, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 357 (1983).

170. Barry, W. B., *Dermatological Formulations*, vol. 18 (1), Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 367 376(1983).

171. M.A.Rao, and J.R. Stefer, *Viscoelastic Properties of Foods*, 217 (1991).

172. Ferry, J.D., *Viscoelastic Properties of Polymers,* John Wiley, New York, USA (1970).

173. Barry, W. B., *Dermatological Formulations*, vol. 18, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 373-384 (1983).

174.G. Gouarraze et J.L. Grossiord, I*nitiation a la Rhéologie,* Téch. et Documentation (Lavoisier) Paris, 91-92 (1983).