



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Ellison Neves de Lima

**Estudo de liberação e permeação cutânea *in vitro* de preparações
emulsionadas e microemulsionadas do cidofovir**

Recife - PE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ELLISON NEVES DE LIMA

**Estudo de liberação e permeação cutânea in vitro de preparações
emulsionadas e microemulsionadas do cidofovir**

Dissertação de Mestrado

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Leila Bastos Leal

Recife - PE

2013

Catálogo na Publicação
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

L732e

Lima, Ellison Neves de.

Estudo de liberação e permeação cutânea *in vitro* de preparações emulsionadas e microemulsionadas do cidofovir / Ellison Neves de Lima. – Recife: O autor, 2013.

97 f: il.: tab.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Davi Pereira de Santana.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

Inclui bibliografia e apêndice.

1. HPV. 2. Nucleosídeo-Difosfato Quinase. 3. Permeação. 4. Emulsões. 5. Condiloma acuminado. I. Santana, Davi Pereira de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2013-105)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Recife, 28 de fevereiro de 2013.

Dissertação de Mestrado de **Ellison Neves de Lima** defendido e **APROVADO**, por decisão unânime, em 28 de fevereiro de 2013 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana
(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

Assinatura: _____

PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Prof.^a Dr.^a Ana Amélia Moreira Lira
(Depto. De Farmácia da Universidade Federal de Sergipe – UFS).

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor
(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice – Reitor

Silvio Romero de Barros Marques

Diretor de Ciências da Saúde – CCS

José Thadeu Pinheiro

Vice – Diretor do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antonio Rodolfo de Faria

Vice – Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalci José Brondanni

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Nereide Stela Santos Magalhães

Vice - Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Ana Cristina Lima Leite

Aos meus pais, Adisio e Fátima, à minha
esposa Eliane e toda minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela proteção, força e paz interior.

Aos professores Davi e Leila pela orientação e confiança e aprendizado.

Aos meus pais, pelos esforços e incentivos para realização dos meus estudos.

À Eliane Vasconcelos, por estar comigo na caminhada da vida, sempre com amor e compreensão e por carregar nosso filho, trazendo uma nova conexão entre nós.

À minha amiga Cristiane Cunha pela paciência e empenho durante minha ausência na Farmácia Escola.

À Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade e todos os seus colaboradores pela amizade.

Às amigas do CP&D, Karine, Alice, Noely e Giovana pela ajuda e compartilhamento de conhecimento. Aos amigos estagiários Isabelle, Karol e principalmente Gustavo pelo enorme auxílio.

À todos que foram e são do NUDFAC, Carlos Eduardo, Danilo Bedor, Homero Sousa, Januária, Thayse, André Luís.

À BS Inovação Farmacêutica, por meio de Zênia e Marília pelas dicas auxílio e fornecimento de água.

Aos professores e funcionários da Pós-graduação.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa.

“Se o conhecimento pode criar problemas,
não é através da ignorância que podemos solucioná-los.”
(Isaac Asimov)

RESUMO

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus causador de verrugas genitais. Estima-se que até 80% das mulheres adquiram uma infecção pelo HPV durante sua vida, sendo os vírus tipo 6 e 11 responsáveis por 70% dos casos. A infecção persistente pelo HPV é considerada com a mais importante causa do câncer do colo de útero. O cidofovir é um análogo de nucleosídeo, ativo contra DNA vírus, que inibem a polimerase do DNA viral por seu difosfato metabólito. Estudos *“off-label”* demonstraram que a aplicação tópica do cidofovir inibiu ou preveniu o desenvolvimento de papilomas. Sabendo que não há padronização da concentração do cidofovir ou forma farmacêutica para aplicação tópica, este trabalho objetiva estudar o desenvolvimento de formas farmacêuticas emulsionadas e microemulsionadas contendo ou não promotores de permeação, realizar a caracterização físico-química destas formulações e realizar estudos de liberação utilizando membrana sintética e permeação cutânea através da pele de orelha de porco. Nas preparações desenvolvidas avaliou-se o pH, viscosidade, aspecto organoléptico, tamanho de gotículas e exclusivamente para as microemulsões: condutividade, índice de refração, potencial zeta e microscopia de luz polarizada. Para a quantificação das amostras nos estudos de liberação e permeação utilizou-se as técnicas de espectrofotometria por ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta, respectivamente. Nos estudos de liberação e permeação observou perfis semelhantes entre as formulações, porém notou-se que as formulações microemulsionadas tiveram melhor retenção tanto no estrato córneo quanto na derme e epiderme. Constatou-se que a utilização dos promotores de permeação não incrementaram as quantidades permeadas e retidas do fármaco na pele.

Palavras chaves : HPV, análogo de nucleosídeo, permeação, emulsões, condiloma acuminado.

ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) is a virus that causes genital warts. It is estimated that up to 80% of women acquire an HPV infection during their lifetime, virus type 6 and 11 are responsible for 70% of cases. Persistent infection with HPV is considered the most important cause of cancer of the cervix. Cidofovir is a nucleoside analogue, active against DNA viruses, which inhibit viral DNA polymerase by its diphosphate metabolite. Studies "off-label" demonstrated that topical application of cidofovir inhibited or prevented the development of papillomas. Knowing that there is no standardization of the concentration of cidofovir or pharmaceutical form for topical application, this paper aims to study the development of dosage forms and emulsified microemulsion with or without permeation enhancers, perform physical-chemical characterization of these formulations and release studies using membrane synthetic skin permeation through pig ear skin. In preparations developed evaluated the pH, viscosity, sensory aspect, droplet size and solely for microemulsions: conductivity, refractive index, zeta potential and polarized light microscopy. To quantify the samples studied release and permeation techniques was used for ultraviolet spectrophotometric and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, respectively. In studies of release and permeation observed similar profiles among formulations, however noted that microemulsion formulations were much better retention in the stratum corneum and in the epidermis and dermis. It was found that the use of permeation enhancers did not increase the amount of drug permeated and retained on the skin.

Keywords: HPV, nucleoside analogue, permeation, emulsions, condyloma acuminata.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – representação das lesões provocadas pelo HPV.	18
Figura 2 – Representação da estrutura da pele (adaptado de Tassopoulos, 2006).	21
Figura 3 – Representação esquemática das rotas de penetração de drogas através da pele (SEZER, 2012).	25
Figura 4 - Estrutura química do cidofovir.	26
Figura 5 – Representação esquemática de um diagrama de fases (DAMASCENO, 2011).	31
Figura 6 – Representação esquemática de uma célula de Franz.	35
Figura 7 – Área posterior da orelha suína: A e B. São recomendadas para utilização experimental.	36
Figura 8 – Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo (Labrasol®) / poligliceril 6-dioleato (Plurol Oleique®), miristato de isopropila e tampão fosfato para proporções T:CO 3:1. As áreas delimitadas representam: SF – separação de fases; DT – dispersão turva; ME – microemulsão.	40
Figura 9 – Fotografia do método de preparação da pele de orelha de porco para estudo de permeação.	49
Figura10 – Fotografia do método de remoção do estrato córneo. A) fixação da pele; B e C) remoção do estrato córneo por fitas adesivas; transferência das fitas para tubo Falcon.	51
Figura 11 – Fotografia do método de extração do fármaco da Derme+Epiderme.	52
Figura 12 – Visualização do aspecto homogêneo do sistema microemulsionado.	55
Figura 13 – Fotomicrografia obtida utilizando microscopia de luz polarizada, objetiva de 20, da ME F4 sem o CDV.	59
Figura 14 – Fotomicrografia obtida utilizando microscopia de luz polarizada, objetiva de 20, da ME F5 com o CDV.	60
Figura 15 – Fotomicrografia obtida utilizando microscopia de luz polarizada, objetiva de 20, A) ME F4 com 2,5% de cineol, B) ME F4 com 2,5% de	60

mentol, C) ME F5 com 2,5% de cineol e D) ME F5 com 2,5% de mentol.

Figura 16 – gráfico da Tensão de cisalhamento x Taxa de cisalhamento das microemulsões. 62

Figura 17 – gráfico da Viscosidade x Taxa de cisalhamento das microemulsões. 63

Figura 18 – gráfico da Tensão de cisalhamento x Taxa de cisalhamento das emulsões. 64

Figura 19 – gráfico da Viscosidade x Taxa de cisalhamento das emulsões. 64

Figura 20 – curva de calibração do cidofovir em solução tampão pH 7,4. 66

Figura 21 – perfil de liberação *in vitro* das formulações estudadas. 69

Figura 22 – perfil de permeação cutânea *in vitro* das formulações estudadas. 74

Figura 23 – Distribuição do CDV no estrato córneo da pele de orelha de porco. 75

Figura 24 – Distribuição do CDV na epiderme e derme da pele de orelha de porco. 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – composição qualitativa e quantitativa das formas farmacêuticas obtidas.	42
Tabela 2 – condutividade e índice de refração das formulações e dos excipientes.	56
Tabela 3 – valores de pH encontrados.	57
Tabela 4 – tamanho de gotículas, PDI e potencial zeta das formulações microemulsionadas.	58
Tabela 5 – tamanho de gotículas das emulsões.	58
Tabela 6 – valores de viscosidade das preparações.	65
Tabela 7 – Recuperação do Cidofovir no estrato córneo e na Derme e epiderme.	67
Tabela 8 – valores de quantidade liberada, fluxo e coeficiente de determinação.	68
Tabela 9 – valores de quantidade liberada e fluxo.	71
Tabela 10 – Tratamento estatístico (one-way ANOVA) dos resultados da permeação <i>in vitro</i> das formulações.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O – água em óleo

ANOVA – análise de variância

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária

BHT – butilhidroxitolueno

CDV – Cidofovir

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DP – desvio padrão

E – emulsão

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

F.Bras. – Farmacopeia Brasileira

HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida

HPMC – ((S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina)

HPV – Papiloma vírus humano

IFA – Insumo farmacêutico ativo

ME – Microemulsão

O/A – óleo em água

PDI – índice de polidispersidade

q.s.p. – quantidade suficiente para

RPM – rotações por minuto

UV – ultravioleta

Vis – visível

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem
 μg – micrograma
 μL – microlitro
 μm – micrômetro
 μS – microSiemens
G – força G
g – grama
h – hora
J – fluxo
k – constante de Boltzmann
L – litro
mg – miligrama
min – minuto
mL – mililitro
mm – milímetro
mM – milimolar
mV – miliVolt
 η – viscosidade
 N/m^2 - Newton por metro quadrado
nm – nanômetro
 $^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius
Pa.s – Pascal segundo
pH – potencial hidrogeniônico
s – segundo
T – temperatura
v – volume

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1 HPV	17
1.2 Pele	20
1.3 Via cutânea	24
1.4 Cidofovir	25
1.5 Formas Farmacêuticas Tópicas	28
1.5.1 Emulsões	28
1.5.2 Microemulsões	29
1.6. Promotores de Permeação	31
1.7 Estudos de Liberação Cutânea <i>in vitro</i>	33
2. Objetivos	37
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3. Materiais e Métodos	39
3.1 Seleção e preparo das formulações	30
3.2 Caracterização das Formulações	43
3.2.1 Condutividade elétrica	43
3.2.2. Determinação do pH	43
3.2.3. Índice de refração	43
3.2.4 Reologia e viscosidade	44
3.2.5 Tamanho de gotícula	44
3.2.6 Potencial zeta	45
3.2.7 Microscopia de luz polarizada	46
3.3. Quantificação do cidofovir	46
3.3.1 Espectrofotometria por ultravioleta	46
3.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	46
3.4 Seleção do meio receptor	47
3.5 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	47
3.5.1 Preparo da membrana sintética	47
3.5.2 Montagem das células de Franz	47
3.5.3 Coleta e quantificação das amostras	48
3.5.4 Análise de cinética e análise de liberação <i>in vitro</i>	48
3.6 Estudo <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutânea	49
3.6.1 Obtenção e preparo da pele suína	49
3.6.2 Montagem das células de Franz	49
3.6.3 Coleta e quantificação das amostras	50
3.6.4 Estudos de permeação <i>in vitro</i>	50
3.7 Estudos <i>in vitro</i> de retenção do fármaco no estrato córneo	50
3.7.1 Retenção no estrato córneo	50
3.7.2 Estudos <i>in vitro</i> de retenção cutânea	51
3.8 Determinação da solubilidade do fármaco em tampão fosfato	52
3.9 Avaliação da recuperação do CDV na pele de orelha de porco	52
4. Resultados e Discussão	54
4.1 Características organolépticas	55
4.2 Caracterização das formulações	55
4.2.1 pH	56

4.2.2 Tamanho de gotícula	57
4.2.3 Luz polarizada	59
4.2.4 Reologia e viscosidade	61
4.3 Determinação da solubilidade do fármaco em tampão	65
4.4. Avaliação da recuperação do cidofovir na pele	66
4.5 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	67
4.6 Estudo de permeação cutânea	70
5. Conclusão	77
Referências	79
Apêndice	92

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 HPV

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus icosaédrico com DNA de dupla hélice com aproximadamente 8000 pares de bases nitrogenadas que codificam todas as funções do vírus (PINTO; MELLINGER, 1999). O diâmetro do capsídeo é de 55 nanômetros e seu peso molecular é de $5,2 \times 10^6$ daltons (BROWN; FIFE, 1990; CHANG, 1990). O HPV pertence ao gênero Papillomavirus da família Papovaviridae (MATTHEWS, 1982) e pode levar a uma variedade de lesões benignas, pré-malignas e malignas em mucosas e superfícies cutâneas (SCULLY; PRIME; MAITLAND, 1985).

Os HPVs são classificados de acordo com seus ácidos nucleicos, ou seja, seu genótipo, em diferentes tipos (COGGIN; ZUR HAUSEN, 1979). Há aproximadamente 100 tipos de HPV já identificados (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2000) e, quanto ao potencial de malignidade, classificam-se em baixo (tipos 6, 11, 13, 32, 34, 40, 42, 44, 53, 54, 55 e 63) e alto risco de malignidade (tipos 16, 18, 31, 33 e 35) (DE VILLERS, 1989).

O conhecimento do genoma do HPV tem conduzido à melhor compreensão da história natural da infecção, desde a simples infecção até o desenvolvimento de câncer. As lesões intraepiteliais de baixo grau estão associadas com a replicação do HPV, em especial dos tipos de baixo risco oncogênico, que na maioria das mulheres a infecção é erradicada pelo sistema imunológico. Os tipos de alto risco oncogênico estão mais associados ao processo de integração do DNA viral ao DNA da célula do hospedeiro, resultando em lesões intraepiteliais de alto grau, que podem evoluir para invasão (SCHIFFMANN; BRINTON, 1988; MOSCICKI, 1999; MUÑOZ et al., 2003; RAMA et al., 2006).

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus ubíquo que causa doença sexualmente transmissível (DST) (SCHIFFMAN et al., 2007; BASEMAN; KOUTSKY, 2005). Estima-se que até 80% das mulheres adquiram uma infecção pelo HPV durante sua vida e até 50% destas infecções será por um tipo de HPV oncogênico

(BASEMAN; KOUTSKY, 2005). Estudos epidemiológicos internacionais têm mostrado que o HPV 16 é o responsável pela maioria dos cânceres do colo do útero, seguido pelo HPV 18. Juntos, perfazem cerca de 70% dos casos. Os HPVs 6 e 11 são responsáveis por 90% das verrugas genitais (condilomas acuminados) (Figura 1) (MUÑOZ et al., 2004; LOWY; SCHILLER, 2006).

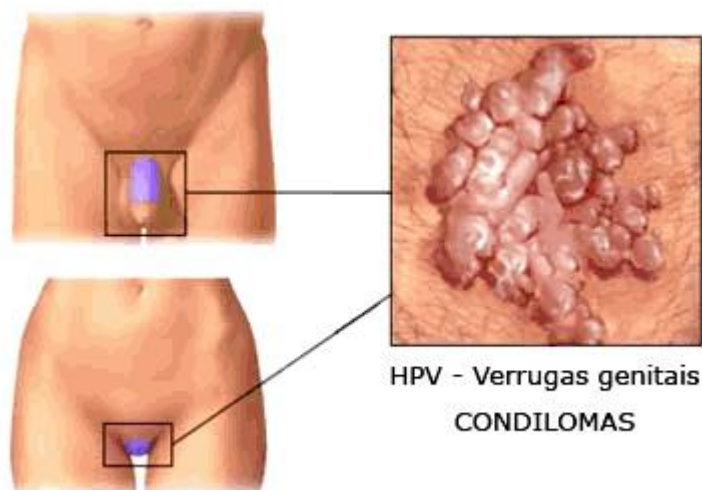


Figura 1 – representação das lesões provocadas pelo HPV.

A infecção persistente pelo HPV é considerada como a mais importante causa de câncer de colo de útero, e o HPV chega a ser encontrado em mais de 98% deste tipo de câncer (WALBOOMERS et al., 1999), sendo que também tem sido implicada sua participação no desenvolvimento de outras neoplasias genitais como de vagina, vulva, pênis, ânus e cavidade oral (RINGSTROM et al., 2002). Acredita-se que o HPV esteja envolvido em 10 a 15% das neoplasias do corpo humano (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2000).

O HPV infecta mucosas e inicia seu ciclo infeccioso no instante em que penetra nas camadas mais profundas do epitélio da cérvix uterina, em especial a junção escamo-colunar (JEC). A infecção por HPV tem sido descrita como fator necessário para ocorrência do câncer cervical (ALBRING; BRENTANO; VARGAS, 2006). Uma fase obrigatória no seu desenvolvimento é a integração do DNA viral com o DNA das células hospedeiras, ocorrendo degradação do gene E2 do HPV levando ao aumento de proteínas virais de HPVs oncogênicos inativando os produtos dos genes supressores de tumor, ocorrendo a malignidade (OLIVEIRA et al., 2003).

O DNA viral dentro da célula hospedeira pode assumir duas formas: a episomal e a integrada. Na forma episomal, o DNA viral permanece circular no núcleo da célula do hospedeiro, não estando integrado ao DNA da mesma. Essa forma é encontrada nas verrugas genitais e lesões de menor gravidade. Para ocorrer a forma integrada, ou seja, para haver integração do genoma circular com o DNA da célula hospedeira, esse deve ser linearizado, pela quebra do DNA viral entre a região E1 e L1, resultando na ruptura ou perda do gene E2, sendo encontrado nas lesões de maior gravidade, como carcinoma “in situ” e invasivo (ALBRING; BRENTANO; VARGAS, 2006).

A maioria das infecções pelo HPV são assintomáticas (latentes e subclínicas), sendo muito pequena a proporção de infecções (1 a 2%) que levam a lesões aparentes. Assim como algumas outras infecções virais, as infecções latentes podem ser decorrentes de: (a) exposição ao vírus sem resultar em infecção; (b) exposição ao vírus com penetração do vírus na célula hospedeira mas sem replicação viral ou sem a maturação completa do vírus (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2000).

Assim, a maior parte das mulheres infectadas pelo HPV não apresenta sintomas clínicos e, em geral, a infecção regride espontaneamente sem nenhum tipo de tratamento. A infecção por alguns tipos de HPV, considerados de alto risco oncogênico, está relacionada à transformação neoplásica de células epiteliais, sendo o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino (VAN DER GRAAF, 2002).

No trato anogenital, o HPV é o agente etiológico das verrugas genitais ou também denominadas condilomas acuminados, que são os tumores genitais benignos mais comuns em ambos os sexos (GISSMANN; ZUR HAUSEN, 1980). Atualmente, não há dúvida que essas lesões são transmitidas pelo contato sexual, e reconhecidamente é a doença sexualmente transmissível mais frequente (CARVALHO, 2004).

O contato sexual é o principal modo de transmissão do HPV, mas há outras vias como a materno-fetal, auto-inoculação a partir de lesões cutâneas ou genitais e abuso sexual orogenital (SEDLACEK et al., 1989; COHEN; HONIG; ANDROPHY, 1990; SMITH et al., 2004; YOSHPE, 1995).

O uso do preservativo é uma medida de prevenção importante, pois diminui a possibilidade de transmissão do vírus através do contato sexual. Atualmente, existem duas vacinas disponíveis para prevenção do HPV, a Gardasil® (Merck) e a Cervarix® (Glaxo Smith Kline) e são indicadas para população feminina entre os 09 e 36 anos, no entanto o período de proteção imunológica das mesmas é desconhecido (BELLO; ENABOR; ADEWOLE, 2011; DERCHAN; SARIAN, 2007; MADDEN et al., 2011).

As várias opções de tratamento para verrugas genitais externas podem ser classificados em dois grupos: os auto-administrados pelo paciente e as aplicadas pelo médico. As alternativas auto-administradas incluem Imiquimod e podofilotoxina. As alternativas aplicadas pelo médico são através de métodos químicos de remoção, entre eles destaca-se a podofilina, e remoção cirúrgica através da crioterapia ou por laser, no entanto todas as técnicas apresentam taxas consideráveis de recidivas (FUENZALIDA; HÉCTOR ESPINOZA, 2007).

1.2 Pele

Como maior órgão do corpo humano, a pele exerce inúmeras funções vitais, como termorregulação, metabólica e é uma excelente barreira biológica contra patógenos, agressões ambientais e perda de nutrientes. Esta proteção só é possível devido à sua estrutura bem organizada, conferida por vários tecidos associados em três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 2) (BOWSTRA et al., 2003; GELFUSO, 2009; CEVC & VIERL, 2010). A pele constitui uma via potencial de aplicação de fármacos devido a seu fácil acesso e sua grande superfície. Representa o órgão mais extenso do corpo, cobrindo uma superfície de aproximadamente 1,73m² sendo irrigada por 1/3 do sangue, além de corresponder a 5% do peso corporal (BARRY, 1983; CHIEN, 1992).

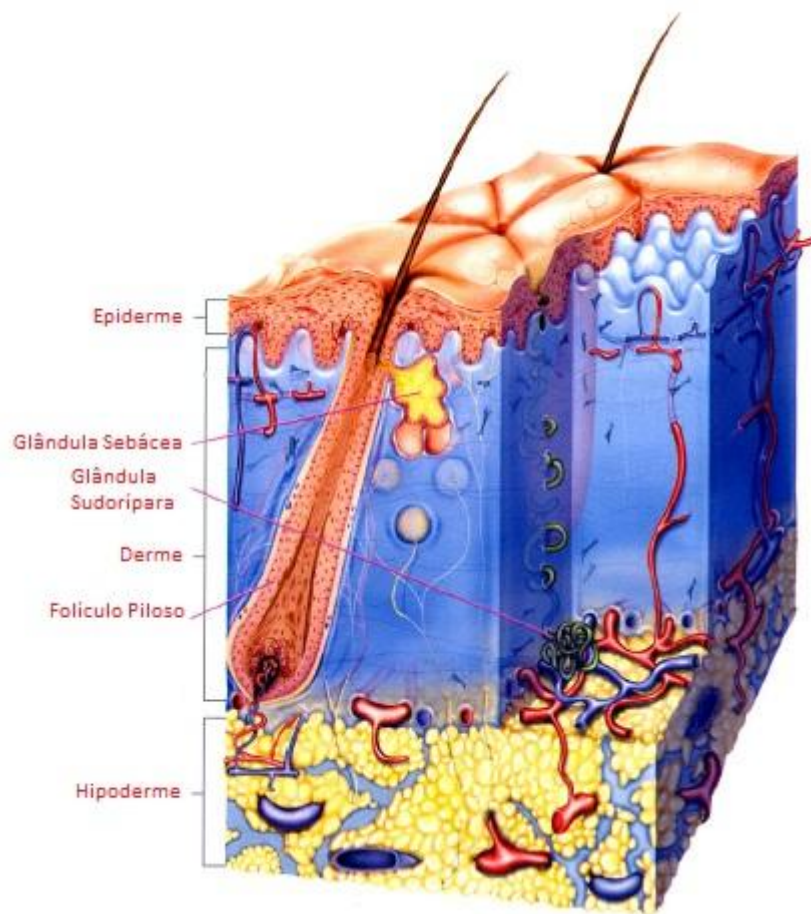


Figura 2 – Representação da estrutura da pele (adaptado de Tassopoulos, 2006).

A pele é composta principalmente de duas partes: a face externa, que corresponde à epiderme, e a face interna, a derme. A derme consiste em um tecido resistente e elástico que proporciona resistência física ao corpo frente às agressões mecânicas, fornece nutrientes à epiderme e abriga os apêndices cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos. A derme, constituída por fibras de colágeno e elastina, é dividida em duas partes: a derme papilar que se encontra em contato direto com a epiderme e a derme reticular, localizada abaixo da derme papilar. As fibras colágenas conferem maior resistência à pele, formando uma rede que sustenta outras estruturas como pelos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas. As fibras elásticas permitem a formação da pele, que retorna ao estado original quando suspensa a tensão aplicada. (RIBEIRO, 2010). A partir da derme emergem os apêndices cutâneos como folículos pilosos e glândulas sebáceas, além das

glândulas sudoríparas (CHIEN, 1992). A unidade pilossebácea é o termo usado para descrever a estrutura integrada do folículo piloso, pelo, músculo eretor do pelo e glândulas sebáceas, as quais estão todas interligadas. Cada folículo piloso pode estar associado a uma ou mais glândulas sebáceas (MEDIAN et al., 2005). Consistem em uma invaginação da epiderme formando um bulbo capilar de onde se originam os pelos e os cabelos. As glândulas sudoríparas liberam o suor que é incolor, inodoro, composto de 99% de água e solutos encontrados no plasma (RIBEIRO, 2010).

A epiderme tem uma estrutura multilamelar, que representa os diferentes estágios de diferenciação celular. A epiderme viável é subdividida em cinco partes: estrato germinativo que contém queratinócitos em vários estágios de diferenciação, assim como melanócitos, células de Langerhans (importante no reconhecimento de antígenos e resposta imune) e células de Merkel (envolvidas na percepção sensorial) (ASBILL; MICHNIAK, 2000); estrato espinoso conhecida também com camada Malpighiana, formada por várias fileiras de células, sendo as mais profundas poliédricas e as mais superficiais achatadas. Essas células são ligadas entre si por pontes intercelulares denominadas desmossomas; estrato granuloso, possui a espessura de duas a três camadas de células carregadas de grânulos de querato-hialina. É responsável pela formação da bicamada lipídica presente entre as fileiras de células corneificadas que formam a camada córnea tendo como função, prevenir a desidratação das camadas subjacentes da epiderme, formar barreira e oferecer a resistência à absorção percutânea; estrato lúcido presente na palma das mãos e planta dos pés conferindo maior espessamento da pele nessas regiões (RIBEIRO, 2010); estrato córneo, formado pelos corneócitos preenchidos por filamentos de queratina e envoltos por envelope proteico (involucrina) rico em resíduos de glutamato.

Os corneócitos são células anucleadas e escamosas compostas principalmente por filamento de queratina. São circundados intercelularmente por uma matriz de lipídios apolares e interconectados entre si por estruturas proteicas conhecidas como desmossomas (BOUWSTRA et al., 2003; HOATH; LEAHY, 2003). As funções vitais do estrato córneo são fortemente dependentes do seu conteúdo aquoso e

desta forma, a integridade do mesmo é fundamental para a hidratação da pele e para a manutenção de uma pele saudável (VERDIER-SÉRVRAAIN, BONTÉ; 2007). A habilidade do estrato córneo em reter água está relacionada à presença de compostos higroscópicos no interior dos corneócitos (*Natural Moisturizing Factor – NMF*) e a presença de lipídios extracelulares ordenadamente arranjados para formar a barreira contra a perda transepidérmica de água (*TransEpidermal Water Loos – TEWL*). O NMF é composto por aminoácidos livres e seus derivados, estando presente em altas concentrações, representando cerca de 20-30% do peso do estrato córneo seco. Por absorver água da atmosfera e incorporá-la ao conteúdo aquoso natural, os componentes do NMF agem como eficientes umectantes (RAWLINGS, HARDING; 2004).

A partir da derme emergem os apêndices cutâneos como folículos pilosos e glândulas sebáceas, além das glândulas sudoríparas (CHIEN, 1992). Os folículos pilosos são distribuídos em toda a superfície cutânea, com a exceção das solas dos pés, palmas das mãos e os lábios. Cada folículo é associado com uma glândula sebácea que varia em tamanho de 200-2000 μm de diâmetro. O sebo segregado pela glândula, constituído por triglicéridos, ácidos graxos livres, ceras e, protege e lubrifica a pele, bem como proporciona a manutenção de um pH em torno de 5,0. As glândulas sebáceas estão ausentes nas palmas das mãos, plantas dos pés e leito ungueal (BURGESON, CHRISTIANO, 1997). As glândulas écrinas são estruturas da epiderme que são simples tubos enrolados, de cerca de 100 μm de diâmetro, localizadas na derme inferior. Ela secreta uma solução aquosa com um pH em torno de 5,0, esta secreção sendo estimuladas por determinantes de temperatura que controlam, tais como exercício e ambiente de alta temperatura, bem como o stress emocional, através do sistema (simpático) nervoso autônomo. Estas glândulas têm uma área de superfície total de cerca de 1/10 000 da superfície total do corpo. As glândulas apócrinas são limitados a regiões específicas do corpo e são também tubos espiralados. Estas glândulas são cerca de 10 vezes o tamanho dos ductos écrinos, estendem-se até o tecido subcutâneo e são emparelhados com os folículos de cabelo. A placa da unha consiste em camadas de células queratinizadas achatadas, fundidas numa massa densa, mas elástica. As células da placa ungueal tem origem na matriz da unha e crescem distalmente a uma taxa de cerca de 0,1

mm/dia. No processo de queratinização das células sofrem alterações de forma e outras mudanças, semelhantes às aquelas experimentadas por células epidérmicas que formam o estrato córneo.

Por fim, a hipoderme é caracterizada por tecido gorduroso, constituído de lóbulos de lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos. Possui propriedades protetoras contra traumatismos e variações térmicas e de armazenamento energético (SOUZA, 2003; AULTON, 2005). Une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apoia (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999; SHERIDAN, TOMPKINS, 1999).

1.3 Via cutânea

As rotas de permeação de fármacos através da pele íntegra incluem a difusão através do estrato córneo e dos apêndices cutâneos, como folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Entretanto, estes apêndices ocupam apenas 0,1% do total da superfície de pele humana e sua contribuição para a permeação é muito pequena. As proteínas desta camada constituem uma camada descontínua, enquanto que a fase lipídica é contínua (MARTINS, VEIGA, 2002). Dois caminhos de permeação através da barreira intacta podem ser identificados: a rota intercelular lipídica, entre os corneócitos, e a rota transcelular, através dos corneócitos e lipídios intercelulares (MOSER et al., 2001). O EC, em geral, funciona como o passo limitante da penetração do fármaco às camadas mais internas da pele, ao contrário da derme que não apresenta função significativa de barreira (AULTON, 2005; MATHUR, SATRAWALA, RAIPUT, 2010). A difusão passiva através do EC pode ser explicada por meio de três etapas: primeiro, o fármaco é liberado de dentro do veículo para a superfície do EC; segundo, ocorre passagem do fármaco para o interior do EC, orientada pelo coeficiente de partição; terceiro, e talvez a de maior importância nos estudos de penetração cutânea, o fármaco difunde-se através do EC (STORPIRTIS et al., 2009).

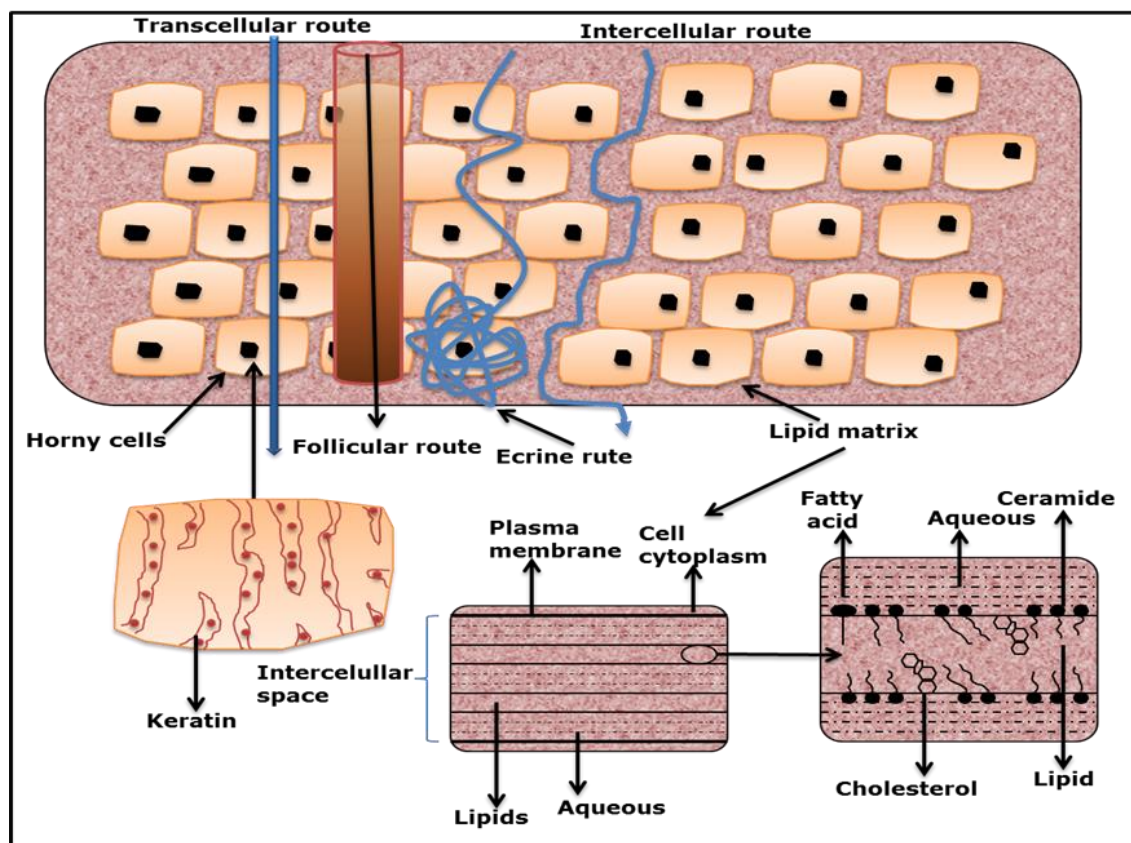


Figura 3 – Representação esquemática das rotas de penetração de drogas através da pele (SEZER, 2012)

1.4 Cidofovir

O cidofovir ((S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina) (HPMPC) (figura 4) é um análogo de nucleosídeo com uma potente atividade in vitro e in vivo contra um largo espectro de vírus da herpes. Os análogos nucleosídicos são análogos de nucleotídeo em que um grupamento fosfonado é ligado, através de uma ligação éter, a uma purina ou pirimidina através de uma cadeia alifática (DE CLERCQ, 2002; DE CLERCQ, 2007).

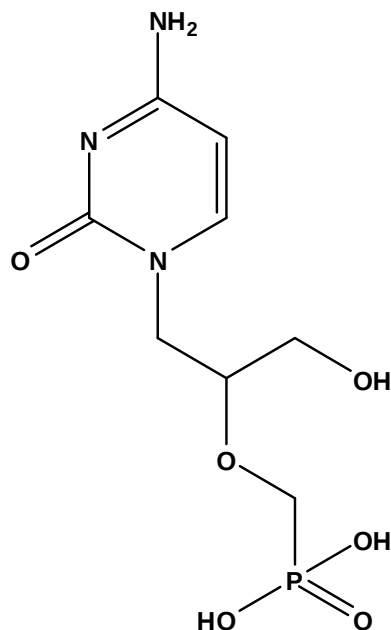


Figura 4 - Estrutura química do cidofovir

Ao contrário da fosforilação do aciclovir e ganciclovir, análogos de nucleosídeos, o cidofovir não depende do vírus específico da timidina quinase (TK), para transformação em seu metabólito ativo, o difosfato de cidofovir (DE CLERCQ, 2007). Este composto foi desenvolvido numa tentativa de minimizar o desenvolvimento de resistência às drogas que tem sido observado com outros análogos de nucleósidos que dependem de enzimas virais para a ativação (NEYTS; DE CLERCQ, 1994; SNOECK; ANDREI; GERARD, 1994).

O cidofovir é fosforilado para as formas monofosfato e difosfato por enzimas celulares, independente da infecção pelo vírus, a forma de difosfato é a ativa (CUNDY; LYNCH; LEE, 1995; DE CLERCQ, 1993; NEYTS; DE CLERCQ, 1994). Este processo está associado a um efeito antiviral prolongado, após a remoção de cidofovir a partir de cultura de células. As concentrações intracelulares difosfato de cidofovir declinam lentamente, com uma meia-vida de cerca de 17 horas (DE CLERCQ, 1993; LALEZARI; DREW; GLUTZER, 1994). Enzimas específicas envolvidas na fosforilação intracelular de cidofovir permanecem por ser elucidados.

Os efeitos antivirais do cidofovir são devidos à inibição da polimerase do DNA viral por seu difosfato metabólito (DE CLERCQ, 1993; NEYTS; DE CLERCQ, 1994). Especula-se que o difosfato de cidofovir interage com polimerase do DNA quer como um substrato alternativo (incorporação na extremidade 3' ou dentro do interior da cadeia de DNA), ou como um inibidor competitivo (em relação ao substrato normal dCTP) (DE CLERCQ, 1993). A existência de um mecanismo adicional ou alternativo, onde o fármaco pode ainda inibir a proliferação de células infectadas pelo HPV induzindo a apoptose e sua ação prolongada deve-se ao longo tempo de meia-vida de seus metabólitos ativos favorecendo uma melhor adaptação posológica através de doses menos frequentes (DE CLERCQ, 2007).

A absorção do cidofovir ocorre lentamente e por endocitose de fase fluída. Após administração oral (V.O), subcutânea (S.C) e intravenosa (I.V) do cidofovir, foi verificada uma biodisponibilidade menor que 5,3% para V.O comparada com a I.V na concentração de 10mg/kg, sendo considerada muito baixa em virtude da pouca permeabilidade do grupo fosfonato na mucosa intestinal. A administração S.C apresentou uma biodisponibilidade de 98,5% quando comparada com a via I.V, sendo a dosagem máxima tolerada de 3mg/kg. Maiores concentrações provocam dor local e fibrose transitória (WACHSMAN et al., 1996).

A nefrotoxicidade é efeito adverso mais pronunciado provocado pelo cidofovir e está fortemente relacionado à sua ação sistêmica, sendo observado em apenas um único caso relacionado às aplicações intralesionais e tópicas (JACOBSEN; SIFONTIS, 2010; MATTELLI et al., 2001; WACHSMAN et al., 1996; ZABAWSKI, 2000). Nessas, por sua vez, podem ocorrer eventuais vermelhidão, ardor e dor local que geralmente desaparecem durante o período de descanso inserido nos ciclos de tratamento tópico (DE CLERCQ, 2003).

Duan et al. (2002) realizaram estudo pré-clínico que demonstrou que a aplicação tópica de solução do cidofovir 1% inibiu ou preveniu o desenvolvimento de papilomas, quando aplicado em coelhos inoculados com papilloma vírus. Em seu estudo, Cundy et al., (1997) demonstraram que a adição de 10% de propilenoglicol ao gel de hidroxietilcelulose contendo 1% do ativo facilitou a permeação do cidofovir

na pele de coelhos, sendo uma importante informação para o desenvolvimento e padronização de formulação para uso tópico.

Doentes com condiloma acuminado genital tratados com cidofovir tópico apresentaram uma taxa de resposta completa de 47% em comparação com 0% ($p = 0,006$) para os pacientes tratados com placebo. Um estudo duplo-cego randomizado 30 indivíduos HIV-negativos para placebo ou gel tópico de cidofovir a 1% foram aplicados cinco noites consecutivas a cada duas semanas para um máximo de 6 ciclos. O gel foi lavado na manhã seguinte. Todos os vírus do papiloma humano eram do tipo 6 e 11. Para nove dos 19 pacientes do grupo de cidofovir com uma resposta completa, a duração média do tratamento foi de 43 dias. Combinado resposta completa e parcial, foi de 84% e 18% ($p = 0,001$) para o cidofovir e placebo, respectivamente. Os eventos adversos mais freqüentemente relatados foram: dor, prurido e erupção cutânea no local da aplicação (SNOECK; BOSSENS; PARENT, 2001).

Estudo realizado por Hengge e Tietze (2000) avaliou o uso de cidofovir tópico a 1,5% em condiloma acuminado recalcitrante ao tratamento a laser, podofilina, e imiquimod. A verruga peniana foi tratada 3 vezes por semana com gel cidofovir 1,5%. Pequenas erosões dolorosas foram desenvolvidas após 6 semanas de aplicação. Cidofovir foi interrompido e as verrugas foram resolvidas sete semanas mais tarde.

1.5 Formas Farmacêuticas Tópicas

1.5.1 Emulsões

Emulsão é a mistura de dois líquidos imiscíveis onde um líquido está disperso em outro na forma de pequenas gotículas. Isto é possível devido à ação do emulsificante, que forma um filme interfacial com propriedades eletrostáticas ao redor das gotículas do líquido disperso impedindo a coalescência e que se separem do dispersante (LACHMAN, 2001). A fase que está dispersa é denominada fase dispersa, ou fase interna ou fase descontínua, enquanto a fase na qual o líquido está disperso é denominada fase dispersante, fase externa ou fase contínua (ANSEL et

al., 2007). A dispersão das fases uma na outra forma um sistema que é termodinamicamente instável, tendendo a separar-se uma vez cessada a força aplicada para obter a dispersão, motivo pelo qual há sempre uma terceira fase denominada fase emulsionante adicionada ao sistema a fim de minimizar tendência à separação das fases, estabilizando o sistema. Uma emulsão em que a fase dispersa corresponde a fase aquosa, enquanto a fase dispersante constitui a fase oleosa é classificada como uma emulsão do tipo água em óleo ou A/O, (GENNARO et al., 2004). (GENNARO et al., 2004).

Há ainda sistemas conhecidos como emulsões múltiplas onde gotículas de fase aquosa estão dispersas em gotículas maiores de fase oleosa, que por sua vez, estão dispersas em uma fase dispersante aquosa formando emulsões do tipo A/O/A, ou gotículas de fase oleosa que estão dispersas em gotículas maiores de fase aquosa, que por sua vez, estão dispersas em uma fase dispersante oleosa formando emulsões do tipo O/A/O, (AULTON, 2005).

1.5.2 Microemulsões

As microemulsões são sistemas homogêneos, pouco viscosos e termodinamicamente estáveis. Estes sistemas apresentam dimensões variando entre a escala micrométrica e nanométrica, transparência óptica, capacidade de veicular fármacos hidrofílicos e lipofílicos, além de serem formadas espontaneamente pela mistura de seus componentes (YUAN et al., 2006; DIXIT, NAGARSENKER, 2010; JAIN, FERNANDES, PATRAVALE, 2010), sendo consideradas sistemas líquidos ideais para a liberação de fármacos (MAGHRABY, 2008).

Estes sistemas são formados basicamente por óleo, água, tensoativos e co-tensoativos. Pode-se definir a proporção necessária destes componentes para a formação de uma microemulsão através da construção do diagrama de fases. O diagrama de fases pode ser classificado como pseudoternário, ternário ou quaternário, de acordo com o tipo e o número de componentes utilizados na sua elaboração (ROSSI et al., 2007). Com a sua preparação, se define as prováveis

composições de diferentes microemulsões que podem ser preparadas com os constituintes inicialmente escolhidos (figura 5) (CARMO, 2011).

As microemulsões podem ser administradas por diversas vias. As vias de administração de microemulsões mais comuns são a oral, a parenteral, a tópica, a ocular e a nasal. Atualmente, tem sido também estudada a administração deste tipo de formulação através de vias mais modernas como a pulmonar, a transdérmica, e a intratecal (KOGAN, GARTI, 2006; YUAN et al., 2006; TALEGAONKAR et al., 2008). A administração transdérmica de microemulsões tem sido amplamente estudada (KREILGAARD, PEDERSEN, JAROSZEWSKI, 2000; SINTOV, BOTNER; 2006; ZHAO et al., 2006; MAGHRABY, 2008; NAOUI et al., 2011; TSAI et al., 2011). Kreilgaard e colaboradores (2000) estudaram a veiculação de um fármaco hidrofílico e outro lipofílico em uma microemulsão. Foi observado um aumento da liberação transdérmica desses fármacos a partir da microemulsão, provavelmente devido ao aumento da solubilidade dos fármacos neste sistema. As microemulsões provocaram ainda baixa irritabilidade na pele (KREILGAARD, PEDERSEN, JAROSZEWSKI, 2000).

Estruturalmente, existem três tipos de MEs: óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) e estruturas bicontínuas. Nas MEs tipo o/a, o componente lipofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente hidrofílico, nas MEs tipo a/o, ocorre o inverso, o componente lipofílico é disperso no componente hidrofílico. Já nas MEs do tipo estruturas bicontínuas, os componentes lipofílicos e hidrofílicos se caracterizam por canais adjacentes alongados com nanogotículas contendo volumes semelhantes entre a fase aquosa e oleosa. Nestes tipos estruturais as microemulsões podem utilizadas como sistemas transportadores de fármacos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos (FORMARIZ et al., 2005).

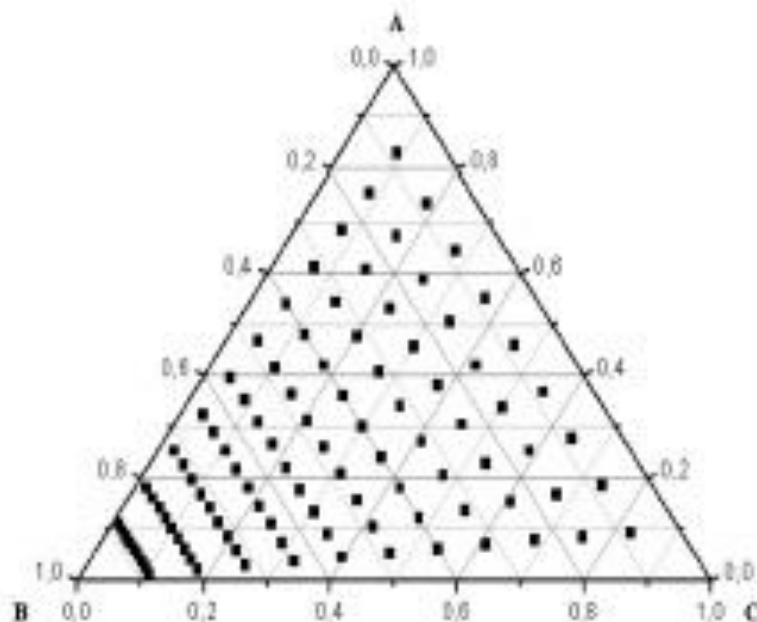


Figura 5 – Representação esquemática de um diagrama de fases (DAMASCENO, 2011).

1.6 Promotores de Permeação

Dentre as estratégias para promover a permeação de fármacos na pele pode-se destacar o emprego de promotores de penetração de fármacos na pele (DEGIM et al., 1999; ASBILL, MICHNIAK, 2000; WILLIAMS, BARRY, 2004), os quais podem ser representados por solventes, tensoativos ou compostos de outra natureza, que são utilizados na formulação para alterar dinamicamente e reversivelmente a integridade da pele a fim de promover a penetração de fármacos (WILLIAMS, BARRY, 1992).

Muitos tipos de promotores de penetração, especialmente os ácidos graxos, vem ganhando grande atenção já que são componentes naturais dos lipídeos da pele, e conseqüentemente, não são estranhos ao organismo. Ácido oleico é um dos ácidos graxos mais abundantes na natureza, presente em todos os óleos e gorduras

originados de plantas e animais e sua capacidade de atuar como promotor de permeação já foi bem esclarecida e comprovada em vários estudos *in vitro* (SMITH; MAIBACH, 1995; JIANG; ZHOU, 2003; NAIK et al., 2004).

Estudos biofísicos, morfológicos e bioquímicos demonstraram que o estrato córneo forma um segmento contínuo de corneócitos ricos em proteínas e embebidos numa matriz rica em lipídeos apolares organizados em camada lamelares. O principal mecanismo de ação dos ácidos graxos é promover a fluidificação dos lipídeos e a separação da fase lipídica, emulsificando e desorganizando as lamelas lipídicas do estrato córneo de maneira a aumentar a permeabilidade de fármacos na pele (JIANG, ZHOU, 2003).

O promotor de permeação ideal será aquele que apresenta as seguintes características: farmacologicamente inerte, não tóxico, de ação imediata, não irritante, não alérgico, de ação reversível, química e fisicamente compatível com o fármaco e excipientes, aceitável cosmeticamente, inodoro, insípido, incolor, acessível e com boas propriedades solventes (SINHA, KAUR, 2000).

Terpenos e terpenóides são normalmente os constituintes dos óleos voláteis. A sua estrutura química consiste em grupos isopreno (C_5H_8) repetidos e é classificada de acordo com o número de grupos isopreno. Observou-se que o L-mentol (presente em elevada quantidade no óleo de hortelã pimenta) aumenta a absorção cutânea da testosterona pela formação de mistura eutética com o fármaco, reduzindo o seu ponto de fusão drasticamente de 153,7 °C para 39,9 °C como foi observado por DSC, o que aumenta a sua solubilidade e, conseqüentemente, a sua absorção. Em estudos adicionais observou-se que o mentol também aumenta a absorção de ceramidas e oleato de colesterol. O mentol afeta a permeação cutânea por meio de um mecanismo duplo: pela formação de mistura eutética com o composto permeante, aumentando deste modo a sua solubilidade, e pela alteração da propriedade barreira do estrato córneo. O mentol distribui-se preferencialmente nos espaços intercelulares do estrato córneo e causa, possivelmente, desestabilização reversível das camadas lipídicas, aumentando, assim, a permeação dos fármacos (KAPLUN-FRISCHOFF, 1997).

O efeito de três óleos essenciais (eucalipto, hortelã pimenta e terpenina) na permeação da fluoruracila (5-FU) foi estudado usando pele de rato removida cirurgicamente. Apesar dos três óleos aumentarem a permeação do fármaco, o seu efeito foi menor que o da azona. O óleo, de eucalipto foi o que se mostrou mais ativo, causando aumento da permeação de fármaco em 60 vezes, enquanto que o de hortelã pimenta e o de terpenina mostraram aumentos de 48 e 28 vezes, respectivamente. O modo de ação destes três promotores pode ser devido a processo combinado de partição e difusão, sendo este último dominante (MARTINS, VEIGA, 2002).

1.7 Estudos de Liberação Cutânea *in vitro*

O teste *in vitro* de liberação de fármacos é uma ferramenta muito importante na indústria farmacêutica, tanto no desenvolvimento de produtos quanto no controle de qualidade de rotina. Apesar de ter sido inicialmente desenvolvido para formas farmacêuticas sólidas, este teste vem sendo aplicado também para formas farmacêuticas não sólidas, como suspensão, adesivos transdérmicos, supositórios e outros (MARCOLONGO, 2003).

Para compreender a liberação *in vitro* de fármacos, devem-se conhecer extensamente alguns dos eventos significativos na realização do ensaio, entre eles podemos destacar (GORDON, 1997):

- A aplicação de uma camada infinita do sistema de liberação, ou seja, da amostra sendo pomada gel ou creme, sobre a superfície da membrana que se localiza entre a amostra e o líquido receptor;
- Evaporação do veículo quando associado, nas mudanças de atividade do fármaco;
- Dissolução do fármaco no veículo;
- Partição do fármaco na membrana;
- Difusão do fármaco através da membrana da pele pela rota transepidermal, na qual, o fármaco penetra o estrato córneo, chega à epiderme viável, atinge a derme e o capilares chegando a corrente

sanguínea, ou pela rota transfolicular onde o fármaco penetra pelo sebo e folículo piloso até atingir a derme e os capilares.

A velocidade de liberação dos produtos tópicos dermatológicos pode ser medida empregando um sistema bicompartimental como célula de difusão vertical com membrana sintética e meio acceptor adequado. A membrana sintética serve como um suporte para separar a formulação do meio receptor, devendo ser quimicamente inerte para não reagir com a formulação ou com o meio acceptor, e não deve ser limitante da velocidade nos processos de liberação do fármaco (HAIGH, SMITH, 1994). A solução receptora deve ser compatível com a metodologia analítica empregada para quantificação do fármaco, obedecendo a condição *sink*, ou seja, o volume empregado é dez vezes maior que o ponto de saturação do fármaco (STORPIRTIS et al., 2009).

Nos estudos *in vitro*, as células de difusão tipo Franz (Figura 6) são comumente empregadas para a avaliação da liberação do fármaco do veículo estimando a quantidade do mesmo que é absorvida pela pele. Esses dispositivos são constituídos por dois compartimentos, um doador e outro receptor, separados por uma membrana sintética ou natural (SILVA et al., 2010). Nos estudos *in vitro*, a velocidade de liberação do fármaco da forma farmacêutica é avaliada utilizando membranas sintéticas. Essas membranas possuem estruturas simples e são isentas de interferentes presentes na pele humana. Assim, a liberação do fármaco irá depender da atividade termodinâmica e da sua solubilidade no veículo. Além disso, essas membranas são facilmente adquiridas, menos onerosas e podem ser utilizadas nos estudos de delineamento de formulações dermatológicas, prevendo o comportamento do fármaco nas membranas biológicas. As membranas mais utilizadas são as de acetato de celulose, nitrato de celulose, nylon e polidimetilsiloxane (CARVALHO, 2007; SANTIS, 2008).

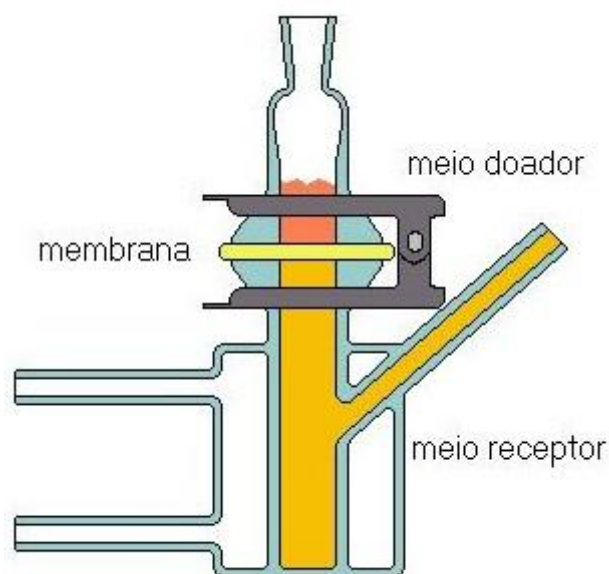


Figura 6 – Representação esquemática de uma célula de Franz.

A avaliação *in vitro* da penetração e permeação cutânea de fármacos também pode ser avaliada por um sistema bicompartimental de difusão vertical, empregando membrana natural, que aproximam-se mais das condições *in vivo*. Dentre os vários tipos de pele animal (rato, cobaio, camundongo com e sem pele, macaco rhesus, cobra) que podem ser utilizadas, recentemente, tem-se empregado a pele suína devido a sua similaridade com a pele humana (HAIGH; SMITH, 1994; KALIA; GUY, 2002; MEDI; SINGH, 2003).

A pele de orelha suína tem sido empregada em pesquisas de produtos dermatológicos para uso humano (figura 7). Neste contexto as camadas da pele de maior importância são a epiderme e a derme (BHATTI, SCOTT, DYER, 1989; MEYER, ZSCHEMISCH, 2002). Entretanto há uma região específica da porção posterior da orelha suína que é mais adequada na aplicação como modelo de correlação para a pele humana (MEYER *et.al.* 2007).

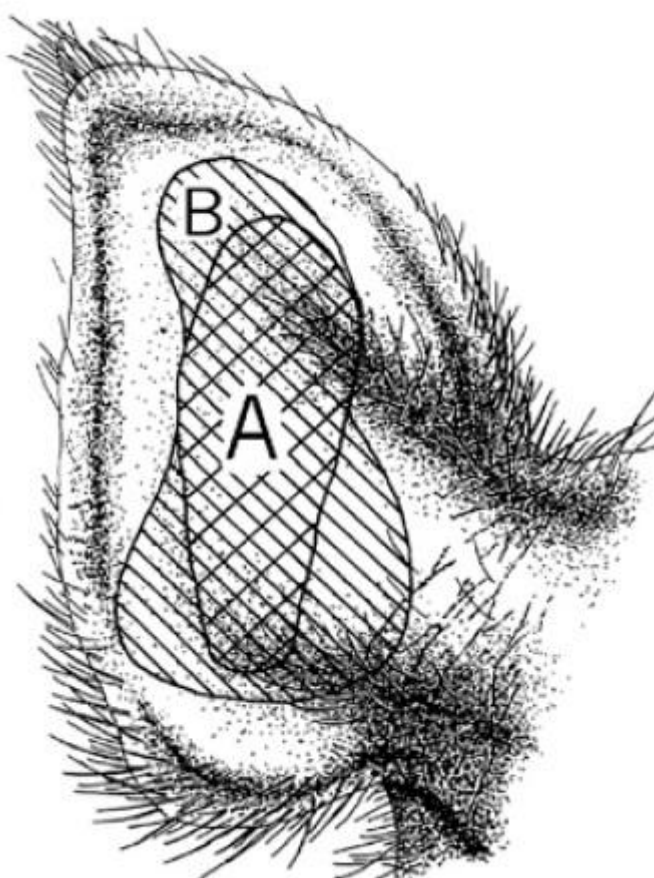


Figura 7 – Área posterior da orelha suína: A e B. São recomendadas para utilização experimental.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterização e avaliação de microemulsões e emulsões do cidofovir para o tratamento de condilomas causado pelo HPV.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparação e caracterização físico-química das microemulsões, quanto ao tamanho de gotícula, potencial zeta, índice de refração, pH e condutividade elétrica e microscopia óptica de luz polarizada;
- Avaliação de parâmetros reológicos das formulações selecionadas;
- Avaliação da liberação *in vitro* do cidofovir a partir das emulsões e microemulsões em células do tipo de Franz utilizando membrana artificial;
- Avaliação da permeação *in vitro* do cidofovir a partir das emulsões e microemulsões em células do tipo de Franz utilizando pele de orelha suína;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1 Seleção e preparo das formulações

As formulações base utilizadas no preparo das microemulsões foram selecionadas a partir do diagrama de fases modificado, desenvolvido por Silva (2008) no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, incorporando o cidofovir (Boyle Chem; lote 20100625) como insumo farmacêutico ativo (IFA) e a emulsão foi obtida conforme descrito por Melo (2012),. Composição qualitativa das microemulsões: Plurol Oleique® (Gattefossé; 134929); Labrasol® (Gattefossé; 134227); Miristato de isopropila (Vetec; lote 1000361); tampão fosfato 7,4. Em algumas formulações foram incorporadas os promotores de permeação (mentol (Fagron; lote MCSH10JU) e 1,8-cineol (Biodinâmica; lote 872112)) ambos na proporção de 2,5% (p/p). A incorporação destes terpenos ocorreu na fase oleosa da formulação.

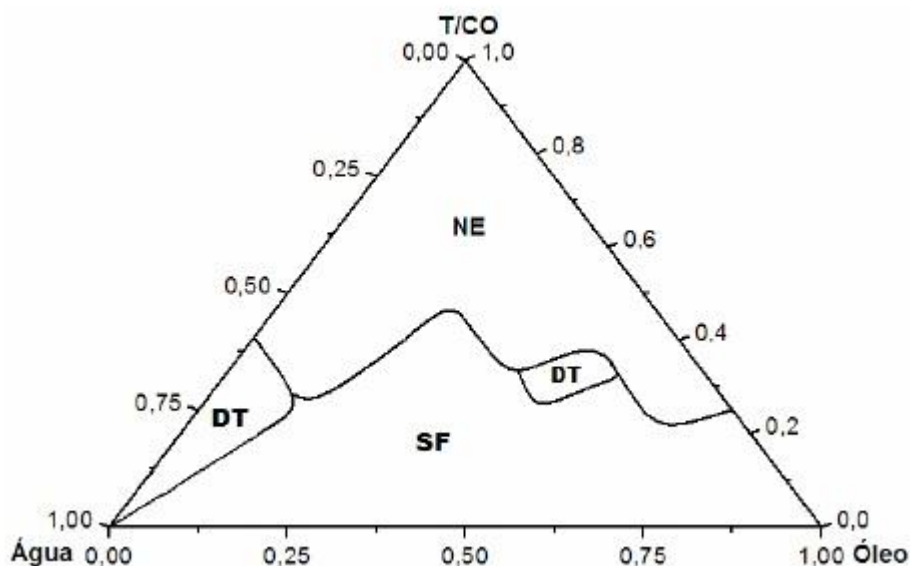


Figura 8 – Diagrama de fase pseudo-ternário para o sistema PEG-8 cáprico/caprílico glicerídeo (Labrasol®) / poligliceril 6-dioleato (Plurol Oleique®), miristato de isopropila e tampão fosfato para proporções T:CO 3:1. As áreas delimitadas representam: SF – separação de fases; DT – dispersão turva; ME – microemulsão.

As microemulsões foram preparadas por simples solubilização mediante agitação magnética, seguindo a sequência de mistura tensoativo co-tensoativo, por conseguinte adição da fase oleosa seguida da incorporação da fase aquosa.

As emulsões foram preparadas pela técnica de inversão de fases, onde a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, ambas com temperatura de 75°C e a agitação mantida constante em agitador mecânico citado com velocidade de 500rpm à temperatura de 25°C, seguindo de observação visual de suas características macroscópicas.

Tabela 1 – composição qualitativa e quantitativa das formas farmacêuticas obtidas.

Composição (%)	F4	F4CDV	F4C	F4M	F5	F5CDV	F5C	F5M	E	E CDV	EC	EM
Labrasol®	45	45	45	45	30	30	30	30	-	-	-	-
Plurol®	15	15	15	15	10	10	10	10	-	-	-	-
Miristato de isopropila	10	10	7,5	7,5	10	10	7,5	7,5	-	-	-	-
Polawax®	-	-	-	-	-	-	-	-	14	14	14	14
Oleato de isodecila	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	3	3
Propilenoglicol	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	5	5
EDTA	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1
BHT	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03	0,03	0,03	0,03
Cineol	-	-	2,5	-	-	-	2,5	-	-	-	2,5	-
Mentol	-	-	-	2,5	-	-	-	2,5	-	-	-	2,5
cidofovir	-	1	1	1	-	1	1	1	-	1	1	1
Tampão 7,4 q.s.p.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

3.2 Caracterização das Formulações

3.2.1 Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica é uma ferramenta muito utilizada na determinação de domínios contínuos aquosos ou oleosos da formulação. Ela também é empregada na observação de modificações estruturais das microemulsões (LAWRENCE, REES, 2000).

Para determinar o tipo do sistema O/A ou A/O, avaliou-se, primeiramente, a condutividade do solvente aquoso e do solvente oleoso. Em seguida, realizou-se a medida de condutividade da amostra. Quando a condutividade da amostra é próxima da condutividade da fase aquosa, a formulação é designada O/A, se for próxima à do óleo, ela é caracterizada como A/O (LAWRENCE, REES, 2000; AULTON, 2005).

A condutividade elétrica foi determinada em condutivímetro modelo CG 2200 (GEHAKA[®]) calibrado com uma solução padrão de KCl de 1.412 $\mu\text{S}/\text{cm}$, à temperatura ambiente.

3.2.2 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado através de pHmetro modelo PG 1800 (GEHAKA[®]), previamente calibrado com as soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0, à temperatura ambiente, sem diluição do produto (PRISTA, 1995; LE HIR, 1997).

3.2.3 Índice de Refração (IR)

A determinação do IR das amostras é importante, pois através desse parâmetro é possível avaliar a estabilidade das microemulsões, além de auxiliar na determinação do tipo de microemulsão, água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) (KAMILA, et al., 2009). O IR das amostras foi determinado utilizando refratômetro digital PAL-RI (Atago[®]). O aparelho foi calibrado com água destilada, à 25°C, obtendo-se o valor de 1,3325 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). As medidas do

IR foram feitas em triplicata, à temperatura ambiente. O IR das amostras foram comparados ao IR da fase oleosa e da água.

3.2.4 Reologia e Viscosidade

A reologia consiste no estudo do escoamento ou deformação do material em estudo quando submetido a uma tensão (WOOD, 1986). O método é aplicável na caracterização de sistemas microemulsionados, pois o comportamento do fluído está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema (interações entre seus componentes). Também podem ser empregadas para avaliar a qualidade durante o processo de produção, além de permitir um estudo do efeito de aditivos na formulação (SCOTT, 2000; FORMARIZ et al., 2005).

A determinação do comportamento reológico das microemulsões foi realizada através de reômetro rotacional de cilindros concêntricos tipo Searle, cujo cilindro interno sofre rotação e o externo permanece em repouso. Para descrever as características de fluxo foi utilizado o software Rheoplus® (v. 3.40, Anton Paar).

Para a análise das propriedades reológicas e viscosidade das emulsões foi utilizado um viscosímetro rotacional Rheology International® empregando *spindle* ASTM 7. Utilizou 100g das amostras, e as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

3.2.5 Tamanho de gotícula

Os meios dispersos apresentam a propriedade de espalhar as ondas eletromagnéticas (como a luz), que venham a atravessá-los. Este fenômeno depende do tamanho das gotículas que compõem o sistema disperso e do comprimento de onda utilizado (URSICA et al., 2005). O diâmetro médio das gotículas internas das microemulsões e índice de polidispersividade (PDI) podem ser avaliados pela técnica de "*Dynamic Light Scattering*", a qual fornece informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas das MEs e permite o cálculo do diâmetro médio da gotícula (d) através do valor do coeficiente de difusão (D)

determinado pela equação de Stokes-Einstein (TENJARLA, 1999; FORMARIZ et al., 2005):

$$\frac{D}{3\pi\eta d} = \frac{kT}{3\pi\eta d}$$

onde: k = constante de Boltzmann, T = temperatura e η = viscosidade

As microemulsões foram submetidas, sem diluições, a medida de espalhamento dinâmico de luz, realizando cinco leituras de 40 ciclos, utilizando-se o equipamento ZetaSizer[®] Nano-ZS90 (Malvern Instruments).

A medição do tamanho de gotícula das emulsões foi realizado conforme o método proposto por Coelho (2005). Foi utilizado o microscópio óptico L-1000B (Bioval[®]), com objetivas de 10, 40 e 100x de magnitude e uma ocular de 10 aumentos, onde foi feita a aferição do diâmetro de 100 gotículas com régua em escala micrométrica acoplada à ocular.

3.2.6 Potencial Zeta

Esta análise permite a determinação da estabilidade e das interações que esta partícula possa ter com o fármaco. O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003). A medida do potencial zeta permite esclarecimentos sobre a estabilidade da formulação, principalmente durante o seu período de estocagem. Geralmente, a agregação entre as gotículas é menor quando há repulsão eletrostática entre elas. Para garantir a estabilidade das formulações acredita-se que o potencial zeta deve ser superior ao módulo de 30mV, porém esta regra não pode ser aplicada irrestritamente, pois existem algumas formulações com estabilizantes que possuem um potencial zeta menor e nem por isso não são estáveis (FREITAS, MULLER, 1998; MULLER et al., 1996).

As determinações foram realizadas com auxílio do ZetaSizer[®] Nano-ZS90 (Malvern[®] Instruments).

3.2.7 Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada é uma técnica que permite a classificação quanto à isotropia e anisotropia, ou seja, capacidade de desviar o plano de luz polarizada, permitindo a diferenciação entre o tipo de estruturação (FORMARIZ, 2008).

A identificação da isotropia nas formulações obtidas foi realizada por Microscopia de Luz Polarizada DM 750P (Leica[®]).

3.3 Quantificação do Cidofovir

3.3.1 Espectrofotometria por Ultravioleta

A quantificação do cidofovir foi realizada por espectrofotometria de absorção no UV, tomando-se por base o método proposto por Melo (2012), com o objetivo de se determinar o teor de cidofovir nas amostras em estudo.

As amostras foram lidas por espectrofotômetro modelo UV mini-1240 (Shimadzu[®])

3.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Ultravioleta

As análises do fármaco foram realizadas por CLAE segundo metodologia descrita por Santoyo (2002).

As análises foram realizadas em CLAE (Shimadzu[®]) com bomba LC-10AD; auto-injetor SIL-10AD; detctor UV-Vis SPD-10AV; controlador SCL-10; com fase móvel composta por tampão fosfato de sódio monobásico / acetonitrila (J.T. Baker[®])

(97:3 v/v), pH 6,0 e pareador iônico tetrabutyl amônio sulfato (J.T. Baker®) 1,5 mM, isocrático, bombeado sob fluxo de 1,0 mL/min e com coluna Phenomenex® Luna 5µm C18, 100A, 250 x 4,6 mm, volume de injeção de 30µL de detecção por ultravioleta em comprimento de onda de 274nm, com tempo de análise de 23 minutos.

3.4 Seleção do meio receptor

Para a seleção do meio receptor deve-se levar em consideração a compatibilidade com a membrana (pele) e principalmente a condição sink. Isto irá assegurar que a difusão no sentido contrário não ocorra e que a solubilidade não seja fator limitante na taxa de liberação ou fluxo durante o experimento (OECD, 2004).

Diante do exposto, foi selecionada a solução tampão 7,4.

3.5 Estudo de liberação *in vitro*

3.5.1 Preparo da membrana sintética

Foi utilizada membrana sintética de ésteres (acetato) de celulose (Millipore®; lote B9KN73363). A membrana foi previamente hidratada em tampão fosfato pH 7,4 por um período de 24 horas.

3.5.2 Montagem das células de Franz

O compartimento receptor das células de Franz foi completamente preenchido com solução receptora. A membrana de acetato de celulose foi disposta na célula de modo que ficasse em contato com a solução receptora sem a formação de bolhas. E no compartimento doador foi colocado 500 mg da formulação. A formulação foi ocluída por PARAFILM® (Pechiney Plastic Packaging). O sistema foi mantido sob agitação (300 rpm) por meio de barra magnética. As células foram mantidas em banho circulante a 37°C.

3.5.3 Coleta e Quantificação das Amostras

A retirada de alíquotas foi realizada em intervalos de tempo pré-estabelecidos, coletando-se um volume de 3 mL da solução receptora e repostado imediatamente. As alíquotas foram quantificadas por espectrofotometria UV. As análises foram realizadas em quadruplicatas para cada formulação. O período de amostragem manual foi de 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 e 6 horas da aplicação da formulação.

A quantidade liberada de cidofovir acumulada no compartimento receptor, em cada tempo, foi calculada levando-se em consideração o volume total da célula (6 mL), a quantidade de fármaco retirada nas coletas anteriores e a área de exposição (1,15 cm²) do compartimento doador.

3.5.4 Análise de cinética e análise de liberação *in vitro*

Para a avaliação da cinética de liberação do cidofovir nos sistemas, os resultados de liberação *in vitro* foram compilados em gráficos de dispersão xy, característicos de três modelos de cinética:

- Ordem zero: quantidade liberada por área (µg/cm²) *versus* tempo (h);
- Higuchi: quantidade liberada por área (µg/cm²) *versus* raiz do tempo (h);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada por área (µg/cm²) *versus* tempo (h).

A partir da análise de regressão linear, determinou-se o coeficiente linear (r) para cada modelo de cinética. O modelo que apresentou maior valor de r foi o selecionado. O valor da taxa de liberação corresponde à inclinação (a) da porção linear do modelo de cinética selecionado (COSTA, LOBO, 2001).

3.6 Estudo *in vitro* de permeação e retenção cutânea

3.6.1 Obtenção e preparo da pele suína

As orelhas foram obtidas de animais recentemente sacrificados em matadouro local e, logo após foram lavados em água corrente. Com auxílio de uma tesoura os pelos foram cuidadosamente cortados próximo à superfície epidérmica, seguindo-se da separação da pele à cartilagem (descartando as áreas onde eram observadas lesões, manchas ou arranhões) e remoção da camada subcutânea remanescente (figura 9).



Figura 9 – Fotografia do método de preparação da pele de orelha de porco para estudo de permeação.

3.6.2 Montagem das células de Franz

As células de Franz foram montadas de mesmo modo conforme descrito para o estudo de liberação *in vitro* (item 3.4.2). Observando que a parte externa, estrato córneo, ficasse voltada para o compartimento doador, e consequentemente, a parte interna da derme ficasse em contato direto com a solução receptora, sem formação de bolhas.

3.6.3 Coleta e quantificação das amostras

A retirada das alíquotas foi realizada conforme descrito item 3.4.3. Sendo o volume coletado em cada intervalo de 1 mL, em períodos de 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após aplicação da formulação e quantificado por CLAE-UV.

A quantidade permeada de cidofovir acumulada no compartimento receptor, em cada tempo, foi calculada levando-se em consideração o volume total da célula (± 6 mL), a quantidade de fármaco retirada nas coletas anteriores e a área de exposição ($1,15 \text{ cm}^2$) do compartimento doador.

3.6.4 Estudo de permeação *in vitro*

A avaliação da permeação e determinação do fluxo de permeação *in vitro* foi realizada através da análise de regressão linear do gráfico de dispersão xy, aplicando três modelos de cinética, conforme descrito no item 3.4.4.

3.7 Estudos *in vitro* de retenção do fármaco no estrato córneo

Ao final do experimento na célula de Franz, as peles foram retiradas, cuidadosamente lavadas com água destilada para retirar o excesso da formulação e levemente pressionadas com papel absorvente para retirar o excesso de água (MOREIRA, 2008).

3.7.1 Retenção no estrato córneo

A área de pele exposta à difusão foi fixada em uma superfície lisa com o estrato córneo voltado para cima (figura 10). A remoção do estrato córneo foi feita aplicando 15 fitas adesivas (Durex[®] 3M), sendo a primeira desprezada. As fitas foram transferidas para tubo Falcon contendo 5 mL de solução metanol/tampão fosfato 7,4 (1:1) e subsequente agitados em vortex por 5 minutos. Em seguida filtradas em membrana com poro de $0,45 \mu\text{m}$ (Millex[®]) (LIRA, 2008; SILVA 2008).

As amostras foram submetidas à análise por CLAE-UV e os resultados obtidos foram expressos em quantidade de fármaco por área de exposição (MOREIRA, 2008).

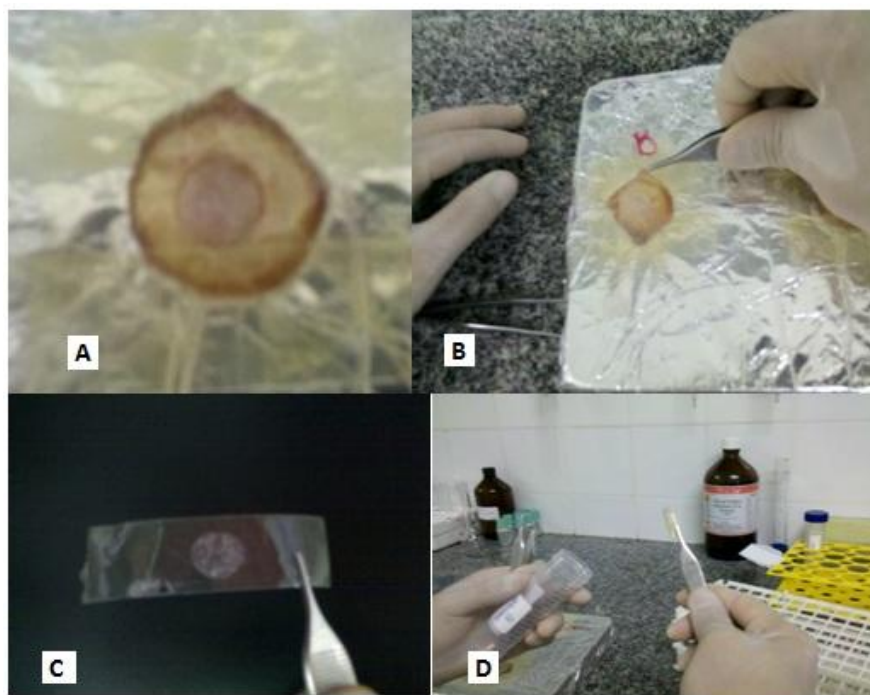


Figura 10 – Fotografia do método de remoção do estrato córneo. A) fixação da pele; B e C) remoção do estrato córneo por fitas adesivas; transferência das fitas para tubo Falcon.

3.7.2 Estudos *in vitro* de retenção cutânea

O tecido cutâneo remanescente, Derme + Epiderme, foi cortado, os fragmentos foram transferidos para tubo Falcon e adicionado 5 mL de solução metanol/tampão fosfato 7,4 (1:1). Em seguida, foi feita a trituração do tecido em homogeneizador tipo ULTRA TURRAX[®] (IKA[®]) por 5 minutos e posteriormente submetido a banho de Ultrassom (modelo Q3350 Quimis[®]) por 30 minutos a fim de promover o rompimento das células e liberação do fármaco, por fim as amostras foram centrifugadas, (centrífuga Centribio[®]), a 1000 G por 30 minutos. A suspensão assim obtida foi filtrada em membrana de poro 0,45 µm (Millex[®]) e a quantificação foi feita por CLAE-UV (figura 11).



Figura 11 – Fotografia do método de extração do fármaco da Derme+Epiderme.

3.8 Determinação da solubilidade do fármaco em tampão fosfato pH 7,4

A solubilidade do cidofovir no tampão 7,4 foi determinada mediante o preparo de dispersões contendo excesso do cidofovir. Os tubos foram levados a um banho Dubnoff (Quimis[®]) sob agitação constante a 37°C. Após um período de 24 horas, os tubos foram centrifugados por 30 minutos, submetidos a uma força de 1000 G e imediatamente o sobrenadante foi filtrado através de membrana de poro 0,45 µm. A solução resultante da filtração foi analisada quantitativamente por espectrofotometria UV, utilizando o tampão sem o fármaco para ajuste do zero.

3.9 Avaliação da recuperação do CDV na pele de orelha de porco

Para avaliar a recuperação do cidofovir nas amostras de pele, o estrato córneo foi retirado de uma área difusional de 1,15 cm² das peles com o uso de 15 fitas adesivas. As fitas contendo o estrato córneo foram colocadas em tubo Falcon onde foram adicionados volumes conhecidos de solução padrão de cidofovir, em concentrações diferentes (2 e 8 µg/mL). Em seguida adicionado 5 mL da solução tampão o qual foi agitado durante 5 minutos em vórtex, seguindo de filtração em membrana de poro de 0,45 µm e quantificação por CLAE-UV (LIRA, 2007).

Os fragmentos de pele sem o estrato córneo foram picotados e colocados em tubos Falcon. A estes tubos foram adicionados volumes conhecidos de solução padrão de cidofovir, para obter concentrações de 2 e 8 µg/mL. Em seguida adicionado 5 mL da solução metanol : tampão (50/50) o qual foi colocado em homogeneizador de tecidos por 5 minutos para trituração, e em banho de ultrassom por 30 minutos, seguindo por centrifugação por mais 30 minutos a 1000 g, por fim a filtração em unidade filtrante de poro com 0,45 µm e quantificação por CLAE-UV.

Os valores de recuperação foram determinados pela equação (SILVA, 2007):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração real}} \times 100$$

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1 Características organolépticas

Após 24 horas da preparação, as formulações foram avaliadas visualmente quanto aos parâmetros de aspecto, cor, homogeneidade bem como indícios de instabilidades tais como presença de sedimentação, coalescência e separação de fases (Figura 12) (MORAIS, 2006).



Figura 12 – Visualização do aspecto homogêneo do sistema microemulsionado.

4.2 Caracterização das Formulações

A avaliação dos parâmetros físico-químicos das formas farmacêuticas é de fundamental importância na caracterização completa das estruturas formadas.

Os resultados de índice de refração das formulações (Tabela 2) sugerem que as formulações apresentam maior domínio aquoso. De acordo com as medidas de condutividade, observou-se que a incorporação do fármaco não provocou uma inversão de fases das microemulsões. Todas as formulações apresentaram-se como sistema do tipo O/A, já que seus valores de condutividade elétrica foram próximos. As medidas de condutividade elétrica e índice de refração para as microemulsões foram eficazes na determinação do tipo estrutural.

Tabela 2 – condutividade e índice de refração das formulações e dos excipientes.

Formulação	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	Índice de Refração
F4	950 ± 3	$1,3933 \pm 0,0001$
F4CDV	787 ± 6	$1,3981 \pm 0,0001$
F4C	868 ± 2	$1,3984 \pm 0,0001$
F4M	702 ± 7	$1,3983 \pm 0,0001$
F5	1017 ± 2	$1,3809 \pm 0,0001$
F5CDV	1070 ± 6	$1,3884 \pm 0,0001$
F5C	1150 ± 4	$1,3855 \pm 0,0001$
F5M	1082 ± 5	$1,3803 \pm 0,0001$
Tampão 7,4	> 1412	$1,3328 \pm 0,0001$
Miristato de isopropila	0,00	$1,4434 \pm 0,0001$

4.2.1 pH

O pH cutâneo da pele oscila entre 5,5 e 7,0, podendo ser tolerado até pH 8,0 (SILVA, 2000). Essa faixa de pH é mantida por um sistema tampão de ácido láctico/lactato, pelos ácidos dicarboxílicos do suor, ácidos graxos das glândulas sebáceas e pelos elementos ácidos da queratina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). O pH ideal de uma formulação é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância da pele (SILVA, 2008).

Os valores observados na Tabela 3, confirmam que as formulações apresentam um pH compatível com as características do fármaco, das formulações e da pele.

Tabela 3 – valores de pH encontrados.

Formulação	pH
F4	6,40 ± 0,03
F4CDV	6,55 ± 0,01
F4C	6,39 ± 0,06
F4M	6,49 ± 0,04
F5	6,51 ± 0,07
F5CDV	6,32 ± 0,03
F5C	6,35 ± 0,05
F5M	6,65 ± 0,06
E	6,42 ± 0,03
E CDV	6,72 ± 0,02
EM	6,21 ± 0,04
EC	6,86 ± 0,08
Tampão 7,4	7,4 ± 0,03
Miristato de isopropila	-

n = 3

4.2.2 Tamanho de gotícula

Os resultados de tamanho de gotícula demonstram a formação de sistemas com diâmetro da fase interna em escala nanométrica. Em sistemas nanométricos outra característica de grande relevância no desenvolvimento é a polidispersibilidade do tamanho das gotículas. Valores altos de PDI caracterizam sistemas grosseiros, ou seja, grande dispersão dos valores de tamanho de gotículas (SARKAR et al., 2005). Conforme demonstrado na Tabela 4, as formulações apresentaram valores de PDI menores que 1,0, o que caracteriza boa uniformidade de distribuição do tamanho de gotículas da fase interna e dispensa técnicas auxiliares para obter uma maior uniformidade de distribuição do tamanho de gotícula (DZIUBLA et al., 2001).

A observação microscópica das gotículas é uma técnica vantajosa para se obter informações sobre a uniformidade da fase interna da emulsão (COELHO, 2005). É interessante que o tamanho das gotículas seja avaliado em função do tempo, pois um aumento progressivo do tamanho pode acarretar em perda da estabilidade (AULTON, 2005). Na Tabela 5 pode-se observar os valores do tamanho médio de gotículas das emulsões estudadas.

Tabela 4 – tamanho de gotículas, IPD e potencial zeta das formulações microemulsionadas.

Formulação	Tamanho de gotícula (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)
F4	21,47	0,46	-14,20
F4CDV	35,05	0,217	-7,71
F4C	36,21	0,248	-7,90
F4M	59,42	0,164	-8,75
F5	17,37	0,467	-17,80
F5CDV	25,75	0,453	-8,80
F5C	28,40	0,448	-9,370
F5M	48,72	0,257	-17,80

IPD – índice de polidispersidade

Tabela 5 – tamanho de gotículas das emulsões.

Formulação	Tamanho de gotícula (µm)	Desvio Padrão
E	0,56	± 0,21
ECDV	0,75	± 0,15
EC	0,71	± 0,24
EM	0,66	± 0,33

4.2.3 Luz Polarizada

A isotropia de um sistema disperso como uma microemulsão pode ser determinada por microscopia de luz polarizada, cujas propriedades são utilizadas para revelar informação sobre sua microestrutura interna (FORMARIZ et al., 2007). Sendo assim as microemulsões estudadas apresentam essa característica conforme a figura 13.



Figura 13 – Fotomicrografia obtida utilizando microscopia de luz polarizada, objetiva de 20, da ME F4 sem o CDV.

Nota-se que a incorporação do cidofovir nesses sistemas não altera o comportamento isotrópico (figura 14), ou seja, sob o plano de luz polarizado não desvia luz, confirmando a manutenção de sistema microemulsionado.



Figura 14 – Fotomicrografia obtida utilizando microscopia de luz polarizada, objetiva de 20x, da ME F5 com o CDV.

As fotomicrografias apresentadas na figura 15 mostra que a adição dos promotores de permeação (mentol e 1,8 cineol) na concentração de 2,5% não modifica a característica de isotropia das microemulsões.

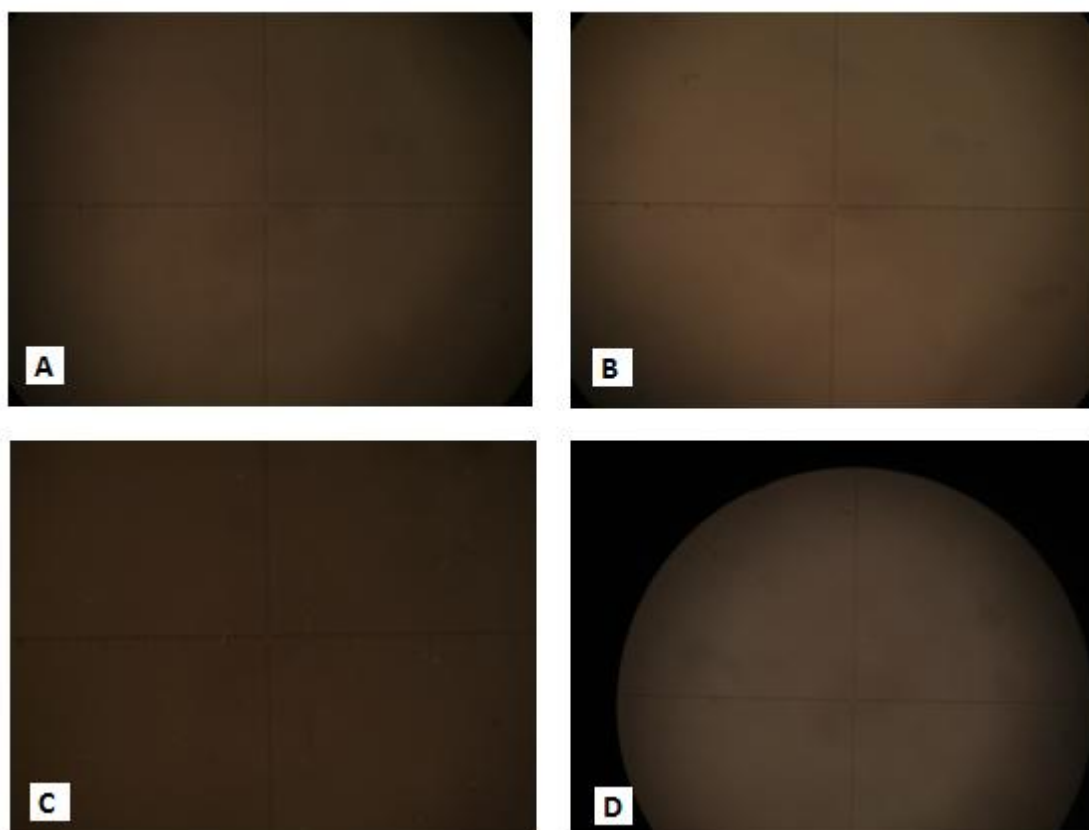


Figura 15 – Fotomicrografia obtida utilizando microscopia de luz polarizada, objetiva de 20x, A) ME F4 com 2,5% de cineol, B) ME F4 com 2,5% de mentol, C) ME F5 com 2,5% de cineol e D) ME F5 com 2,5% de mentol.

4.2.4 Reologia e viscosidade

As propriedades de fluxo de uma emulsão são características físicas determinantes para o equilíbrio do sistema, pois fornecem informações sobre estabilidade física e a consistência do produto. A correlação entre a avaliação reológica e estes aspectos físicos e de aceitação comercial é de grande importância na predição do desempenho e no desenvolvimento de novos produtos (BARNES, 1994; TADROS, 2004).

O comportamento reológico de uma emulsão depende da interação entre os componentes do sistema. Os parâmetros básicos que o determinam são: reologia da fase contínua, natureza das gotículas da fase dispersa (tamanho, concentração e deformabilidade) e as interações entre elas (BARNES, 1994).

Em sistemas emulsionados por tensoativos não-iônicos e alcoóis graxos onde há formação de bicamadas lamelares na fase gel, a reologia é determinada pela dinâmica da água entre o espaço interlamelar e fase dispersante (RIBEIRO et al., 2004). Sistemas emulsionados geralmente apresentam fluxo não-Newtoniano, cuja viscosidade depende da taxa de cisalhamento. São conhecidos três tipos diferentes de comportamento não-Newtoniano dependendo do tipo de desvio: fluxo plástico, pseudoplástico e dilatante (BARNES, 1994).

Já as microemulsões, em geral, apresentam comportamento de um fluido Newtoniano, ou seja, a viscosidade se mantém constante com a variação da taxa de cisalhamento (GASCO, 1991; SPICLIN, 2003).

Os sistemas microemulsionados obtidos neste estudo apresentam-se sob a forma de líquido bastante fluida e, estes apresentaram comportamento reológico de

um fluido Newtoniano conforme observado nas Figuras 16 e 17. Nas Figuras 18 e 19 observa-se o comportamento reológico das emulsões, caracterizadas por serem formulações não-Newtonianas do tipo pseudoplástico, com fenômeno de tixotropia representado pela área de histerese formado entre as curvas ascendentes e descendentes do gráfico Tensão de cisalhamento x Taxa de cisalhamento.

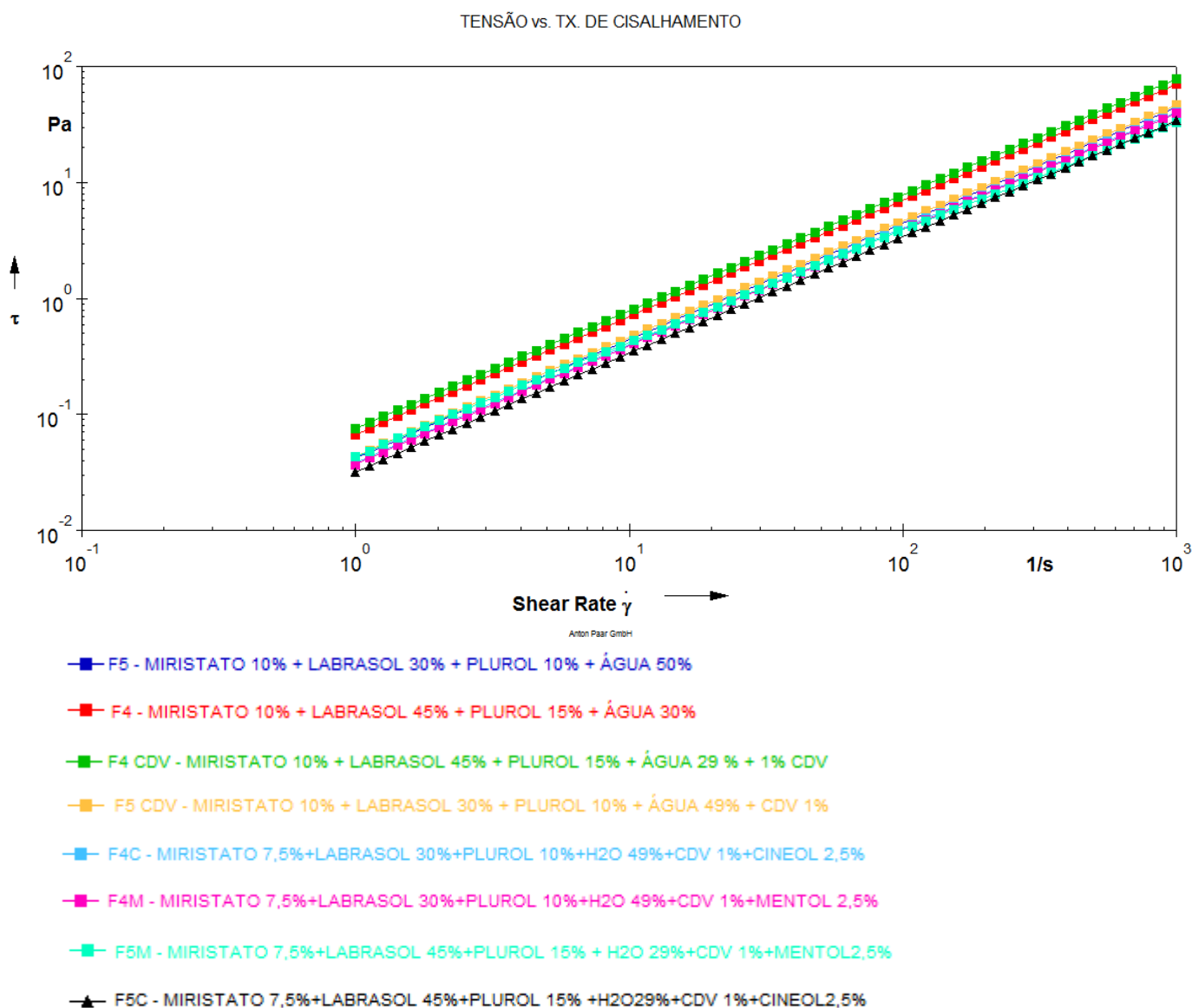
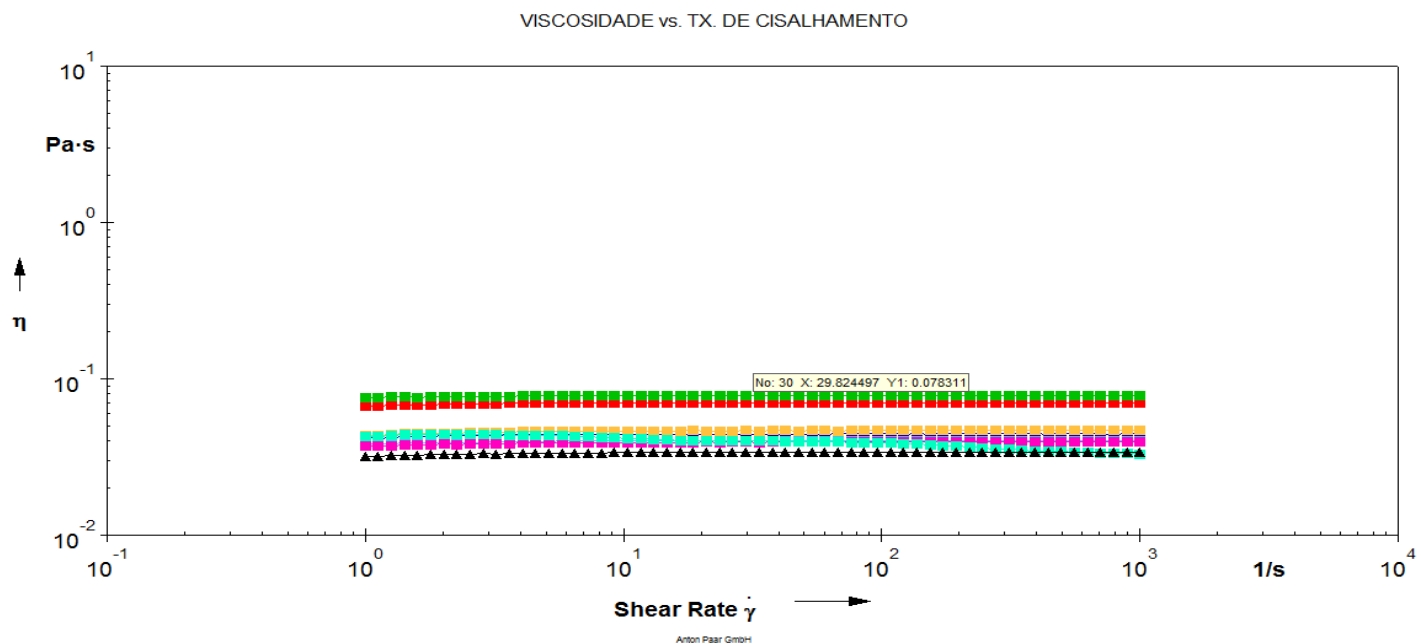


Figura 16 – gráfico da Tensão de cisalhamento x Taxa de cisalhamento das microemulsões.



- F5 - MIRISTATO 10% + LABRASOL 30% + PLUROL 10% + ÁGUA 50%
- F4 - MIRISTATO 10% + LABRASOL 45% + PLUROL 15% + ÁGUA 30%
- F4 CDV - MIRISTATO 10% + LABRASOL 45% + PLUROL 15% + ÁGUA 29 % + 1% CDV
- F5 CDV - MIRISTATO 10% + LABRASOL 30% + PLUROL 10% + ÁGUA 49% + CDV 1%
- F4C - MIRISTATO 7,5%+LABRASOL 30%+PLUROL 10%+H2O 49%+CDV 1%+CINEOL 2,5%
- F4M - MIRISTATO 7,5%+LABRASOL 30%+PLUROL 10%+H2O 49%+CDV 1%+MENTOL 2,5%
- F5M - MIRISTATO 7,5%+LABRASOL 45%+PLUROL 15% + H2O 29%+CDV 1%+MENTOL2,5%
- ▲— F5C - MIRISTATO 7,5%+LABRASOL 45%+PLUROL 15% +H2O29%+CDV 1%+CINEOL2,5%

Figura 17 – gráfico da Viscosidade x Taxa de cisalhamento das microemulsões.

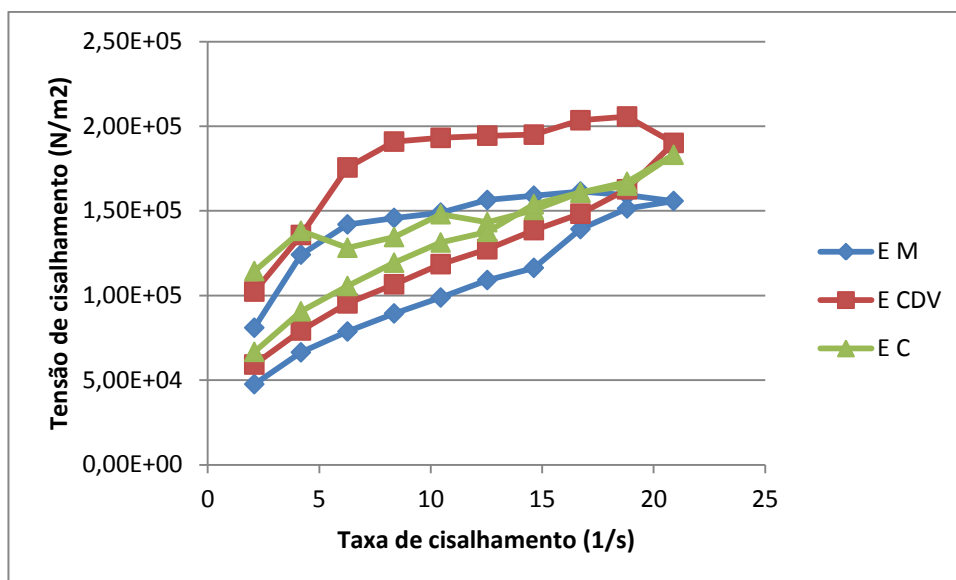


Figura 18 – gráfico da Tensão de cisalhamento x Taxa de cisalhamento das emulsões.

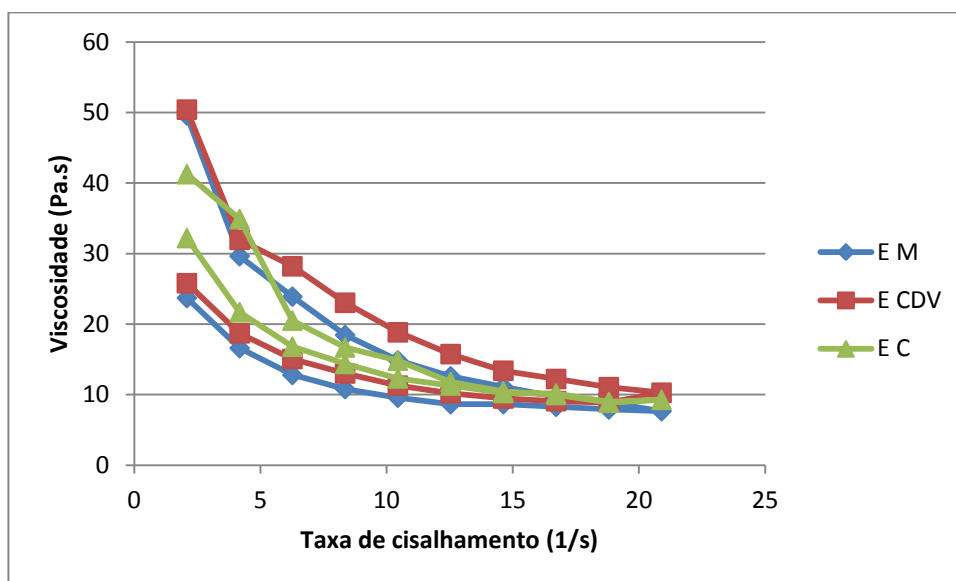


Figura 19 – gráfico da Viscosidade x Taxa de cisalhamento das emulsões.

A viscosidade é importante na obtenção de informações sobre forma, tamanho e grau de hidratação das micelas (ROSSI, 2007). As microemulsões são conhecidas por apresentarem baixo valor de viscosidade. De modo geral, o aumento da viscosidade tende a diminuir a taxa de liberação do fármaco, por aumentar a rigidez da estrutura (TSAI, 2010).

Os dados de viscosidade apresentados na Tabela 6, mostram os valores das microemulsões e das emulsões.

Tabela 6 – valores de viscosidade das preparações.

Formulação	Viscosidade (mPa.s)
F4	38,9
F4CDV	40,3
F4C	40,4
F4M	39,4
F5	44,4
F5CDV	40,7
F5C	34
F5M	33,8
E	11.920
ECDV	11.130
EC	11.810
EM	12.128

4.3 Determinação da solubilidade do fármaco em tampão 7,4

O objetivo de se avaliar a solubilidade do fármaco em diferentes solventes é determinar, dentre eles, qual representa a melhor alternativa para ser utilizada como solução receptora nos ensaios de liberação e permeação. Tal solvente deve permitir uma boa solubilização do fármaco, garantir as condições *sink* e possuir características semelhantes ao sangue, para mimetizar, da melhor maneira possível, as condições fisiológicas para a permeação. Considera-se como condição *sink*, 3 a 10 vezes o volume de solvente necessário para obtenção de uma solução saturada do fármaco em questão (STORPIRTIS et al., 2009). Além das condições *sink*, deve o

meio receptor ser biorrelevante, ou seja, capaz de simular ao máximo, as condições observadas *in vivo* (AULTON, 2005).

Os ensaios de solubilidade do cidofovir em tampão fosfato pH 7,4 foram realizados em espectrofotometria UV. Os valores de solubilidade do fármaco foram obtidos a partir da equação da reta representada na figura 20.

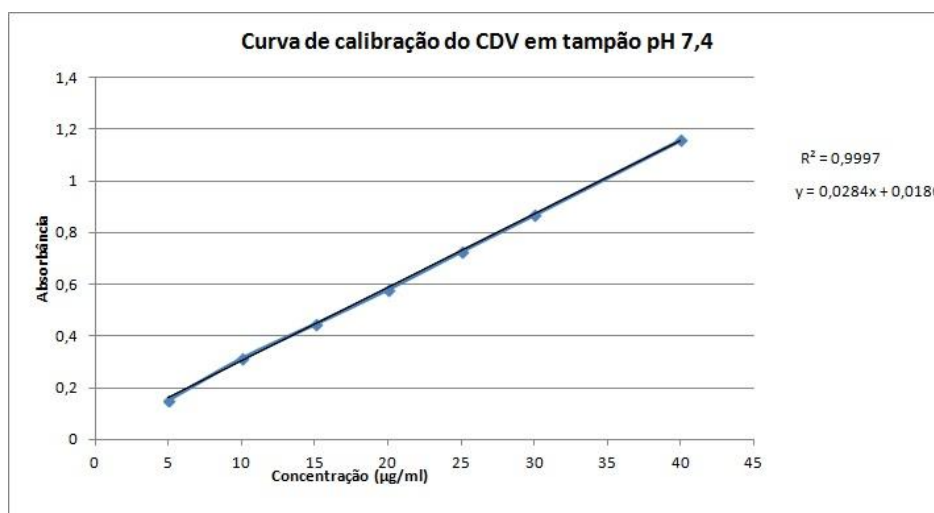


Figura 20 – curva de calibração do cidofovir em solução tampão pH 7,4.

A solução receptora selecionada para os estudos de liberação e permeação *in vitro* foi o tampão fosfato pH 7,4, pois permitiu uma solubilidade adequada do fármaco ($24,60 \text{ mg/mL} \pm 0,6974$), obedecendo a condição *sink* para o volume do meio receptor e quantidade de fármaco utilizado nos ensaios.

4.4 Avaliação da recuperação do cidofovir na pele

A recuperação traduz a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas (ANVISA, 2003).

Como descrito no item 3.8, foi avaliada a recuperação do fármaco adicionado às fitas, para a retirada do EC, e aos fragmentos de derme e epiderme suína. Os resultados foram expressos em percentual de cidofovir recuperado e estão apresentados na Tabela 7 .

Tabela 7 – Recuperação do cidofovir no estrato córneo e na Derme e epiderme.

	Concentração (µg/mL)					
	2,0 µg/mL (n= 3)			8,0 µg/mL (n= 3)		
	Concentração (µg/mL)	CV	Recuperação (%)	Concentração (µg/mL)	CV	Recuperação (%)
EC	1,945	5,30	98,937	7,643	3,37	95,544
DE	1,978	2,79	97,297	7,919	2,16	98,996
Sol. padrão	1,998	-	-	7,979	-	-

Se um padrão interno é utilizado, a sua recuperação deve ser determinada de forma independente no nível de concentração utilizada no método. A recuperação do padrão interno deve estar dentro de 15% do que a determinada para o analito. (CAUSON, 1997). Sendo assim, os resultados mostram que os valores de extração do fármaco na pele de orelha de porco estão de acordo com os limites estabelecidos.

4.5 Estudo de liberação *in vitro*

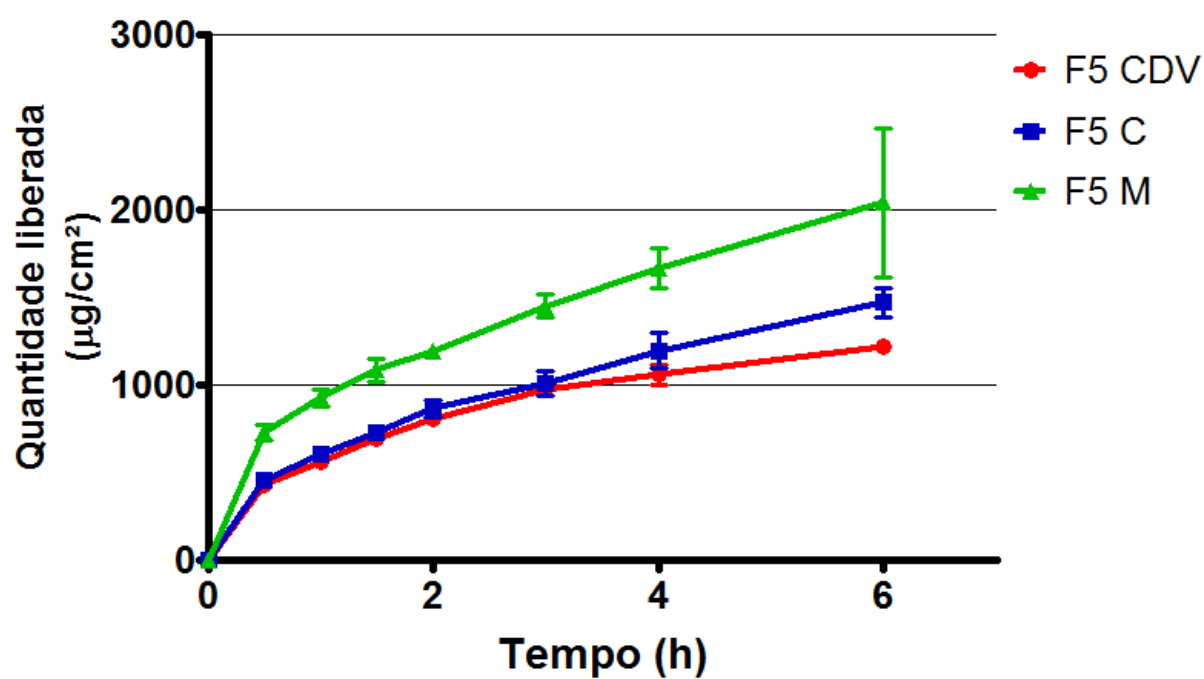
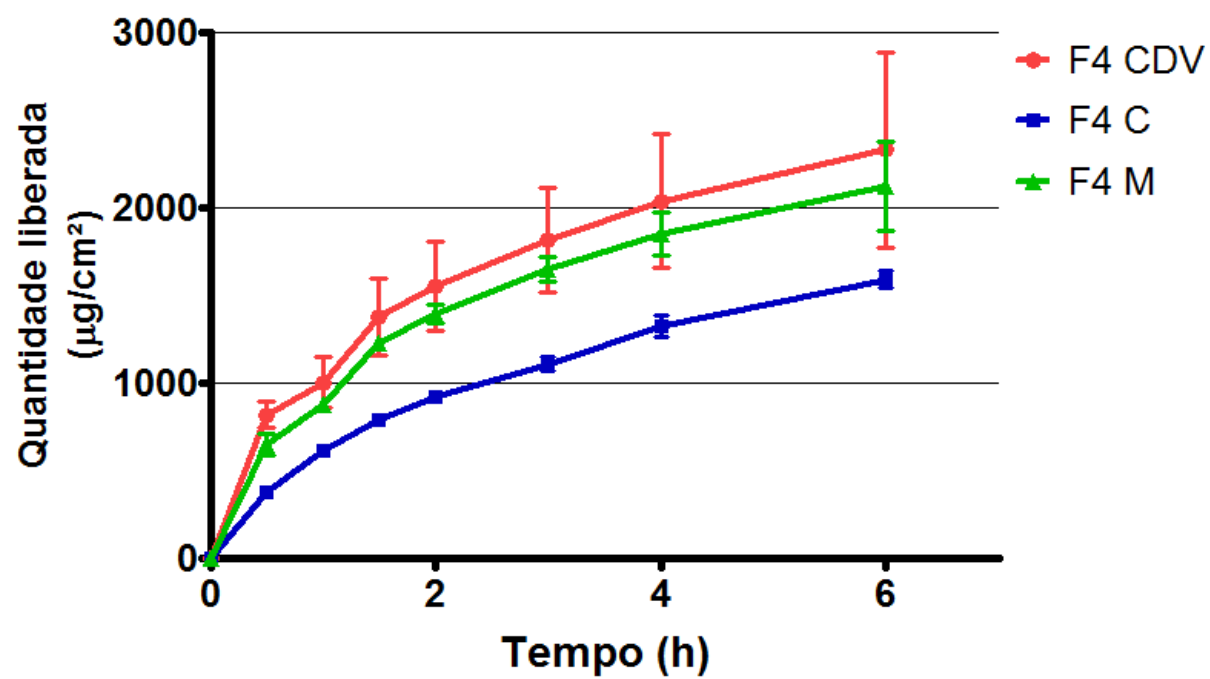
Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados em células de Franz, utilizando membranas sintéticas de celulose. A membrana utilizada é considerada não limitante, ou seja, não controla o transporte dos compostos através dela (HELLEDI, SCHUBERT, 2001).

Na tabela 8 e no gráfico abaixo (figura 21) é possível observar o perfil de liberação de cada formulação após 6 horas. Observa-se que não há diferença

estatisticamente significativa nas quantidades liberadas entre as formulações, após tratamento estatístico por ANOVA no intervalo de confiança de 95% ($F_{\text{calculado}} 1,591 < F_{\text{tabelado}} 2,019$). Na tabela também se observa que após a realização da regressão linear da concentração liberada em função da raiz quadrada do tempo, os valores dos coeficientes de correlação apresentam-se mais próximos de 1, demonstrando que as formulações seguem o modelo cinético de Higuchi, ou seja, a difusão é controlada pelo sistema.

Tabela 8 – valores de quantidade liberada, taxa de liberação e coeficiente de determinação.

Formulação	Quantidade liberada após 6h (µg)	Taxa de liberação (µg/cm²/h)	Modelo cinético	Coeficiente de determinação (r²)
F4 CDV	983,025	752,32	Higuchi	0,9999
F4 C	1267,78	658,64	Higuchi	0,9944
F4M	2120,51	699,33	Higuchi	0,9967
F5 CDV	1097,99	393,39	Higuchi	0,9957
F5 C	1694,73	594,01	Higuchi	0,9859
F5 M	1624,17	814,58	Higuchi	0,995
E CDV	1674,22	713,18	Higuchi	0,9925
EC	802,02	301,49	Higuchi	0,9937
EM	825,71	307,41	Higuchi	0,9868



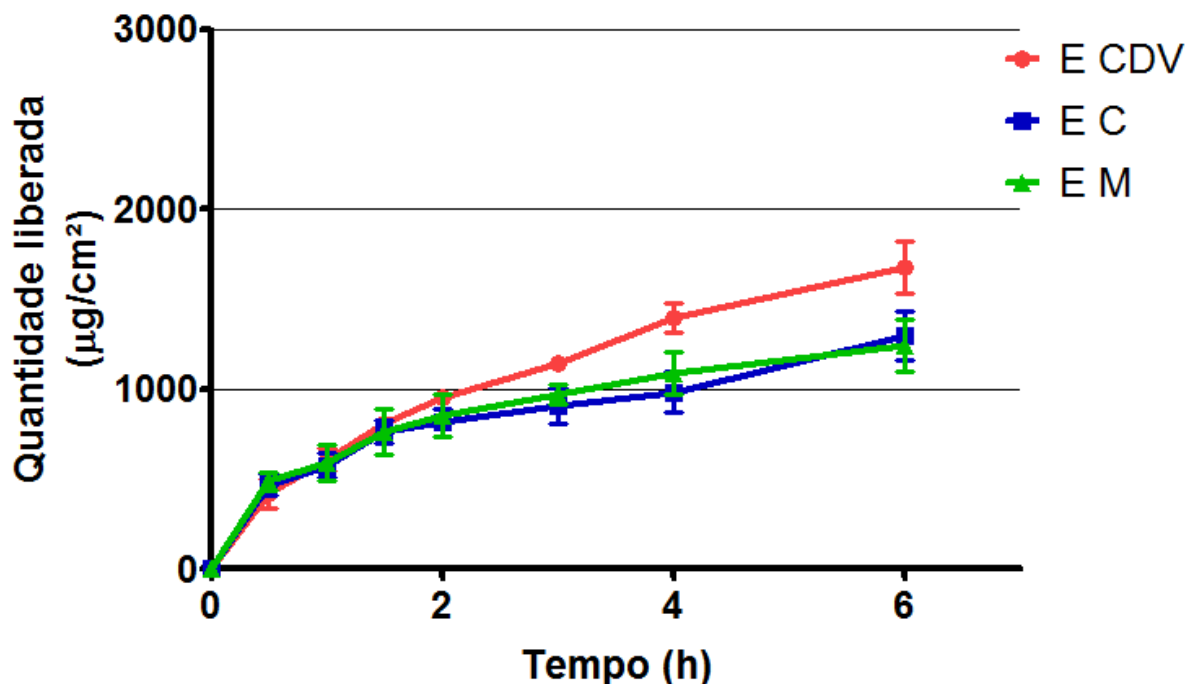


Figura 21 – perfil de liberação *in vitro* das formulações estudadas.

4.6 Estudo de permeação cutânea

A permeação de compostos através da pele tem sido um desafio, já que a pele constitui uma barreira efetiva, representando assim, a primeira defesa física e biológica do organismo (BOS e MEINARDI, 2000). A principal barreira para absorção de fármacos através da pele é o estrato córneo, que com apenas alguns micrômetros de espessura, funciona como o fator limitante para penetração/permeação de fármacos de características físico-químicas e massa molecular diferente. De maneira geral, fármacos lipofílicos têm sua penetração no estrato córneo facilitada comparando-se aos hidrofílicos, que se utilizam também de rotas alternativas na pele, como glândulas e folículos pilosos. A massa molecular é outro fator limitante à penetração de compostos (LOPES, 2005).

Comparando as quantidades permeadas das diversas formulações (figura 22) (tabela 9) observa-se que há diferença estatisticamente significativa entre as elas

(Tabela 10) no intervalo de confiança de 95%, sendo as microemulsões F5C e F5M as que apresentaram maior quantidade permeada através da pele. por ambas as formulações não traz nenhum benefício para o paciente, considerando o local de ação a que se destinam as formulações contendo o cidovir para aplicação tópica. Além do vírus possuir tropismo pela epiderme viável, nas camadas celulares basais da epiderme (SOUTO, 2005; STANLEY, 2008) e ao potencial nefrotóxico do cidofovir (ZABAWSKI, 2000; HOLÝ, 2006; NETO, 2007).

Tabela 9 – valores de quantidade liberada e fluxo.

Formulação	Quantidade permeada após 24h (µg)	Fluxo (µg/cm²/h)
F4 CDV	82,2465	3,193
F4 C	65,2080	2,459
F4M	95,7060	3,656
F5 CDV	80,700	3,103
F5 C	169,464	6,430
F5 M	443,022	17,220
E CDV	131,1285	5,062
EC	77,0025	2,903
EM	57,048	2,183

Tabela 10 – Tratamento estatístico (one-way ANOVA) dos resultados da permeação *in vitro* das formulações.

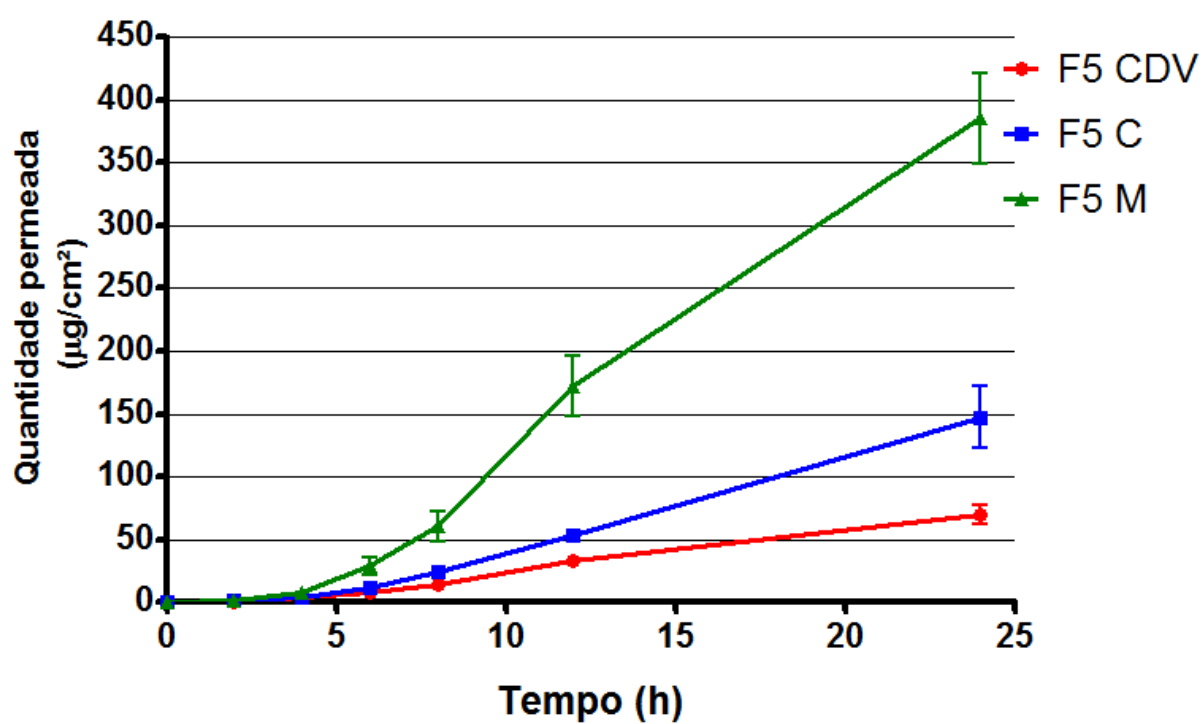
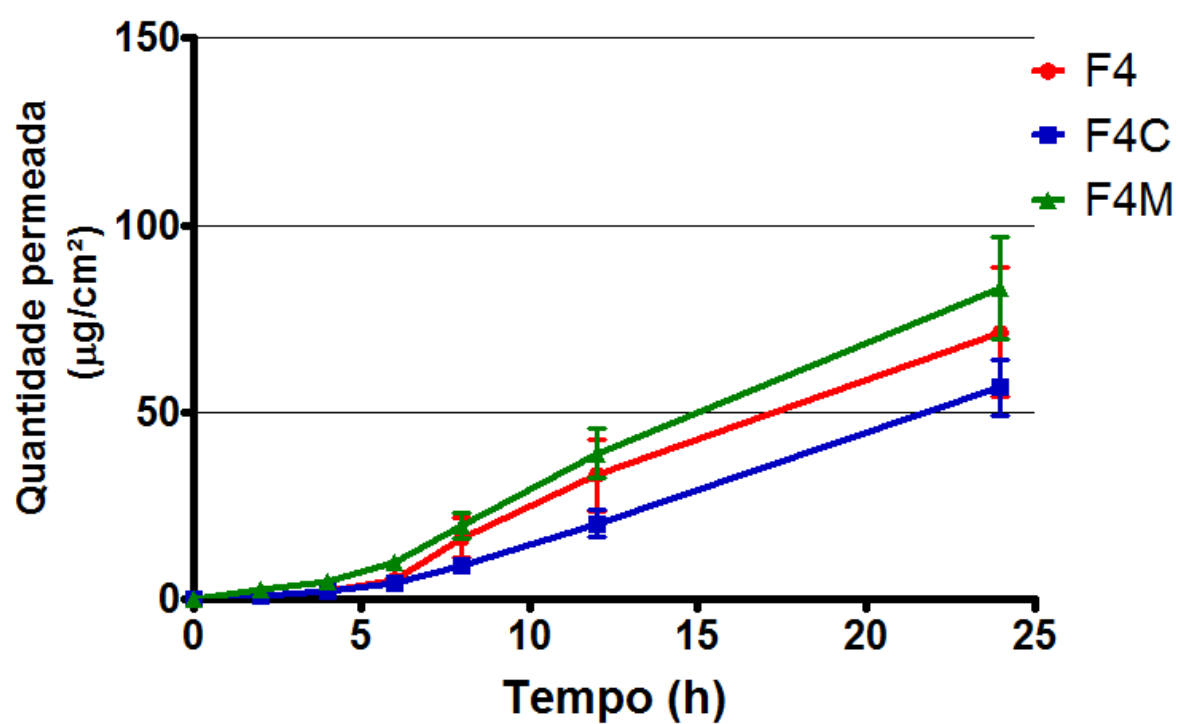
FORMULAÇÃO	SIGNIFICÂNCIA (P < 0,05)
F4 CDV vs F4C	Não
F4 CDV vs F4M	Não
F4 CDV vs F5	Não
F4 CDV vs F5C	Sim
F4 CDV vs F5M	Sim
F4 CDV vs CREME	Sim
F4 CDV vs CREME C	Não
F4 CDV vs CREME M	Não
F4C vs F4M	Não
F4C vs F5 CDV	Não
F4C vs F5C	Sim
F4C vs F5M	Sim
F4C vs CREME	Sim
F4C vs CREME C	Não
F4C vs CREME M	Não
F4M vs F5 CDV	Não
F4M vs F5C	Sim
F4M vs F5M	Sim
F4M vs CREME CDV	Não
F4M vs CREME C	Não
F4M vs CREME M	Não
F5 vs F5C	Sim
F5 CDV vs F5M	Sim
F5 CDV vs CREME	Sim
F5 CDV vs CREME C	Não
F5 CDV vs CREME M	Não
F5C vs F5M	Sim
F5C vs CREME CDV	Não
F5C vs CREME C	Sim
F5C vs CREME M	Sim
F5M vs CREME CDV	Sim
F5M vs CREME C	Sim
F5M vs CREME M	Sim
CREME CDV vs CREME C	Sim
CREME CDV vs CREME M	Sim
CREME C vs CREME M	Não

Existem também diferenças estatisticamente significativas entre as formulações microemulsionadas e emulsionadas nas quantidades recuperadas de CDV presentes no estrato córneo, pois observou-se que as formulações microemulsionadas contendo o promotor de permeação cineol, são as que apresentaram maior quantidade do fármaco nessa camada da pele (figura 23), independente da concentração de tensoativo presente na formulação (40 ou 60%).

Na distribuição do cidofovir na epiderme e derme também foram observadas algumas diferenças estatisticamente significante entre as formulações. As formulações F4, F4M e F4C proporcionaram maior retenção na camada dérmica, o que pode ter ocorrido em virtude da maior concentração de tensoativos presente. A incorporação de ambos os promotores de absorção, apesar de aumentaram a quantidade de cidofovir retida, não foram suficientes aumentá-la de forma significativa em relação à formulação F4 (figura 24).

Em estudos clínicos bem sucedidos, realizados anteriormente em diversos países, para o tratamento do HPV vaginal, foram utilizadas formas farmacêuticas emulsionadas do cidofovir a 1% a partir do Vistide® (STRAGIER, 2002; GEERINCK, 2001). Considerando que as formulações F4 CDV, F4C e F4M apresentaram uma retenção na epiderme e derme de 2 a 3 vezes maior que a preparação emulsionada desenvolvida por Melo, 2012, é possível supor que estas formulações microemulsionadas podem ser consideradas mais eficazes que aquelas emulsionadas. No entanto, para nos certificarmos de tal afirmação será necessária a realização de um estudo clínico em pacientes com HPV, de preferência imunodeprimidos.

Ao mesmo tempo, considerando o alto teor de tensoativos presentes nestas formulações, será necessária a avaliação do seu potencial irritante, utilizando métodos alternativos para então selecionar a formulação mais segura para a finalizada a que nos propomos seja utilizando ou não um agente promotor de permeação.



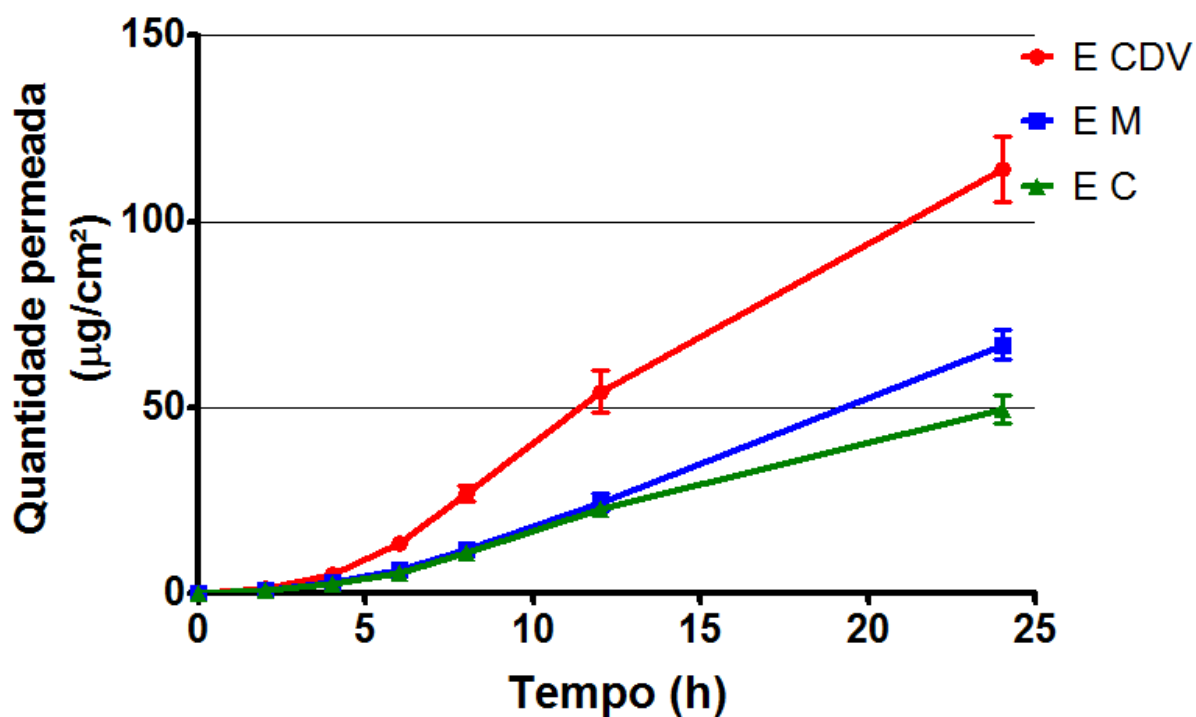


Figura 22 – perfil de permeação cutânea *in vitro* das formulações.

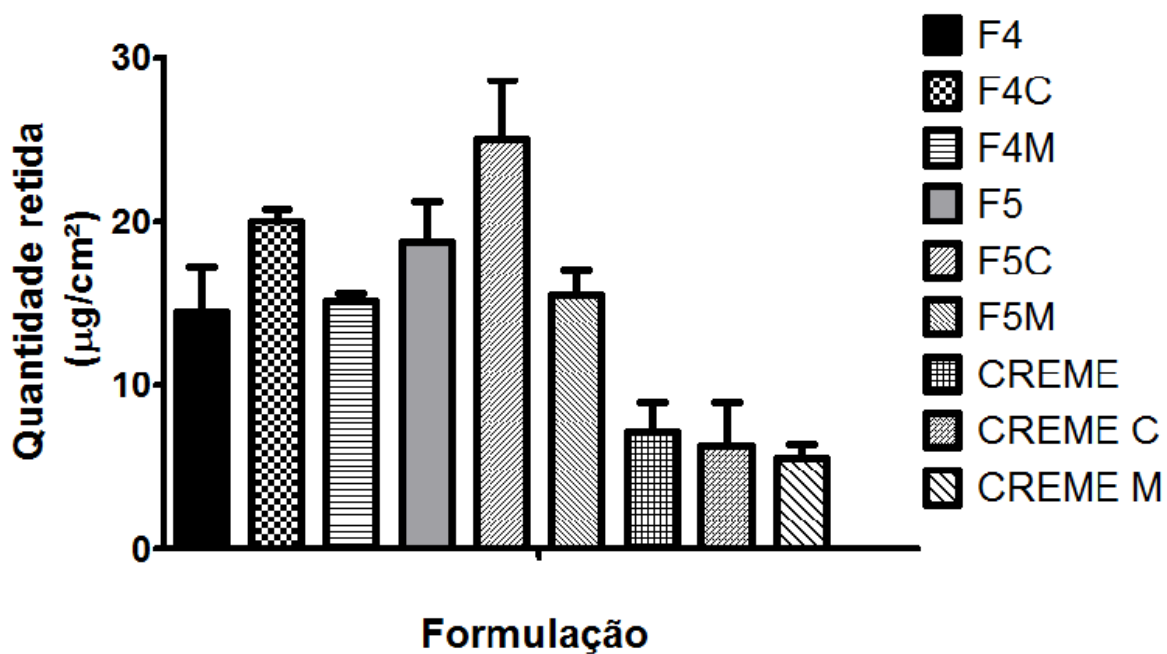


Figura 23 – Distribuição do CDV no estrato córneo da pele de orelha de porco.

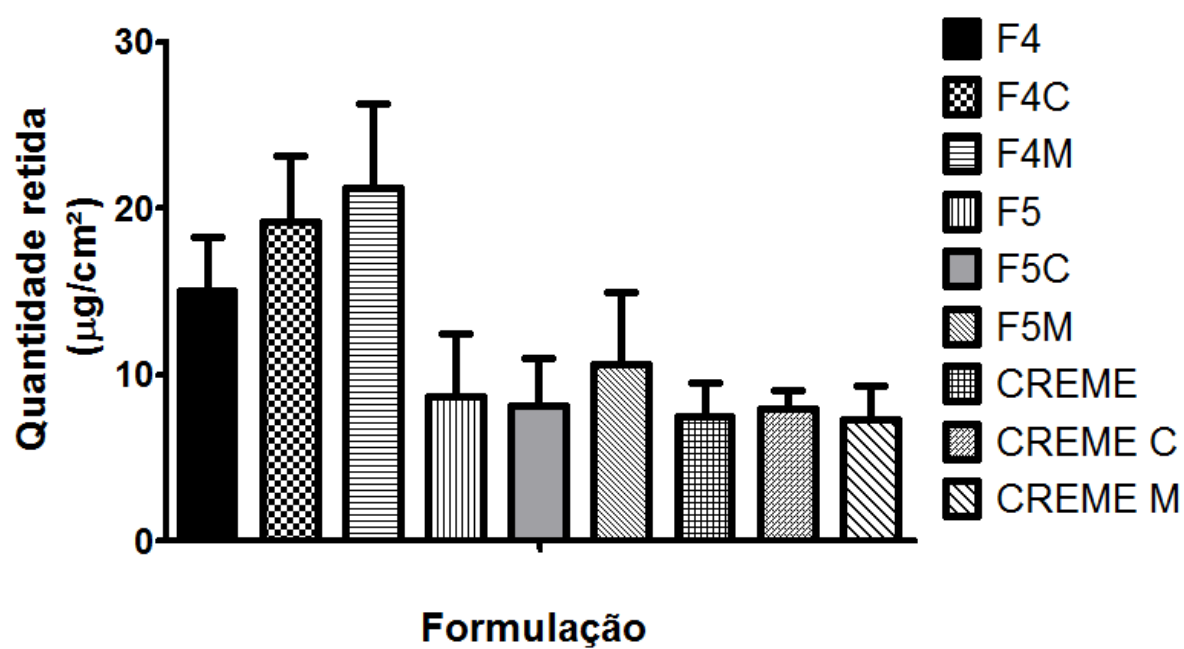


Figura 24 – Distribuição do CDV na epiderme e derme da pele de orelha de porco.

5. CONCLUSÃO

5. Conclusões

- Foi possível realizar a caracterização físico-química das microemulsões desenvolvidas contendo o cidofovir e adicionadas ou não de promotores de permeação, através das técnicas utilizadas.
- Após estudo de liberação *in vitro* utilizando membrana artificial foi observado que não existe diferença estatisticamente significativa na quantidade de cidofovir liberada a partir das formulações emulsionadas e microemulsionadas, apresentando, todas elas, o mesmo modelo cinético (Higuchi)
- Os promotores de permeação utilizados contribuíram significativamente para o aumento na quantidade de cidofovir permeado, independente da forma farmacêutica utilizada;
- As formulações microemulsionadas que apresentaram maior retenção na epiderme+ derme, continham maiores quantidades de tensoativo (60%), demonstrando a influência destes aditivos sobre o extrato córneo.
- A microemulsão desenvolvida F4M pode vir a ser uma boa alternativa para o tratamento do HPV anogenital, em detrimento de outras formas farmacêuticas clássicas, em virtude de uma maior retenção na (epiderme+derme).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALBRING, L.; BRENTANO, J. E.; VARGAS, V. R. A. O câncer do colo do útero, o Papilomavírus Humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas Guarani: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 2, p. 87-90, 2006.
- ANSEL, H.C.; ALLEN, L.V.; POPOVICH, N.G. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª Ed. São Paulo; Artmed, 2007.
- ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v.3, n.1, p.36-41, 2000.
- AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª edição. Artmed Editora, 2005.
- BARNES, H.A. Rheology of emulsions – a review. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 91, p. 89-95, 1994.
- BARRY, B.W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**. 1 ed. New York, Marcel Dekker, v.18, 1983.
- BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, 32 Suppl , S 16-24, 2005.
- BELLO, F. A.; ENABOR, O. O.; ADEWOLE, I. F. Human Papilloma Virus vaccination for control of cervical cancer: A challenge for developing countries. **African Journal of Reproductive Health**, v.15, n.1, p.25, 2011.
- BHATTI, A.S.; SCOTT, R.C.; DYER A. *In vitro* percutaneous absorption: pig epidermal membrane as a model for human skin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, p. 45, 1989.
- BOS, J.D., MEINARDI, M.M.H.M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. **Experimental Dermatology**, v.9, p.165-169, 2000.
- BOUWSTRA, J.A.; HONEYWILL-NGUYEN, P.L.; GOORIS, G.S.; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, p. 1-36, 2003.
- BRASIL. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, ANVISA. **RE nº 899 de 29 de maio de 2003**.
- BROWN, D. R.; FIFE, K. H. Human papillomavirus infections of the genital tract. **Medical Clinics of North America**, 74:1455-85, 1990.
- BURGESSON, R.E.; CHRISTIANO, A.M. The dermal–epidermal junction. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p.651–658, 1997.

CARMO, F.A. **Preparo e Avaliação de Formulações Transdérmicas de Doxazosina Para o Tratamento da Hiperplasia Prostática Benigna**, 2011. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CARVALHO, A. L. M. **Cinética de difusão in vitro e atividade in vivo de preparações magistrais de cetoprofeno**. 2007, 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

CARVALHO, J. J. M. Papilomavírus humano. In: Carvalho JJM. **Manual prático do HPV: papilomavírus humano**, São Paulo: Instituto Garnet, p.13-4, 2004.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v.689, n 1, p. 175-180, 1997.

CHANG, F. Role of papillomaviruses. **Journal of Clinical Pathology**, 43: 269-76, 1990.

CHIEN, Y.W. **Novel drug delivery systems**. 2 ed. New York, Marcel Dekker, v.50. 1992.

COELHO, L.C.S. **Protetor solar: desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da eficácia e segurança**. 2005, 110p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

COGGIN, J. R.; ZUR HAUSEN, H. Workshop on papillomavirus and cancer. **Cancer Research**, 39:545-6, 1979.

COHEN, B. A.; HONIG, P.; ANDROPHY, E. Anogenital warts in children. Clinical and virologic evaluation for sexual abuse (see comments). **Archives of Dermatology**, 126:1575-80, 1990.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.13, p.123-133, 2001.

CUNDY, K. C.; LYNCH, G.; LEE, W. A. Bioavailability and metabolism of cidofovir following topical administration to rabbits. **Antiviral Research**, v. 35, p. 113-122, 1997.

CUNDY, K.C.; LYNCH, G.; LEE, W. A. Intraocular distribution and metabolism of cidofovir (CDV) and cyclic-HPMPC (CYC) following intravitreal administration to New Zealand white rabbits (abstract). **Program and Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**, September 17-20, 1995, San Francisco, CA, American Society of Microbiology (electronic version). Abstracts-On-Disk(R), Marathon Multimedia, Northfield, MN.

DE CLERCQ, E. Antivirals for the treatment of herpesvirus infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 32(suppl A), p. 121-132, 1993.

DE CLERCQ, E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. **Antiviral Research**, v. 55, p. 1-13, 2002.

DE CLERCQ, E. The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: historical perspective. **Antiviral Research**, v. 75, p. 1-13, 2007.

DE VILLERS, E. M. Heterogeneity of the human papillomavirus group. **Journal of Virology**, 63:4898-903, 1989.

DEGIM, I.T.; USLU, A.; HADGRAFT, J.; ATAY, T.; AKAY, C.; CEVHEROGLU, S. The effects of azone and capsaicin on the permeation of naproxen through human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, p. 21-25, 1999.

DERCHAN, S. F. M.; SARIAN, L. O. Z. Vacinas profiláticas para o HPV. **Revista Brasileira de Ginecologia e obstetrícia**, v.29, n.6, p.281-284, 2007.

DIXIT, R.P.; NAGARSENKER, M.S.; Optimized microemulsions and solid microemulsion systems of simvastatin: characterization and in vivo evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 12, p. 4892 – 4902, 2010.

DUAN, J.; PARIS, W.; MARTE, J.; ROOPCHAND, D.; FLEET, T. L.; CORDINGLEY, M. G. Topical effects of cidofovir on cutaneous rabbit warts: treatment regimen and inoculum dependence. **Antiviral Research**, v.46, p. 135-144, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª ed, v. 1. Brasília, ANVISA, 2010.

FORMARIZ, T.P. **Formulação e Caracterização Físico-química e Biofarmacêutica de Microemulsões Lipídicas Contendo Doxorubicina**, 2008, 203 f., Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; JÚNIOR, A.A.S.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 03, p. 301 -313, 2005.

FREITAS, C., MULLER, R.H. **Spray-drying of solid lipid nanoparticles**. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.46, n. 2, p. 145-151, 1998.

FREITAS, Z.M.F. **Avaliação Biofarmacotécnica de Formulações Dermatológicas Semi-Sólidas de Cetoconazol**. 2005. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FUENZALIDA, C.; HÉCTOR ESPINOZA, P. Actualización en verrugas genitales externas: diagnóstico, clasificación y tratamiento. **Revista chilena de dermatología**, 23(2), 126-133, 2007.

GASCO, M.R.; GALLARTE, M.; PATTARINO, F. In vitro permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 10, p. 193-196, 1991.

GENNARO, A.R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GISSMANN, L.; ZUR HAUSEN, H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condiloma acuminata). **International Journal of Cancer**, 25:605-9, 1980.

GORDON, L.F. **Fundamental Concepts of in vitro Release**. AAPS-FDA Workshop on Assessment of Value Applications of in vitro Release Testing of Topical Dermatological Drug Products, 1997.

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

HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.2, p. 311-330, 1994.

HELLEDI, L.S., SCHUBERT, L. Release kinetics of acyclovir from a suspension of acyclovir incorporated in a cubic phase delivery system. **Drug Development Industrial Pharmacy**, v.27, n.10, p.1073-1081, 2001.

HENGGE, U. R.; TIETZE, G. Successful treatment of recalcitrant condyloma with topical cidofovir (letter). **Sexually Transmitted Infections**, v. 76, p. 143, 2000.
HIGGINS, G. Unique agent under development for CMV infection. **Inpharma**, v.967, p. 9-10, 1994.

HOATH, S.B.; LEAHY, D.G. The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality. **Human Epidermis Organization**, v. 121, n. 6, p. 1440-1446, 2003.

HOLÝ, A. Antiviral acyclic nucleoside phosphonates structure studies. **Antiviral Research**, v. 71, p. 248-253, 2006.

JACOBSEN, T.; SIFONTIS, N. Drug interactions and toxicities associated with the antiviral management of cytomegalovirus infection. **American Journal Health-System Pharmacy**, v. 67, p. 1417-25, 2010.

JAIN, J.; FERNANDES, C.; PATRAVALE, V. Formulation development of parenteral phospholipid-based microemulsion of etoposide. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 11, n. 2, p.826-831, 2010.

JIANG, S.J.; ZHOU, J.X. Examination of the mechanism of oleic acid-induced percutaneous penetration enhancement: an ultrastructural study. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 66-68, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995. p. 301-312.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, F. **Histologia Básica**. 9ª edição. Guanabara Koogan S.A. 1999.

KALIA, Y.; PIROT, F.; GUY, R. Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum in vivo, **Biophysical Journal**, v. 71, p. 2692–2700, 1996.

KAMILA, M.M.; MONDAL, N.; GUPTA, B.K.; GOSHI, L.K. Preparation, characterization and in vitro evaluation of Sunflower oil-Tween 80-Glycerol based microemulsion formulation of a BCS class-II drug. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, p. 621-627, 2009.

KAPLUN-FRISCHOFF, Y.; TOUITOU, E. Testosterone Skin Enhancement by Menthol Though Formation of Eutectic with Drug and Interaction with Skin Lipids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.86, p. 1394-1399, 1997.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.123-126, p.369-385, 2006.

KREILGAARD, M.; PEDERSEN, E.J.; JAROSZEWSKI, J.W. NMR characterization and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. **Journal of Controlled Release**, v. 69, p. 421–433, 2000.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbekian, v. 2, 2001.

LALEZARI, J. P.; DREW, W.L.; GLUTZER, E. Treatment with (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine of acyclovir-resistant mucocutaneous infection with herpes simplex virus in a patient with AIDS. **Journal of Infectious Diseases**, v.170,p.570-572,1994.

LAWRENCE, M.J.; RESS, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p.89-121, 2000.

LE HIR, A. **Noções de farmácia galênica**. 6.ed. São Paulo, Andrei, 1997.

LI, G. L.; DANHOF, M.; BOWSTRA J.A. Iontophoretic delivery of apomorphine *in vitro*: physicochemic considerations. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 11, p. 1509-1513, 2001.

LIRA, A. A. M.; SESTER, E. A.; CARVALHO, A. L. M.; STRATTMANN, R. R.; ALBUQUERQUE, M. M.; WANDERLEY, A. G.; SANTANA, D. P. Development of lapachol formulation: anti-inflammatory study of a selected formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 163-168, 2008.

LOPES, L.B. **Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídicos: avaliação in vitro e in vivo de sistemas de liberação e moléculas carreadoras.** 2005, 198f., Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

LOWY, D. R.; SCHILLER, J.T.; Prophylactic human papillomavirus vaccines. **Journal of Clinical Investigation**, 116(5):1167-73, 2006.

MADDEN, K.; NAN, X.; BRIONES, R.; WARKS, L. Sorting through search results: A content analysis of HPV vaccine information online. **Vaccine**, doi: 10.1016/j.vaccine.2011.10.025, 2011.

MAGHRABY, G.M.E. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: Effects of cosurfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, p. 285–292, 2008.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de Medicamentos Fundamentos, Aplicações, Aspectos Regulatórios e Perspectivas na Área Farmacêutica**, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F.; Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, p. 35-54, 2002.

MATHUR, V.; SATRAWALA, Y.; RAJPUT, M.S. Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v.4, n.3, p.173-183, 2010.

MATTEELLI, A.; BELTRAME, A.; GRAIFEMBERGHI, S.; FORLEO, M. A.; GULLETTA, M.; CIRAVOLO, G. Efficacy and tolerability of topical 1% cidofovir cream for the treatment of external anogenital warts in HIV-infected persons. **Sexually Transmitted Infections**, v.28, p. 343-6, 2001.

MATTHEWS, R. E.F. Classification and nomenclature of viruses. **Intervirology**, 17:1-199, 1982.

MEDI, B.M.; SINGH, J. Eletronicly facilitated transdermal delivery of human parathyroid hormone. **International Journal of Pharmarmaceutics**, v. 263, p. 25-33, 2003.

MEIDAN, V.M.; BONNER, M.C.; MICHINIAK, B.B. Transfollicular drug delivery – is it a reality? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 306, p. 1-14, 2005.

MELO, E.K.S. **Caracterização e Estudos de Liberação e Permeação Cutânea *in vitro* de Preparações Tópicas do Cidofovir.** 2012, 98f., Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MOREIRA, T.S. **Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Transdérmicos para o Antiinflamatório Lumiracoxibe: Obtenção, Avaliação Físico-química e Estudos de Permeação *in vitro* em Pele de Modelo Animal.** 2008, 182f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MOSCICKI, A. B. Human papillomavirus infection in adolescents. **Pediatric Clinics of North America**, 46:783-807, 1999.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.52, n. 2, p.103-112, Set. 2001.

MULLER, R.H., MAANSSEN, S., WEYHERS, H., MEHNERT, W. Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. **Journal of Drug Targeting**, v. 4, n. 3, p. 161-170, 1996.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; CASTELLSAGUÉ, S. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. **International Journal of Cancer**, 111(2):278-85, 2004.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; SAN JOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, S.; SHAH, K. V. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, 348:518-27, 2003.

NAIK, A.; PECHTOLD, L.A.R.M.; POTTS, R.O.; GUY, R.H. Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement en *in vivo* in humans. **Journal of Controlled Release**, v. 58, p. 606-611, 2004.

NAOUI, W.; BOLZINGER, M.-A.; FENET, B.; PELLETIER, J.; VALOUR, J.-P. ; KALFAT, R.; CHEVALIER, Y. Microemulsion Microstructure Influences the Skin Delivery of an Hydrophilic Drug. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 7, p. 1683-1695, 2011.

NETO, R.; OLIVEIRA, G.; PESTANA, M. Nefrotoxicidade dos Antivíricos. **Acta Médica Potuguesa**, v. 20, p. 59-63, 2007.

NEYTS, J.; DE CLERCQ, E. Mechanism of action of acyclic nucleoside phosphonates against herpes virus replication. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, p. 39-41, 1994.

OECD, **Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies**, Paris, 2004.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, L. H. S.; RODRIGUES, E. V. M.; LOPES, A. P. T. A. S. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 genes. **São Paulo Medical Journal**, v. 121, n. 2, p. 67-71, 2003.

PINTO, P. A.; MELLINGER, B. C. HPV in the male patient. **Urologic Clinics of North America**, 26, 797-807, 1999.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5ª ed.v. 1, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F.; OLIVEIRA, E. Z.; ALDRIGHI, J. M.; MARIANO NETO, C. Serological detection of anti HPV 16/18 and its association with pap smear in adolescents and young women. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 52:43-7, 2006.

RAWLINGS, A.V., HARDING, C.R. Moisturization and skin barrier function. **Dermatology Therapy**, v.17, p. 43-48, 2004.

RIBEIRO, C. Cosmetologia aplicada a dermocosmética. 2ª edição, São Paulo, Pharmabooks, 2010.

RIBEIRO, H.M.; MORAIS, J.A.; ECCLESTON, G.M. Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetylalcohol/nonionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 26, p. 47-59, 2004.

RINGSTROM, E.; PETERS, E.; HASEGAWA, M.; POSNER, M.; LIU, M.; KELSEY, K. T. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clinical Cancer Research**, 8:3187-92, 2002.

ROSSI, C.G.F.T.; DANTAS, T.N.C.; NETO, A.A.D.; MACIEL, M.A.M. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural de Seropédica Ciências Exatas e da Terra**, v. 26, n.1-2, p. 45-66, 2007.

SANTIS, A.K. **Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo Nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica**. 2008, 156f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SANTOYO, S.; JALÓN, E.G.; CAMPANERO, M.A.; YGARTUA, P.; Determination of cidofovir in both skin layers and percutaneous penetration samples by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 5, p. 819-826.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S.S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 3, p. 501-505, 2003.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P.E.; JERONIMO, J.; RODRIGUEZ, A.C.; WACHOLDER, S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, 370 (9590), 890-907, 2007.

SCHIFFMANN, M. H.; BRINTON, L. A. The epidemiology of cervical carcinogenesis. **Cancer**, 76:1888-901, 1995.

SCULLY, C.; PRIME, S. S.; MAITLAND, N. J. Papillomaviruses: their possible role in oral disease. **Oral Surgery**, 60:166, 1985.

SEDLACEK, T. V.; LINDHEIM, S.; EDER, C.; HASTY, L.; WOODLAND, M.; LUDOMIRSKY, A. Mechanism for human papillomavirus transmission at birth. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 161:55-59, 1989.

SEZER, A.D. **Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems**, 1ª ed. In Tech, Rijeka, Croácia, 2012.

SHERIDAN, R.L.; TOMPKINS, R.G. Skin substitutes in burns. **Burns**, v. 25, n. 2, p. 97-103, 1999.

SILVA, F. C. F. **Padronização de métodos analíticos para a determinação de filtros solares em emulsões**. 2000. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, J.A. **Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados**. 2008, 205f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31. n3, p.125-131, 2010.

SIMONETTI, L.D.; GELFUSO, G.M.; BARBOSA, J.C.; LOPEZ, R.F. Assessment of the percutaneous penetration of cisplatin: the effect of monoolein and the drug skin penetration pathway. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n.1, p. 90-94, 2009.

SINHA, V. R.; KAUR, M. P. Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.26 n. 11, p. 1131-1140, 2000.

SINTOV, A.C.; BOTNER, S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, p. 55–62, 2006.

SMITH, E. M.; RITCHIE, J. M.; YANKOWITZ, J.; WANG, D.; TUREK, L. P.; HAUGEN, T. H. HPV prevalence and concordance in the cervix and oral cavity of pregnant women. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, 12:45-56, 2004.

SMITH, E.W.; MAIBACH, H.I. **Percutaneous Penetration Enhancers**, CRC Press, Florida, 1995.

SNOECK, R.; ANDREI, G.; GERARD M. Successful treatment of progressive mucocutaneous infection due to acyclovir- and foscarnet-resistant herpes simplex virus with (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine (HPMPC). **Clinical Infectious Diseases**, v.18, p. 570-578, 1994.

SNOECK, R.; BOSSENS, M.; PARENT, D. Phase II double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of cidofovir topical gel for the treatment of patients with human papillomavirus infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 597-602, 2001.

SOUTO, R.; FALHARI, J.P.B.; CRUZ, A.D. The Human papillomavirus: a factor related with the formation of neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.2, p.155-160, 2005.

SOUZA,V.M. **Ativos dermatológicos: um guia dos novos ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação,para médicos e farmacêuticos**. São Paulo: Tecnopress, p. 214, 2003.

SPICILIN, P.; HOMAR, M.; VALANT, A.Z.; GASPERLIN, M. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 256, p. 65-73, 2003.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, v. 109, p. S15–S21, 2008.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES,J.E.; CHIANN,C.; GAI,M.N. Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 321, 2009.

SYRJÄNEN, K. J.; SYRJÄNEN, S. M. **Papillomavirus infections in human pathology**. 1ª ed.John Wiley & Sons Ltda, Inglaterra, 2000.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and predction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 227-258, 2004.

TALEGAONKAR, S.; AZEEM, A.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K.; PATHAN, S.A.; KHAN, Z.I. Microemulsion: a novel approach to enhanced drug delivery. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v.2, p. 238-257, 2008.

TENJARLA, S. Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug carrier Systems**, v.16, n.5, p. 461-521. 1999.

TSAI, Y.-H.; CHANG, J.T.; CHANG, J.-S.; HUANG, C.-T.; HUANG, Y.-B.; WU, P.-C. The effect of component of microemulsions on transdermal delivery of buspirone hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n.6, p. 2358-2365, 2011.

TSAI, Y.H.; HSIEH, Y.H; HUANG, Y.B.; CHANG, J.S.; HUANG, C.T.; WU, P.C. Microemulsions for intravesical delivery of gemcitabine. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 11, p. 1461-1465, 2010.

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

VAN DER GRAAF, Y.; MOLIJN, A.; DOORNEWAARD, H.; QUINT, W.; VAN DOORN, L. J.; VAN DEN TWEEL, J. Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. **American Journal of Epidemiology**, 156:158-64, 2002.

VERDIER-SEVRAIN, S.; BONTÉ, F. Skin hydration: a review on its molecular mechanism. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Malden, v. 6, n. 2, p. 75-82, 2007.

WACHSMAN, M.; PETTY, B. G.; CUNDY, K. C.; JAFFE, H. S.; FISHER, P. E.; PASTELAK, A.; LIETMAN, P. S. Pharmacokinetics, safety and bioavailability of HPMPIC (cidofovir) in human immunodeficiency virus-infected subjects. **Antiviral Research**, v. 29, p. 153-161, 1996.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal Pathology**, 189:12-15, 1999.

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

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Skin Absorption Enhancer. **Critical Review fo Therapy Drug Carrier System**, v. 9, p. 305-353, 1992.

YOSHPE, N. S. Oral and laryngeal papilloma: A pediatric manifestation of sexually transmitted disease?. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, 31:77-83, 1995.

YUAN, Y.; LI, S.M.; MO, F.; ZHONG, D.F. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, v.321, p. 117-123, 2006.

ZABAWSKI, E. J. A review of topical and intralesional cidofovir. **Dermatology Online Journal**, v. 6, p. 3, 2000.

APÊNDICE



Examination of *In Vitro* Release Kinetics of Cidofovir from Different Topical Dosage Forms by using Ultraviolet Spectrophotometry

Leila B. LEAL, Ellison N. LIMA, Elayne K.S. MELO,
Karoline S. BELÉM, Gustavo A. P. SANTOS, & Davi P. SANTANA

Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético – Universidade Federal de Pernambuco,
Rua Professor Arthur de Sá s/n, Cidade Universitária, CEP 50740-520, Recife, Pernambuco, Brasil.

SUMMARY. This study aimed to examine the *in vitro* release kinetic profiles of cidofovir from gels, emulsions, and microemulsion systems. The *in vitro* release kinetics was evaluated using Franz-type diffusion cells with cellulose acetate membrane and phosphate buffer (pH, 7.4) as a receiver solution. An ultraviolet (UV) spectrophotometry method was developed and validated to determine the cidofovir concentration in the samples from the receiver solution. The samples were analyzed using UV detection at 274 nm. The method was linear from 5.0 to 40.0 µg/mL. The coefficient of correlation was 0.999. The precision and accuracy (intra-day and inter-day) were less than 3%. This method was suitable for quantification of cidofovir released *in vitro* from gels, emulsions, and microemulsion samples. Our study showed that the pseudo-first-order kinetic model was the most suitable mathematical model to determine the *in vitro* release kinetic profile of all formulations.

INTRODUCTION

Cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonmethoxypropyl)cytosine; CDV] is a nucleoside analog drug with a broad antiviral spectrum, and it acts against different pathogens such as cytomegalovirus, human papillomavirus (HPV), herpes simplex virus, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, human herpes virus-6, human herpes virus-7, human herpes virus-8, poxvirus, polyomavirus, and adenovirus ¹.

Clinical use of CDV was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 1996 for treating retinitis caused by cytomegalovirus in patients with acquired immunodeficiency syndrome; CDV is commercially available as Vistide® solution for perfusion.

However, topical application of CDV is an effective alternative for the treatment of several viral lesions, particularly for the treatment of human papillomavirus-related lesions, namely, papillomas, common warts, plantar warts, and condyloma acuminata ²⁻⁴.

Studies performed in several countries have shown the clinical efficacy of CDV in different topical dosage forms such as gels, emulsions, and ointments in patients with HPV infection ^{2,4-7}. All these studies included CDV from Vistide® solution in an extemporaneous dosage form.

Analytical methods have been reported for the quantification of CDV. These methods include high-performance liquid chromatography (HPLC) with radiochemical or ultraviolet (UV) detection, liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), or hydrophilic interaction chromatography (HILIC) for quantification of CDV in biological samples ⁸⁻¹⁰.

This study aimed to evaluate the profiles of *in vitro* release kinetics of CDV from gels, emulsions, and microemulsion systems; therefore, we developed and validated an analytical method for determination of CDV in samples derived from these *in vitro* release kinetics assays.

KEY WORDS: Analytical method, Cidofovir, HPV, *In vitro* release kinetics.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: leila.leal@nudfac.com.br

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

The active pharmaceutical ingredient CDV was obtained from BoyleChem; lot no, BC20100625 (100.08%) (China); standard CDV was supplied by Sigma–Aldrich (United States); Carbopol® 940 and isopropyl myristate were purchased from Fragon (Brazil); emulsifying wax NF was purchased from Galena (Brazil); propylene glycol, isodecyl oleate, and ethanol were purchased from Vetec (Brazil); tri-ethanolamine was obtained from Codossal (Brazil); and polyethylene glycol 8 (PEG-8) capric/caprylic glycerides (Labrasol®) and polyglyceryl-6 dioleate (Plurol Oleique®) were purchased from Gattefossé (France).

Topical formulations

In this study, we used 2 microemulsions (ME 1 and ME 2); 1 emulsion (E); and 3 gels (G, GP, and GE); some of these formulations were prepared using chemical permeation enhancers. The permeation enhancers used were ethanol for GE and propylene glycol for GP. The preparations are shown in Table 1.

Preparation of topical formulations: gels, emulsions, and microemulsions

Gels were prepared by dispersing Carbopol® in water under mechanical stirring at speeds 550 rpm for 20 min. CDV was previously dissolved in water and incorporated into the formulation. During the preparation, propylene glycol was added to the GP formulation, and ethanol was added to GE. All the gels were neutralized using triethanolamine.

To prepare the emulsion, the aqueous phase

was poured into the oil phase at a temperature of 75 °C under agitation at 500 rpm. CDV was previously dissolved in water and incorporated into the formulation.

The microemulsions were obtained by mixing specific proportions of surfactant/co-surfactant (Labrasol® and Plurol Oleique®) with the oil phase (isopropyl myristate) and phosphate buffer under ultra-turrax stirring at room temperature (25 °C). These formulations are derived from pseudo-ternary diagrams previously developed by our research group 11. CDV (1%) was incorporated after formation of the microemulsion systems ME.

Each formulation remained stable for 48 h to be used in the validation and in vitro release kinetics experiment.

Determination of the apparent viscosity

The apparent viscosity of gels and emulsions was measured using a rotational viscometer (Rheology International, Shannon Ltd., Ireland) using spindle number 7 at a rotation speed of 50 rpm and a temperature of 25 °C. The apparent viscosity of microemulsions was determined using a rotational rheometer with a concentric cylinder, Searle type (Anton Paar, Austria).

Validation

The UV spectrophotometric method was validated following the Resolution RE nº 899/2003 of National Health Surveillance Agency (AN-VISA) 12 and International Conference on Harmonization (ICH) guidelines 13. We evaluated the linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), specificity, precision, and accuracy of the method.

Components	Formulations (%)					
	(G)	(GP)	(GE)	(E)	(ME 1)	(ME 2)
Cidofovir	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Carbopol® 940	1.2%	1.2%	1.2%	-	-	-
Emulsifying Wax NF	-	-	-	14%	-	-
Isodecyl oleate	-	-	-	3%	-	-
Isopropyl myristate	-	-	-	-	10%	10%
Propylene glycol	-	5%	-	5%	-	-
PEG-8 capric/caprylic glycerides (Labrasol®)	-	-	-	-	45%	30%
Polyglyceryl-6 dioleate (Plurol Oleique®)	-	-	-	-	15%	10%
Triethanolamine	qs	qs	qs	qs	-	-
Ethanol	-	-	5%	-	-	-
Phosphate buffer pH 7.4 to	-	-	-	-	100%	100%
Water distilled to	100%	100%	100%	100%	-	-

Table 1. Composition of gels and emulsion formulation. (G = gel without penetration enhancers, GP = gel with propylene glycol, GE = gel with ethanol, E = emulsion, ME 1 = microemulsion 1, ME 2 = microemulsion 2).

LOQ and LOD

To verify linearity, we used linear regression by the least squares method of the medium points of 3 curves in triplicate, using 7 of 5.0, 15.0, 10.0, 20.0, 25.0, 30.0, and 40.0 µg/mL of CDV in phosphate buffer pH 7.4. The coefficient of correlation (r^2) was obtained from linear regression. The LOD and LOQ values were determined according to the Resolution RE n° 899/2003 (ANVISA) ¹².

Specificity, Precision, Accuracy, and Robustness

Specificity was determined by scanning diluted solutions of gels and microemulsions in phosphate buffer (pH 7.4), emulsion in isopropanol, containing 1 % CDV, and their placebos using a spectrophotometer (Shimadzu UVmini-1249, Shimadzu, Japan; 200–400 nm). The precision of the method was determined by analyzing 6 replicates of the same concentration (20.0 µg/mL), and the intermediate precision was determined by analyzing 3 individual samples with the same concentration (20.0 µg/mL) by different analysts and on different days.

The accuracy of the method was evaluated by analyzing 3 individual samples at 3 different percentages (80%, 100%, and 120%) of the working concentration (20.0 µg/mL).

Application of the method to determine CDV concentration in samples derived from in vitro release kinetics assay

The amount of CDV released was measured using four Franz diffusion cells connected to a thermostat at 37 ± 0.5 °C arranged individually on a magnetic stir plate. An aliquot of 500 mg of each formulation was applied to the donor compartment (with diffusional area of 1.15 cm²) separated by an artificial membrane of cellulose acetate from the receiver compartment (with volume $\pm$ 6 mL), which had been pre-filled with phosphate buffer (pH 7.4). At pre-determined

intervals (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, and 6.0 h), 3.0 mL of the receiver solution was collected and was immediately replaced with the receiving medium, phosphate buffer (pH 7.4), to maintain the sink condition. The collected samples were analyzed by UV spectrophotometry.

RESULTS AND DISCUSSION

Linearity, LOQ, and LOD

Evaluation of the data curves using the least squares method showed that the method was linear in the range of 5–40 µg/mL. We used the line equation $y = 0.0283x + 0.0013$, and the correlation coefficient $r^2 = 0.999$. Statistical analysis using analysis of variance (ANOVA) showed that lack adjustment was not observed. These results show that this method is suitable for determining the CDV concentrations in the samples ¹⁴. The LOD and LOQ of the method were 1.49 µg/mL and 4.98 µg/mL, respectively.

Specificity, Precision, and Accuracy

No signs indicating interference during the test with placebo formulations proved that the method developed was specific for the determination of CDV.

Repeatability of the method analyzed using 6 replicates showed an average concentration of 20.07 µg/mL. The coefficient of variation remained below 5%. The repeatability data are shown in Table 2.

The results of intermediate precision are shown in Table 2. Statistical evaluation using ANOVA indicates no significant difference ($p < 0.05$) among the results obtained on different days and by different analysts.

In addition, this method was also considered accurate because these results were consistent with those of analysis of 3 concentrations (80, 100, and 120 %) of CDV solution. The accuracy of the method is shown in Table 3.

Repeatability	Concentration		CV (%)	
	19.44 µg/mL $\pm$ 0.59		3.0	
Intermediate precision	Day 1		Day 2	
	Concentration	CV%	Concentration	CV%
Analyst 1	20.00 µg/mL $\pm$ 0.02	0.08	19.77 µg/mL $\pm$ 0.03	0.08
Analyst 2	20.07 µg/mL $\pm$ 0.30	1.53	19.61 µg/mL $\pm$ 0.56	2.87

Table 2. Results for repeatability and intermediate precision.

Theoretical conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Practice conc. ($\mu\text{g/mL}$)			Mean	SD	CV%	%
16	15.76	16.69	15.72	15.72	0.03	0.22	98.50
20	20.13	20.09	20.10	20.11	0.02	0.10	100.55
24	23.91	23.83	23.66	23.80	0.13	0.53	99.16

Table 3. Results for accuracy.

Formulations	G	GP	GE	E	ME1	ME2
Apparent viscosity Mean	24.74 (Pa.s)	18.12 (Pa.s)	24.83 (Pa.s)	11.13 (Pa.s)	38.90 (mPa.s)	44.40 (mPa.s)

Table 4. Apparent viscosity of formulations.

Application of the method for determination of in vitro release kinetics of CDV

The cumulative amount of CDV in the receptor solution during the assay is shown in Fig. 1. The in vitro release profile of CDV shows that the diffusion of the drug from the emulsion was higher than that from the gels regardless of the presence of the two absorption promoters. This result can be attributed to the viscosity of the formulation. The viscosity results are shown in Table 4.

According to Davis and Khanderia (cited by Santis)¹⁵, thermodynamic activity and viscosity regulated drug release. It is a general rule that the increased viscosity of a vehicle causes the formation of a more rigid structure and thus decreases the rate of drug release.

The viscosity values of each gel formulation

(Table 4) are directly related to their in vitro release profiles (Fig. 1). In addition, Fig. 1 shows that these release profiles showed no significant differences in the range of 95% after statistical analysis using ANOVA.

The cumulative amount of CDV released from ME 1 and ME 2 microemulsions was significantly lower than that released from the emulsion, and the microemulsions showed a Newtonian rheological behavior and low viscosity values. These microemulsions were formed using Labrasol® and Plurol Oleique® as surfactants, and the oil phase consisted of isopropyl myristate, compounds that can interfere with the release of drugs by molecular interactions^{16,17}. Moreover, these preparations act as drug reservoirs decreasing the partitioning of the drug and therefore its release. In addition, other studies have shown results similar to those above where the microemulsions obtained functioned as reservoir of drugs for levobunolol, fluoxetine, zidovudine (AZT)¹⁸⁻²⁰.

The least squares method was used to determine the linear regression of the experimental data of the in vitro of CDV; the results showed that the Higuchi's model was the most suitable for all formulations tested²¹. This result can be observed through the values of the correlation

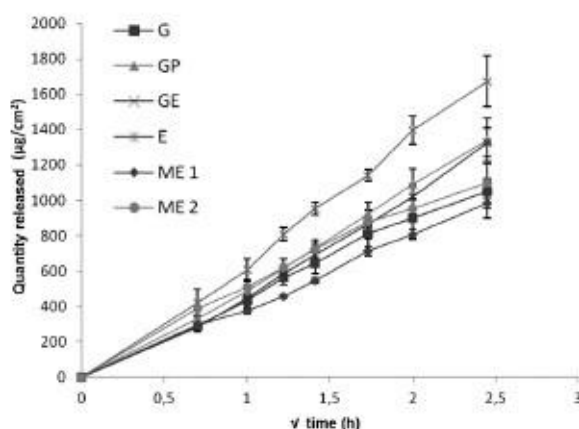


Figure 1. In vitro release profile of cidofovir in all formulations. Each point represents the mean $\pm$ standard deviation (SD) of 4 determinations (G = gel without penetration enhancers, GP = gel with propylene glycol, GE = gel with ethanol, E = emulsion, ME 1 = microemulsion 1, ME 2 = microemulsion 2).

Correlation coefficient (r^2)	
G	0.9889 $\pm$ 0.0063
GP	0.9946 $\pm$ 0.0044
GE	0.9906 Formulations $\pm$ 0.0036
E	0.9907 $\pm$ 0.0089
ME 1	0.9915 $\pm$ 0.0050
ME 2	0.9838 $\pm$ 0.0069

Table 5. Correlation coefficient of release profile of cidofovir in formulations.

coefficients shown in Table 5. These results indicate that the release of CDV followed pseudo-first order kinetics, which indicated that the system is controlled by diffusion ²¹.

Finally, the in vitro release profiles of CDV after testing for 6 h showed that the analytical method developed was useful for quantification of CDV release in vitro using samples obtained from different topical dosage forms.

CONCLUSION

The in vitro release kinetics of CDV from different topical dosage forms showed that the pseudo-first order kinetic model was the most suitable mathematical model to determine CDV release from all formulations. The UV spectrophotometric method used to quantify CDV was linear, precise, accurate, and specific.

REFERENCES

1. Bonatti, H., F. Aigner, E. De Clercq, C. Boesmueller, A. Widschwendner, C. Larcher, et al. (2007) *Transpl. Int.* 20: 238-46.
2. Muñoz, R. M., E. Prado, J.M. Cisneros & F.J. Bautista (2010) *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28: 209-10.
3. Capaccio, P., F. Ottaviani, V. Cuccarini, M. Corbellino, C. Parravicini, S. Menzo, et al. (2009) *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 266: 937-9.
4. Stragier, I., R. Snoeck, E. De Clercq, J. J. Van Den Oord, M. Van Ranst & H. De Greef (2002) *J. Med. Virol.* 67: 241-5.
5. Geerinck, K., G. Lukito, R. Snoeck, R. De Vos, E. De Clercq, Y. Vanrenterghem, et al. (2001) *J. Med. Virol.* 61: 543-9.
6. Tristam, A. & A. Fiander (2005) *Gynecol. Oncol.* 99: 652-5.
7. Mariño, A.T., J.R.C. González, M.T.I. Bobo & F.A Rodríguez (2007) *ESCP Symposium on Clinical Pharmacy.* 36: 48-9.
8. Santoyo, S., E.G. De Jalón, M.A. Campanero & P. Ygartua (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 819-26.
9. Momper, J.D., S. Zhang, P.S. Randhawa, R. Shapiro, K.S. Schonder & R. Venkataramanan (2010) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53: 1015-21.
10. Lecomte, F., C. Hubert, S. Demarche, C. De Blieye, A. Dispas, A. Jost, et al. (2012) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 57: 153-65.
11. Silva, J.A., B.P.G.L. Damasceno, V.F.C. Borba, E.S.T. Egito & D.P de Santana. (2009) *Rev. Bras. Farm.* 90: 245-9.
12. Brasil (2003) *Guia para validação de métodos analíticos.* Diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução No. 899.
13. Bedor, D.C.G., J.L. Soares Sobrinho, S. Granjero Júnior, S.V. Ramos, A A.N. Lima & P.J. Rolim Neto (2008) *Lat. Am. J. Pharm.* 27: 263-5.
14. International Conference on Harmonization (2005) *Guidance for Industry Q2B-R1 Validation of Analytical Procedures: Methodology.* U.S Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research.
15. Santis, A.K. (2008) *Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica [Dissertação]* Rio de Janeiro: Universidade Federal de Rio de Janeiro.
16. Djordjevic, L., M. Primorac & M. Stupar (2005) *Int. J. Pharm.* 296: 73-9.
17. Wang, Y.Y., C.T. Hong, W.T. Chiu & J. Y. Fang (2001) *Int. J. Pharm.* 224: 84-104.
18. Gallarate, M., M.R. Gasco, M. Trotta, P. Chetoni & M.F. Saettone (1993) *Int. J. Pharm.* 100: 219-25.
19. Parikh, D.K., T.K. Ghosh (2005) *AAPS PharmSciTech.* 6: 144-9.
20. Ghosh, P.K., R.J. Majithiya, M.L. Umrethia & R.R. Murthy (2006) *AAPS PharmSciTech.* 7 : 172-7.
21. Higuchi, W.I. (1962) *J. Pharm. Sci.* 51: 802-4.