



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

KAROLINE BELÉM SEIXAS

**AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO METRONIDAZOL E  
LAPACHOL SOB A ÓTICA DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS**

Recife  
2018

KAROLINE BELÉM SEIXAS

**AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO METRONIDAZOL E  
LAPACHOL SOB A ÓTICA DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Área de Concentração:** Produção e Controle de Medicamentos

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Leila Bastos Leal

**Coorientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Giovana Damasceno Sousa

Recife  
2018

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

S462a Seixas, Karoline Belém.  
Avaliação de formulações tópicas contendo metronidazol e lapachol sob a  
ótica dos métodos alternativos / Karoline Belém Seixas. – 2018.  
97 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Leila Bastos Leal.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Administração cutânea. 2. Gel. 3. Pele. 4. Técnicas in vitro. 5.  
Toxicidade. I. Leal, Leila Bastos (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2018-312)

KAROLINE BELÉM SEIXAS

**Avaliação de formulações tópicas contendo metronidazol e lapachol sob a ótica dos métodos alternativos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Leila Bastos Leal (Orientadora - Presidente)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Amélia Moreira Lira (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Sergipe

Dedico esse trabalho aos meus pais, Ebenezer Seixas e Ana Beatriz Seixas, que sempre me apoiaram. Com todo o carinho e gratidão desejo ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus (razão do meu existir), por ter me proporcionado momentos e experiências maravilhosas e pelas pessoas que Ele colocou ao longo do caminho, com certeza fizeram a diferença, além de me orientar e me consolar nos momentos mais difíceis e principalmente pela família, que representam a minha base.

Gostaria de agradecer aos meus pais e ao meu irmão, por terem demonstrado apoio em tudo que faço, estando presente em todos os segmentos da minha vida. À minha mãe Ana Beatriz e meu pai Ebenezer, por serem meu porto seguro, meus exemplos, por me motivarem a sempre querer aprender e conquistar mais, por estarem comigo em todos os momentos dessa jornada sem medir esforços para que o melhor sempre chegasse até mim. Eu amo vocês e sempre vou precisar de vocês na minha vida. Ao meu querido irmão João Henrique, por fazer dos meus dias só alegria com sua forma de ser e amar.

À minha avó Engrácia, que sempre esteve presente na minha vida. Pessoa como ela não existe nesse mundo! Sempre me proporcionou o melhor que podia dar e eu cresci em um ambiente feliz e harmonioso. É uma enorme alegria ser sua neta.

À minhas primas, Carolina e Aline, pelo companheirismo e amizade, que sempre se fizeram presente na minha vida, irmãs de coração que levo comigo sempre.

À minha tia Zeza, por demonstrar sempre força e apoio comigo e com a minha família.

Agradeço em especial a Rafael Pedrosa, você é uma surpresa. Você sempre demonstrou carinho e amor para comigo além do apoio nos momentos mais difíceis.

Em especial também agradeço a minha amiga Jéssica Correia por estar ao meu lado como uma irmã de coração. Não sei o que seria de mim sem você. Muito obrigada.

Aos meus amigos Isabelle e Gustavo por estarem sempre presentes nas mais diversas situações dessa vida. Com certeza vocês fazem dos meus dias mais felizes e divertidos e com certeza muitas vezes me ajudaram a passar pelas adversidades simplesmente pelo fato de estarem ali. Muito obrigada.

À minha amiga Izabela por todo apoio. Deixo aqui meu agradecimento pela torcida, cuidado, amor e dedicação para comigo.

À minha orientadora Leila, que sempre se mostrou uma pessoa alegre e batalhadora. Agradeço pelo o que me foi proporcionado ao longo dos anos e espero um dia poder retribuir tudo isso. Agradeço a Deus por ter colocado a senhora no meu caminho e creio que só Ele sabe o quão importante sua presença se faz na minha vida. Deixo aqui meu carinho e admiração.

Em especial a Giovana, pela orientação e aprendizado, por se fazer presente e disposta a ajudar no que for preciso. Você é uma pessoa atenciosa e maravilhosa que eu espero poder retribuir tudo o que você fez por mim um dia.

À toda a família NUDFAC, deixo todo o meu carinho, Danilo, Maira, Thalita, Ana Rosa, Wellithom, Juliana, Carol, Nayra, Camila, Asley e Amélia. Com toda a certeza, no convívio diário vocês representam força e sei que todos de alguma forma contribuíram para ampliar meus conhecimentos e perspectivas. Obrigada por toda a ajuda e amizade.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPE, Nerilin e Rilvan.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de alguma forma direta e indiretamente para a minha formação através de ações, disponibilidade ou apenas palavras de conforto e coragem. A realização desse sonho carrega um pouco de cada um de vocês e eu serei eternamente grata.

“Enquanto aguardamos aquilo que virá, não podemos deixar de viver  
aquilo que pode ser vivido agora.”

Mário Sérgio Cortella

## RESUMO

A experimentação com animais nas pesquisas é umas das formas de avaliar a eficácia e segurança de produtos farmacêuticos, surgindo a necessidade do desenvolvimento, implementação e divulgação de métodos alternativos que substituíssem total ou parcialmente o uso de animais. O teste *in vitro* mais utilizado para avaliar a absorção sistêmica de produtos aplicados topicamente é absorção cutânea *in vitro* e o modelo de pele para tal finalidade mais usado é a pele de porco. Outros testes consistem na identificação do potencial irritante de produtos, como os testes de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP) e o da membrana cório-alantóide do ovo embrionado de galinha (HET-CAM). Diante disto, neste estudo, formulações tópicas contendo metronidazol 0,75% e lapachol 0,5% foram avaliadas sob a ótica dos métodos alternativos. Para tanto, foi realizada a caracterização físico-química (pH, viscosidade, espalhabilidade e teor) e estudo de liberação *in vitro* das formulações. O estudo de absorção cutânea foi realizado com células de Franz baseado no guia 428 da OECD, com inclusão da avaliação da dermatofarmacocinética (DPK) *in vitro*, utilizando as diferentes partes de pele do porco (dorso, ventre, barriga) como biomembrana, com prévia análise microscópica das peles e *in vivo* com 14 participantes. O BCOP foi conduzido baseado no guia OECD 437 utilizando córneas bovinas e o HET-CAM com ovo embrionado de galinha segundo o ICCVAM. Os dados das avaliações das formulações de metronidazol e lapachol demonstraram comportamento pseudoplástico e modelo cinético de Higuchi. As análises de absorção cutânea para o metronidazol mostraram perfil de distribuição semelhante do fármaco, com maior concentração obtida no estrato córneo, concentração média na epiderme e derme e nenhuma quantificação no líquido receptor. Mediante avaliação estatística da correlação dermatofarmacocinética *in vitro/in vivo* não foi observada diferença na utilização da pele da região dorsal ou ventral do porco. Para o lapachol foi encontrado concentrações significativas no líquido receptor e estrato córneo, com maior quantificação do fármaco na epiderme e derme. Foi observado para o lapachol o mesmo perfil de distribuição em todas as regiões de pele de porco investigadas. A falta de variabilidade significativa das regiões de peles investigadas, a partir das características de cada fármaco, foi evidenciada considerando que o mesmo perfil de distribuição foi mantido independente da região da pele utilizada, o que demonstra que as diversas partes da pele de porco estão aptas para uso nos estudos de absorção cutânea (*in vitro*). Uma padronização da região de pele com validação dos protocolos antes de iniciar os experimentos é recomendada para obter dados confiáveis e reproduzíveis. Para a

formulação do metronidazol não foi evidenciado potencial irritante através dos métodos de BCOP e HET-CAM, mas para o lapachol foi exibido resultado de irritante moderado pelo HET-CAM e não determinado pelo BCOP. Todos os métodos alternativos demonstraram reprodutibilidade e eficiência na avaliação da segurança destas formulações convencionais.

Palavras-chave: Administração cutânea. Gel. Pele. Técnicas *in vitro*. Toxicidade.

## ABSTRACT

The animals use in research is one of the possibilities to evaluate the efficacy and safety of pharmaceuticals products and there is the necessity of development, implementation and dissemination of alternative methods that totally or partially replaced the use of animals. The most widely used *in vitro* test to evaluate the systemic absorption of topically applied products is *in vitro* dermal absorption and the most commonly skin model for this assay is the pig skin. Other test is the irritant potential of products that can be evaluated through the assays such as bovine corneal opacity and permeability (BCOP) and chicken embryo chorioallantoic membrane (HET-CAM). In this study, topical formulations containing metronidazole 0,75% and lapachol 0,5% were evaluated under alternative methods. Physical-chemical characterization (pH, viscosity, spreadability and content) and *in vitro* release study were performed. Dermal absorption study was performed with Franz cells based on the OCDE 428 guide and the *in vitro* dermatopharmacokinetics (DPK) evaluation was performed with different parts of the porcine skin (back, ventral, ear) as biomembrane with prior microscopic analysis and the *in vivo* procedure was executed with 14 participants. BCOP was based on OECD 437 guideline with bovine corneas and the HET-CAM according to ICCVAM guidelines. Data from the metronidazole and lapacho formulations showed pseudoplastic behavior and Higuchi kinetic model. The dermal absorption and DPK analysis for metronidazole demonstrated high drug concentration in stratum corneum, epidermis and dermis, and no quantification in the receiving liquid. Metronidazole dermatopharmacokinetics *in vitro/in vivo* statistical evaluation no difference was observed in the use of back and ventral pig skin. Lapachol had significant concentration in the recipient liquid and the highest quantification was in epidermis and dermis, the drug had the same distribution profile in all skins regions investigated. The skin types invariability, based on the drugs characteristics, was evidenced considering the same distribution profile independent of the skin region. The results demonstrated that different parts of the pig skin are suitable for use and standardization of the skin region with validation of the protocols before starting the experiments is recommended in order to obtain reliable and reproducible data. For the metronidazole formulation no irritant potential was evidenced by BCOP and HET-CAM methods but for the lapacho formulations a slight irritant result was shown by HET-CAM and non-irritants by BCOP. All the alternative methods demonstrated reproducibility and efficiency in the safety assessment of conventional formulations.

Keywords: Cutaneous administration. Gel. *In vitro* techniques. Skin. Toxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 –</b>	Representação da célula de difusão de Franz.....	27
<b>Figura 2 –</b>	Comparação histológica entre a pele humana e suína. É possível observar a estrutura da epiderme, derme, glândula sebácea, folículo capilar, glândula apócrina e tecido subcutâneo.....	29
<b>Figura 3 –</b>	Gráfico com o perfil de absorção percutânea <i>in vitro</i> de diferentes regiões da pele do porco e do humano.....	30
<b>Figura 4 –</b>	Representação esquemática das estruturas da pele.....	31
<b>Figura 5 –</b>	Imagem de microscopia apresentando as camadas da epiderme.....	32
<b>Figura 6 –</b>	Representação esquemática das diferentes rotas de absorção percutânea de compostos através da pele.....	34
<b>Figura 7 –</b>	Representação da molécula do metronidazol, forma estrutural.....	35
<b>Figura 8 –</b>	Representação da molécula do lapachol, forma estrutural.....	36
<b>Figura 9 –</b>	Representação da remoção das camadas de estrato córneo com fita adesiva.....	38
<b>Figura 10 –</b>	Imagem do corneócitos presentes na fita adesiva durante a remoção sequencial do estrato córneo através da técnica de <i>tape-stripping</i> .....	39
<b>Figura 11 –</b>	Imagem do antebraço contendo gel de metronidazol em dois locais de tratamento e mais um controle mediante oclusão. A- Antebraço esquerdo, 1 e 2 local de aplicação do gel de metronidazol, 3 controle.....	50

<b>Figura 12 –</b>	Gráficos obtidos do estudo de espalhabilidade. (A) Gel de Lapachol, (B) Gel de Metronidazol.....	55
<b>Figura 13 –</b>	Gráficos de tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento. (A) Gel de Metronidazol (B) Gel de Lapachol.....	57
<b>Figura 14–</b>	Gráficos de viscosidade x taxa de cisalhamento. (A) Gel de Metronidazol (B) Gel de Lapachol.....	58
<b>Figura 15 –</b>	Ovo de galinha fertilizado da raça White Leghorn. (A) Processo de remoção da membrana da casca do ovo. (B) Membrana cório-alantoide.....	60
<b>Figura 16 –</b>	Hiperemia dos vasos sanguíneos da solução de NaOH a 0,1N como controle positivo no teste de HET-CAM.....	62
<b>Figura 17 –</b>	Perfil de liberação <i>in vitro</i> apresentado para as formulações contendo o metronidazol e o lapachol, utilizando membrana sintética.....	63
<b>Figura 18 –</b>	Imagens das diferentes regiões da pele de porco obtidas em objetiva de 40x. (A) Dorso, (B) Ventre, (C) Orelha. Ec - estrato córneo, Ep - Epiderme viável, De- Derme.....	64
<b>Figura 19 –</b>	Quantidade acumulada do metronidazol no estrato córneo (EC), epiderme viável e derme das diferentes regiões da pele de porco após 6hrs de estudo.....	66
<b>Figura 20 –</b>	Perfis de concentração de MTZ (n = 14) em estrato córneo humano ( <i>in vivo</i> ) após aplicação do gel de metronidazol por 6hrs.....	68
<b>Figura 21 –</b>	Perfis de concentração de MTZ (n = 14) em estrato córneo do dorso e ventre da pele de porco ( <i>in vitro</i> ) após aplicação do em gel de metronidazol por 6hrs.....	69
<b>Figura 22 –</b>	Valores derivados (n = 14, média ± DP) no eixo X dos coeficientes de partição do MTZ no estrato córneo (K), parâmetro de difusividade (D/ L <sup>2</sup> ), coeficientes de permeabilidade (Kp) e o fluxo (Jss). No eixo Y, escala logarítmica na base 10. Legenda: Barra hachurada corresponde	

	ao estudo em humanos, barra branca estudo <i>in vitro</i> na pele do dorso e barra preta na pele do ventre.....	71
<b>Figura 23 –</b>	Quantidade acumulada de lapachol nas camadas da pele das diferentes regiões da pele de porco após 6hrs de estudo (n=14).....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Principais semelhanças e diferenças entre a pele porco e humana.....	29
<b>Tabela 2 –</b>	Composição qualitativa e quantitativa (%) do gel de lapachol e metronidazol.....	41
<b>Tabela 3 –</b>	Classificação final do potencial irritante no BCOP.....	44
<b>Tabela 4 –</b>	Pontuações atribuídas as alterações evidenciadas na membrana córneo-alantoide.....	44
<b>Tabela 5 –</b>	Classificação final do potencial irritante no HET - CAM.....	45
<b>Tabela 6 –</b>	Condições cromatográficas do método descrito por Melo e colaboradores (2016) utilizado para a quantificação do metronidazol por CLAE-UV.....	52
<b>Tabela 7 –</b>	Condições cromatográficas do método utilizado para a quantificação do lapachol por CLAE-UV em método adaptado Fonseca (2004) .....	53
<b>Tabela 8 –</b>	Valores de pH e teor das formulações placebo e com metronidazol e lapachol.....	54
<b>Tabela 9 –</b>	Valores obtidos relacionados a espalhabilidade.....	56
<b>Tabela 10 –</b>	Viscosidade aparente do gel de metronidazol (MTZ) e gel de lapachol (LAP).....	57
<b>Tabela 11 –</b>	Resultado do teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP).....	59
<b>Tabela 12 –</b>	Resultado do HET-CAM para as formulações placebo e contendo fármaco.....	61
<b>Tabela 13 –</b>	Concentrações de metronidazol no estrato córneo das peles provenientes do dorso, orelha e ventre.....	67

<b>Tabela 14 –</b>	Valores de parâmetros dermatofarmacocinéticos de partição (K), difusão ( $D/L^2$ ), área sob a curva (AUC), constante de permeabilidade (Kp) e fluxo (Jss) obtidos na pele humana e no dorso e ventre do porco com a formulação de metronidazol (média $\pm$ SD, n=14).....	70
<b>Tabela 15 –</b>	Concentrações de lapachol encontradas na epiderme viável e derme nas peles provenientes do dorso, orelha e ventre.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCOP	Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina
BraCVAM	Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos
CAM	Membrana cório-alantóide
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DP	Desvio Padrão
DPK	Dermatofarmacocinética
EC	Estrato córneo
ECVAM	Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos
EMEM	Minimum Essential Medium Eagle
FDA	Farmacopeia dos Estados Unidos
HET-CAM	Membrana cório-alantóide do ovo de galinha
ICCVAM	Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos Alternativos
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
LAP	Lapachol
MET	Metronidazol
NUDFAC	Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão Fosfato)
pH	Potential hidrogeniônico
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety
TEWL	Perda de água transepidermal
WHO	World Health Organization
3R's	Substituição, refinamento e redução

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
gm	Centímetro
g	Gramma
hr	Hora
J	Fluxo
K <sub>p</sub>	Coefficiente de permeabilidade
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanômetros
°	Graus
°C	Graus Celsius
Pa	Pascal
Pa.s	Pascal segundo
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso/volume
s	Segundo
T	Temperatura
V	Volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Métodos Alternativos .....</b>	<b>24</b>
3.1.1	<i>Legislação.....</i>	24
3.1.2	<i>Membrana Cório-alantóide do Ovo de Galinha (HET-CAM) .....</i>	26
3.1.3	<i>Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina (BCOP).....</i>	26
3.1.4	<i>Absorção cutânea: método in vitro (OECD TG 428).....</i>	26
3.1.5	<i>Uso da pele de porco como biomembrana na absorção cutânea in vitro.....</i>	28
<b>3.2</b>	<b>Pele Como Via de Administração de Fármacos.....</b>	<b>31</b>
3.2.1	<i>Pele humana .....</i>	31
3.2.2	<i>Administração de produto tópico .....</i>	33
3.2.3	<i>Metronidazol.....</i>	35
3.2.4	<i>Lapachol .....</i>	36
<b>3.3</b>	<b>Avaliação Do Comportamento Biofarmacotécnico De Produtos Tópicos.....</b>	<b>37</b>
3.3.1	<i>Estudos de permeação cutânea .....</i>	37
3.3.2	<i>Estudos de dermatofarmacocinética .....</i>	38
3.3.3	<i>Correlação in vitro/in vivo de produtos tópicos através da dermatofarmacocinética ....</i>	40
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Formulações Avaliadas .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Caracterização Físico-Química .....</b>	<b>42</b>
4.3.1	<i>Determinação do pH .....</i>	42
4.3.2	<i>Espalhabilidade .....</i>	42
4.3.3	<i>Viscosidade e reologia .....</i>	42
4.3.4	<i>Teor.....</i>	42
<b>4.4</b>	<b>Avaliação Do Potencial Irritante Das Formulações .....</b>	<b>43</b>
4.4.1	<i>Teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP).....</i>	43

4.4.2	<i>Teste em Membrana Cório-alantoide de Ovo de Embrionado de Galinha (HET – CAM)</i> .....	44
<b>4.5</b>	<b>Estudo de Liberação</b> .....	<b>45</b>
4.5.1	<i>Preparo da membrana</i> .....	45
4.5.2	<i>Montagem da célula de Franz</i> .....	45
4.5.3	<i>Coleta e quantificação das amostras</i> .....	45
4.5.4	<i>Análise da cinética de liberação in vitro</i> .....	46
<b>4.6</b>	<b>Obtenção E Dermatização Da Pele de Porco</b> .....	<b>46</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise Microscópica</b> .....	<b>47</b>
<b>4.8</b>	<b>Estudo De Permeação Cutânea In Vitro</b> .....	<b>47</b>
<b>4.9</b>	<b>Estudo De Dermatofarmacocinética In Vitro</b> .....	<b>48</b>
<b>4.10</b>	<b>Estudo De Dermatofarmacocinética In Vivo</b> .....	<b>49</b>
4.10.1	<i>Comitê de ética em pesquisa</i> .....	49
4.10.2	<i>Tolerabilidade</i> .....	50
4.10.3	<i>Procedimento de DPK</i> .....	50
<b>4.11</b>	<b>Processo De Extração</b> .....	<b>51</b>
<b>4.12</b>	<b>Doseamento das Amostras por CLAE-UV</b> .....	<b>52</b>
4.12.1	<i>Metronidazol</i> .....	52
4.12.2	<i>Lapachol</i> .....	53
<b>4.13</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>54</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização Físico-Química</b> .....	<b>54</b>
5.1.1	<i>Avaliação do pH e teor</i> .....	54
5.1.2	<i>Avaliação da espalhabilidade</i> .....	55
5.1.3	<i>Reologia e viscosidade</i> .....	56
<b>5.2</b>	<b>Avaliação Do Potencial Irritante</b> .....	<b>59</b>
5.2.1	<i>BCOP</i> .....	59
5.2.2	<i>HET - CAM</i> .....	60
<b>5.3</b>	<b>Avaliação da Liberação in vitro</b> .....	<b>62</b>
<b>5.4</b>	<b>Avaliação Microscópica</b> .....	<b>63</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação da Permeação Cutânea e Dermatofarmacocinética</b> .....	<b>65</b>
5.5.1	<i>Gel metronidazol</i> .....	65
5.5.1.1	<b>PERMEAÇÃO CUTÂNEA</b> .....	<b>65</b>

5.5.1.1	DERMATOFARMACOCINÉTICA .....	68
5.5.2	<i>Gel de lapachol</i> .....	72
5.6	<b>Considerações sobre os modelos de pele investigados</b> .....	74
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	77
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	79
	<b>ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	94
	<b>ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA E APROVAÇÃO DO ESTUDO</b> .....	97

## 1 INTRODUÇÃO

A experimentação com animais nas pesquisas consiste em uma das possíveis formas de avaliar a eficácia e segurança de produtos farmacêuticos, uma vez que é possível prever os benefícios e a toxicidade nos seres humanos. Assim, muitos projetos de pesquisa utilizam animais em suas metodologias (TREZ & GREIF, 2000; PAIXÃO, 2001).

Uma das áreas que necessitam de animais para o desenvolvimento da pesquisa consiste naquelas associadas a avaliação de produtos tópicos farmacêuticos. A administração tópica de medicamentos considerando a pele como alternativa a outras vias é vantajosa, uma vez que há ausência de efeito de primeira passagem, é indolor e de fácil aplicação (SILVA et al., 2009).

O comportamento de uma formulação aplicada topicamente pode ser avaliado mediante a realização de estudos de permeação e retenção cutânea, além da avaliação dermatofarmacocinética. Na permeação cutânea é observada a passagem do fármaco através das camadas da pele, na retenção é verificado o que ficou na epiderme e derme e a dermatofarmacocinética (DPK) avalia a disposição de fármaco presente no estrato córneo. Todos os estudos citados se complementam e a “biodisponibilidade *in vitro*” de produtos administrados topicamente pode ser esclarecida e possivelmente correlacionada com dados *in vivo*. (IDSON, 1975; REIFENRATH et al., 1991; N'DRI-STEMPFER et al., 2008).

Uma vez que os estudos citados acima são realizados, um dos próximos passos consiste na avaliação da eficácia e segurança pré-clínica da formulação tópica antes de ser utilizada por humanos. Dentre as verificações realizadas, temos a avaliação da absorção cutânea de produtos administrados topicamente e do potencial irritante que permite evidenciar os possíveis danos que sejam tóxicos ao organismo (FOLDVARI, 2000; SILVA et al., 2010; SANTIS, 2008, SOUSA, 2016).

Conforme citado previamente, muitas avaliações dos produtos farmacêuticos são realizadas em animais. Entretanto, surgiu a necessidade do desenvolvimento de métodos que fossem alternativos e que pudessem substituir parcialmente ou completamente os animais em suas metodologias. Dito isto, dentre os testes *in vitro* reconhecidos e validados citamos a absorção cutânea *in vitro* e como forma de identificar o potencial irritante de substâncias e produtos, temos os testes de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP), e o da membrana cório-

alantóide do ovo de galinha (HET-CAM) (WORTH & BALLS, 2002; ABREU et al., 2008; ICCVAM, 2010; WILSON et al., 2015; SOUSA, 2016).

Os estudos de absorção cutânea (*in vitro*) auxiliam na seleção dos fármacos aplicados na pele, sendo assim, a escolha de modelos preditivos *in vitro* para via tópica são importantes. Podem ser utilizadas diferentes biomembranas, porém, a pele de orelha porco é amplamente difundida na literatura devido à similaridades com a pele humana. Propriedades como permeabilidade e espessura da epiderme são significativamente semelhantes (SCHMOOK et al., 2001; ANDRADE et al., 2002; BARBERO & FRASCH, 2009). Atualmente, outras regiões da pele de porco como o dorso e ventre também são utilizadas. Todavia, não existe um consenso relacionado a qual região da pele do animal deva ser utilizado e avaliações nesse quesito devem ser conduzidas sempre reforçadas pelo respeito ao princípio dos 3R's (reduzir, refinar, substituir).

Ainda neste cenário, o teste de BCOP consiste em método alternativo que avalia o potencial irritante através da opacidade e permeabilidade da córnea bovina, já o teste de HET-CAM visa a identificação do potencial de irritação sobre a membrana cório-alantóide do ovo embrionado da galinha (TAVASZI, BUDAI, 2007; SCOTT et al., 2010; SOUSA, 2016).

Diante do exposto, e considerando a importância dos métodos alternativos aos estudos em animais, este projeto é baseado na avaliação de formulações tópicas contendo metronidazol e lapachol sob a ótica dos métodos alternativos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral consiste em avaliar formulações tópicas contendo metronidazol e lapachol sob a ótica dos métodos alternativos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização físico-química das formulações;
- Avaliar o potencial irritante das formulações através do método alternativo de opacidade e permeabilidade da córnea bovina (BCOP);
- Avaliar o potencial irritante das formulações através do método alternativo da membrana cório-alantoide do ovo embrionado de galinha (HET-CAM);
- Avaliar a liberação *in vitro* das formulações;
- Identificar através da microscopia óptica do estrato córneo, epiderme e derme da pele de porco da região dorsal, abdominal e orelha;
- Avaliar a absorção cutânea (permeação e retenção cutânea) *in vitro* utilizando 3 diferentes regiões de pele de porco para formulações contendo metronidazol e lapachol;
- Avaliar os perfis dermatofarmacocinéticos *in vitro* e *in vivo* para formulação contendo metronidazol (correlação *in vitro/in vivo*);
- Discutir o uso da pele de porco como modelo de biomembrana na avaliação de produtos tópicos

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Métodos Alternativos

A utilização de animais na ciência começou a ser praticada na Grécia antiga onde os animais eram utilizados para fazer observações nas áreas da fisiologia e anatomia (PAIXÃO, 2001; ANDRADE et al., 2002).

Desde então, com o passar dos anos, cresceu o uso de animais nas pesquisas e atualmente inúmeras áreas da ciência os utilizam como modelos em suas linhas de pesquisa. Por exemplo, o uso de animais pode ser evidenciado nas avaliações de toxicidade de substâncias e produtos como nas pesquisas de investigação da segurança e eficácia de medicamentos (PAIXÃO & SCHRAMM 1999; MAGALHÃES et al., 2006).

Entretanto, foi observado a necessidade de desenvolver métodos alternativos aos testes em animais. Essas metodologias são baseadas em técnicas que visam a redução, refinamento ou substituição ao uso de animais de laboratório (WORTH & BALLS, 2001; ABREU et al., 2008; OLIVEIRA, 2012).

Os regulamentos para a realização de estudos em animais requerem o respeito ao 3R's (substituição, refinamento e redução) (RUSSELL & BURCH, 1992). Sendo assim, sempre que possível é aconselhável substituir o uso de animais por metodologias alternativas validadas, reduzir o número de animais utilizados, além de refinar a forma de como os experimentos são conduzidos (MORALES, 2008; SOUSA, 2016; BEEKHUIJZEN, 2017).

##### 3.1.1 Legislação

Os métodos alternativos são procedimentos validados e internacionalmente aceitos, os quais fornecem dados confiáveis e reprodutíveis (BRASIL, 2009; SOUSA, 2016).

O início da elucidação de validações de métodos alternativos surgiu com o Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM) nos Estados Unidos. Já na Europa, o centro de validação foi denominado Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM). Os métodos alternativos já validados estão disponíveis através da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD).

No Brasil, a Lei 11.794/08, conhecida como Lei Arouca, regulamentou a pesquisa utilizando animais e o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) foi

estabelecido. Posteriormente, foi criada a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), na qual ajuda no desenvolvimento dos métodos alternativos no país e realiza outros ensaios de validação alternativa ao uso de animais. Ainda em âmbito brasileiro, o Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM, *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods*) foi implementado e o uso dos métodos alternativos validados foi aceitos em todo território nacional (BRASIL, 2014; SOUSA, 2016).

Todos os métodos validados e que são aceitos no Brasil, estão de acordo com as normativas Nº 18/2014 e Nº 31/2016 do CONCEA (BRASIL, 2014; BRASIL, 2016). Neste trabalho, foram seguidas três metodologias alternativas: 1) Teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET – CAM), 2) Teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP) (OECD TG 437) e 3) Absorção cutânea: método *in vitro* (OECD TG 428).

### 3.1.2 Membrana Cório-alantóide do Ovo de Galinha (HET-CAM)

O teste de membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha consiste em uma das metodologias alternativas para avaliação do potencial irritante. O HET-CAM é uma das formas de investigação de produtos e substâncias em substituição aos testes de Draize, considerando que essa membrana apresenta semelhante reação inflamatória presenciada nos olhos dos coelhos (DRAIZE et al., 1944; GILLERON, 1996; WILHELMUS, 2001).

O HET-CAM utiliza a membrana cório-alantóide (CAM) do ovo embrionado de galinha da raça Leghorn. No décimo dia de incubação, o teste avalia alterações macroscópicas vasculares de hiperemia, hemorragia e coagulação após aplicação do produto sobre a CAM (TAVASZI, 2007; ICCVAM, 2010; NÓBREGA et al., 2012; OLIVEIRA, 2012).

Dentre as metodologias alternativas existentes, o HET-CAM ainda está passando por validação no Brasil. A RENAMA possui laboratórios associados selecionados no território nacional que auxiliam nos processos de validação de metodologias alternativas, dentre eles, o Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) da Universidade Federal de Pernambuco está inserido neste contexto visando cooperação para otimização dos testes (SOUSA, 2016).

### 3.1.3 Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina (BCOP)

O teste de opacidade de córnea bovina (BCOP) é validado internacionalmente e nacionalmente aceito para avaliação do potencial de irritação ocular. Esse teste utiliza a córnea dos olhos de animais bovinos, sendo um método alternativo ao teste de irradiação ocular de Draize. O método de BCOP permite identificar substâncias que apresentem um grau mais severo de irritabilidade com a determinação de uma classificação do potencial de irritação. O teste apresenta vantagens como tempo reduzido e fácil reprodução quando comparado aos testes realizados *in vivo* (ICCVAM, 2006; ICCVAM, 2006a; CRUZ & ANGELIS; 2012; BRASIL, 2014).

A avaliação através do BCOP é baseada na opacidade gerada na córnea bovina devido a alterações como inchaço do estroma, precipitação celular e desnaturação de proteínas. As alterações relacionadas com a permeabilidade da córnea ocorrem por modificações da barreira epitelial, sendo evidenciada pela passagem da substância fluoresceína através da córnea (GAUTHERON, 1992; SCOTT et al., 2010; SOUSA, 2016).

Durante a realização do teste, leituras de opacidade da córnea são feitas através do opacitômetro, no qual fornece resultados da transmissão de luz através da córnea. Caso esta córnea apresente alguma alteração, o valor obtido da transmissão também será alterado (VERSTRAELEN et al., 2013; SOUSA, 2016).

### 3.1.4 Absorção cutânea: método *in vitro* (OECD TG 428)

A aplicação de fármacos pela via tópica é significativamente atrativa, seja para uma ação local ou sistêmica, pois o fármaco age próximo do local alvo, havendo uma menor necessidade de quantidade de produto o que resulta em menores efeitos secundários (KULKARNI, 2010; BENSON et al., 2012).

Vários métodos são descritos na literatura para avaliar a absorção cutânea de fármacos em formulações tópicas e devido a dificuldade de se realizar experimentos *in vivo*, os métodos alternativos *in vitro* apresentam possibilidades de avaliação que transmitem confiabilidade e reprodutibilidade. Portanto, a escolha de modelos preditivos *in vitro* para a absorção cutânea são importantes uma vez que a correlação *in vitro/in vivo* pode ser estabelecida (TANOJO et al, 1997; SCHMOOK et al., 2001).

Os estudos de absorção cutânea *in vitro* podem ser realizados com células de difusão do tipo Franz (Figura 1). Esta célula é composta de um compartimento doador, onde a formulação m estudo é aplicada, e um compartimento receptor onde coletas são realizadas (BALAGUER et al., 2006; SILVA, 2008).

**Figura 1** - Representação da célula de difusão de Franz.



Fonte: Adaptado de Silva (2008).

Apesar de ser mencionado no método da 428 de absorção cutânea *in vitro*, que a pele humana consiste em uma das opções para ser utilizada como modelo de membrana, nem sempre este tipo de pele está disponível para fins de pesquisa. Uma alternativa recomendada pelo Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), consiste no uso de pele de porco devido as propriedades de morfologia e composição, que podem ser correlacionáveis com a pele humana (OMS, 2006; BENECH-KIEFFER et al, 2000; SCCS, 2010; HASANOVIC et al, 2011; GERSTEL et al, 2016).

Visando as tendências internacionais, no Brasil em 2012 foi publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a segunda edição do “GUIA PARA AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTOS COSMÉTICOS”, na qual a pele de porco também foi sugerida como modelo para avaliação de produtos (BRASIL, 2012).

Na literatura ainda são encontrados estudos para as avaliações de permeação cutânea com peles provenientes de outros animais, como a do rato. Entretanto, é mencionado que essas peles são mais permeáveis do que a pele humana, o que pode gerar resultados não tão precisos para comparações com o humano. Além do mais, em relação as características morfológicas do estrato

córneo dos ratos, é encontrado que são relativamente diferentes do ser humano (ROSS et al., 2000; BARRY; WILLIAMS, 2004).

Considerando discussões a este respeito, bem como a relativa ausência de estudos publicados relacionados ao padrão ideal da região da pele do porco a ser utilizada em pesquisas dessa natureza, neste trabalho foram conduzidos estudos visando refinamento e redução do número de animais, uma vez que diferentes regiões da pele de um mesmo animal foram avaliadas como possíveis modelos de biomembranas, objetivando assim o levantamento de informações, correlações *in vitro/in vivo* e aperfeiçoamento dos estudos *in vitro* de absorção cutânea.

### 3.1.5 *Uso da pele de porco como biomembrana na absorção cutânea in vitro*

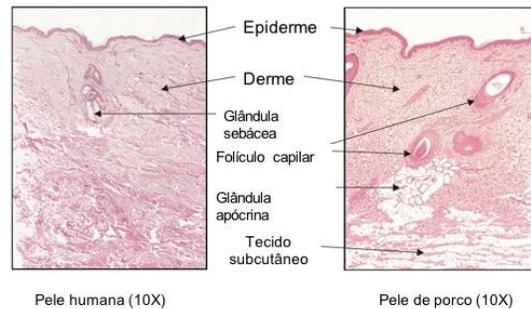
Um dos primeiros estudos com a pele de porco foi realizado por Flatten em 1896 e desde então diversos estudos na literatura demonstram que a pele do porco tem similaridades importantes com à pele humana (MARCARIAN et al., 1966; LAVKER et al., 1991; AVON & WOOD, 2005).

Nos dias de hoje, a seleção da pele de porco como um modelo de biomembrana depende de uma série de fatores incluindo disponibilidade, custo, facilidade de manipulação e como previamente mencionado a semelhança com a estrutura da pele humana (GERSTEL et al., 2016). Portanto, a pele de porco apresenta uma grande aplicabilidade na pesquisa farmacêutica e é amplamente difundida como uma alternativa a pele humana na realização de estudos *in vitro*.

Considerando que a pele suína apresenta similaridades com a pele humana, estudos desenvolvidos por Sartorelli e colaboradores (2000) visaram padronizar os experimentos *in vitro* utilizando a pele de porco como biomembrana. Através de uma revisão dos principais métodos de avaliação de produtos tópicos, foi concluído que devido as semelhanças com a pele humana, a pele de porco é a mais aconselhada para substituição nos estudos *in vitro*.

Em relação a histologia, similaridades estruturais também são observadas entre a pele humana quando comparada com a pele de porco de acordo com o descrito por Sullivan e colaboradores (2001). Na figura 2, é demonstrada uma comparação com a pele humana e com a pele de porco e características histológicas podem ser evidenciadas (SULLIVAN et al., 200; AVON & WOOD, 2005).

**Figura 2** - Comparação histológica entre a pele humana e suína. É possível observar a estrutura da epiderme, derme, glândula sebácea, folículo capilar, glândula apócrina e tecido subcutâneo.



Fonte: Adaptado de Sullivan et al (2001).

Além das características histológicas, os arranjos das fibras de colágeno na derme e a composição de proteínas e queratinas encontradas na pele de porco e do homem são semelhantes. Tanto a pele de porco como a do humano possuem lipídios que são formados principalmente por triglicerídeos e ácidos graxos que formam a estrutura de pele (AVON & WOOD, 2005; CILURZO et al., 2007; GODIN & TOUITOU, 2007). A tabela 1, apresenta um resumo com algumas das principais similaridades e diferenças entre a pele humana e a pele porco.

**Tabela 1** - Principais semelhanças e diferenças entre a pele porco e humana.

SEMELHANTE	NÃO SEMELHANTE (PELE DE PORCO)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Camadas da pele com estrutura semelhante;</li> <li>• Tempo de renovação do tecido epidérmico;</li> <li>• Presença de queratina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pobre vascularização das glândulas cutâneas;</li> <li>• Grande quantidade de gordura (animais mais velhos);</li> <li>• Glândulas sebáceas são menores.</li> </ul>

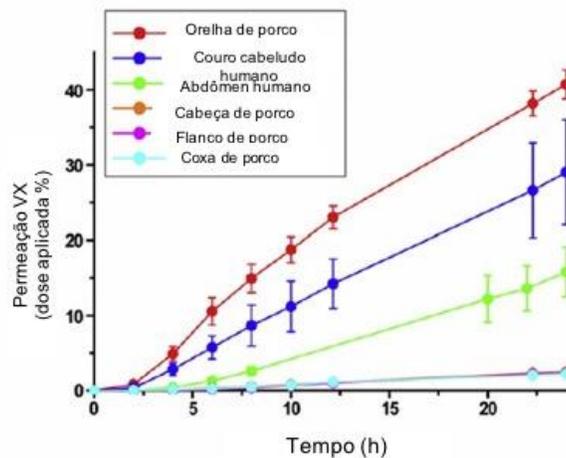
Fonte: Adaptado de Avon & Wood (2005).

Apesar de ser evidente as similaridades encontradas entre a pele de porco e a pele humana a nível estrutural, histológica e/ou fisiológica, em relação a permeabilidade de substâncias, pode haver variações dependendo da região de pele utilizada. Mesmo a pele de porco sendo um bom

modelo de biomembrana, é necessário levar em consideração que a pele de um mesmo animal pode apresentar variações de permeabilidade entre as diferentes regiões (HENNING et al., 2009).

Bolzinger e colaboradores (2012) através de pesquisa realizada com um composto organofosforado avaliaram a absorção percutânea *in vitro* visando analisar diferentes regiões de pele de porco e humana (Figura 3). Mediante análise, os autores concluíram que a região da pele de orelha de porco apresentou dados mais correlacionáveis com a humana.

**Figura 3** - Gráfico com o perfil de absorção percutânea *in vitro* de diferentes regiões da pele do porco e do humano.



Fonte: Adaptado de Bolzinger et al. (2012).

Outras regiões da pele do porco como o abdômen e o dorso também são citadas na literatura como modelo de biomembrana para estudos *in vitro* (HASANOVIC *et al*, 2011; MEIRA 2013). Estudo realizado por Leal (2017) com formulações de valerato de betametasona demonstrou que os resultados de dermatofarmacocinética realizado em pele do dorso do porco (*ex vivo*) apresentaram uma grande correlação com os dados obtidos da dermatofarmacocinética *in vivo*.

Entretanto, ainda não há dados suficientes na literatura relatando a absorção cutânea e perfis de correlação *in vitro/in vivo*.

### 3.2 Pele Como Via de Administração de Fármacos

#### 3.2.1 Pele humana

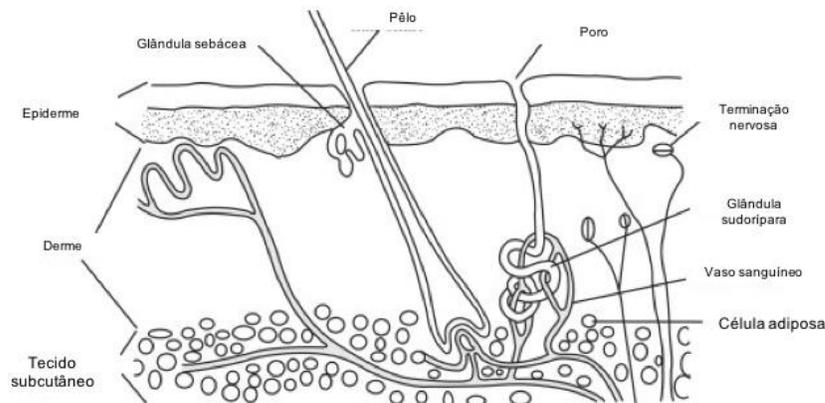
A pele corresponde a 16% do peso corporal e é composta por diferentes estruturas e por diversos tipos celulares, além de apresentar uma área de 2m<sup>2</sup> de superfície que delimita o organismo do meio ambiente (BOELSMA et al, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; CRICKS et al., 2005; TAZRART et al., 2017).

Uma das suas principais funções consiste na proteção do corpo, agindo assim como barreira para evitar passagem de toxinas. Esse mesmo comportamento de barreira é aplicado para fármacos de aplicação tópica. Além disso, a pele ajuda na homeostase e fornece proteção contra aos raios solares (BARRY, 1983; GUY & HADGRAFT, 2003).

Conforme o local do corpo a ser avaliado, o pH da pele pode variar. Entretanto, é mantido na faixa de 4 -6 por um sistema tampão de ácido láctico/lactato e pelo suor (TURNER et al, 1998; SILVA et al., 2001; ALI & YOSIPOVITCH, 2013).

Em relação a estrutura, a pele é dividida em três camadas: epiderme, derme e a hipoderme (Figura 4).

**Figura 4** - Representação esquemática das estruturas da pele.



Fonte: Adaptado de MURTHY & SHIVAKUMAR, 2010.

A camada da epiderme é formada por tecido epitelial, cuja espessura pode variar de acordo com a região do corpo, sendo mensurada entre 15 e 150µm (BENVINDO, 2006; TOSATO, 2010; ARAÚJO, 2016). A epiderme constantemente se renova apresentando estratificação que forma

camadas diferenciadas. Essas camadas são denominadas de: estrato basal (camada basal), estrato espinhoso (camada espinhosa), estrato granuloso (camada granulosa) e o estrato córneo (camada córnea) (Figura 5) (MONTAGNA, 2012).

**Figura 5** – Imagem de microscopia apresentando as camadas da epiderme.



Fonte: <http://dermatopatologiaparainiciantes.blogspot.com.br/2011/05/epiderme.html>. Acessado em: 19 de Janeiro.

A camada mais externa da epiderme, o estrato córneo (EC), consiste em células achatadas, chamadas corneócitos. Os corneócitos são células epidérmicas ricas em queratina com propriedade descamativa. Na literatura é apresentado que existem cerca de 10 a 25 camadas de corneócitos que são unidas por bicamadas lipídicas (ROBERTS et al., 2002). Esse tipo de organização celular confere impermeabilidade atuando como barreira de característica hidrofóbica. O estrato córneo humano pode medir na faixa de 10-15 $\mu$ m de espessura (HADGRAFT, 2001; LANGER, 2004; PRAUSNITZ, 2004; DANGELO & FATTINI, 2005; ANSEL et al., 2007). O estrato córneo também funciona como a principal barreira para medicamentos aplicados topicamente, porém, compostos com propriedades lipofílicas e peso molecular abaixo de 500 g/mol podem penetrar mais facilmente. Caso essa barreira seja danificada, a presença do fármaco no local de ação desejado pode ser mais facilitada (BOS et al., 2000; BOUWSTRA, et al., 2003; HORITA et al., 2012; WILLIAMS et al., 2012; OSHIZAKA et al., 2012; LIN et al., 2015).

Com exceção do estrato córneo, as outras camadas da epiderme (camada granulosa, camada espinhosa e camada basal) são consideradas "epiderme viável". A epiderme viável é composta

também por melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans (MONTEIRO-RIVIERE, 2010).

A derme é constituída por fibroblastos, melanócitos e células envolvidas na resposta imune e inflamatória. Apresenta também fibras de colágeno que fornecem suporte e flexibilidade aos tecidos. A partir dessa região, pode ocorrer absorção sistêmica de fármacos (HANSEN & LAMBERT, 2007; WONG et al., 2009; JEPPS et al., 2013).

Abaixo da derme, existe a hipoderme, na qual é a camada mais profunda da pele. Apresenta características de proteção contra o choque físico, armazena energia e é formada a partir de tecido conjuntivo frouxo e gordura. A partir da derme e hipoderme, vasos sanguíneos e células nervosas, além dos apêndices cutâneos podem ser evidenciados (CHIEN, 1992; PRISTA et al., 2008; KULKARNI, 2010; BENSON et al., 2012; JEPPS et al., 2013).

Levando em consideração as propriedades da pele, uma permeação eficiente dos fármacos através das suas camadas deve ser garantida pelas formulações tópicas desenvolvidas, uma vez que os constituintes da formulação são de relevante importância na absorção cutânea do fármaco (LEONARDI, 2004; SILVA et al., 2010).

### 3.2.2 *Administração de produto tópico*

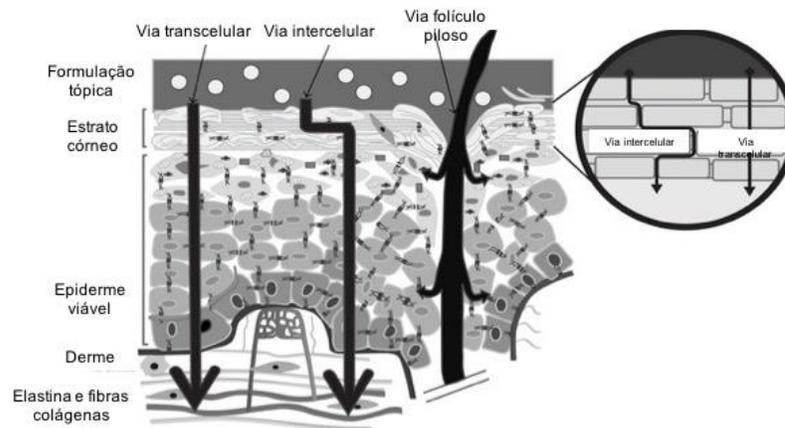
A administração tópica na pele evita o efeito de primeira passagem hepática, promove a liberação do ativo por períodos de tempos mais longos, permitindo assim que constantes concentrações do fármaco estejam disponíveis, além de reduzir efeitos adversos. Dentre outras características, esta via é indolor e não invasiva (BROWN et al., 2006; KARANDE & MITRAGOTRI, 2009; ALEXANDER et al., 2012). Levando em consideração que também existe a necessidade de tratamentos locais, como para as doenças que afetam a pele, a via tópica torna-se a alternativa (KIREJEV & ERICSON, 2013).

Mesmo a via tópica sendo promissora, o desenvolvimento de formulações para aplicação na pele é desafiador, especialmente quando o objetivo é otimizar a permeação e/ou a retenção do fármaco nas camadas da pele, uma vez que esta mesma pele apresenta uma barreira natural à entrada de substâncias (FOLDVARI, 2000; SILVA et al., 2010). Dessa forma, para possibilitar a passagem do fármaco, existe a necessidade de atravessar a barreira hidrofóbica do EC sem danificá-la permanentemente (NAIK et al, 2000; ALBERTI et al., 2001; ALEXANDER et al., 2012). Além

do mais, uma vez que o ativo é liberado da formulação, a concentração no local desejado irá depender de vários fatores, como: espessura da pele, grau de hidratação da pele, peso molecular da substância ativa e lipofilia do princípio ativo (FURLANI et al., 2012).

Bemvindo (2006) cita que para o fármaco estar presente no local de ação, ele deve penetrar o estrato córneo. As rotas da absorção percutânea de compostos através da pele podem ocorrer através das vias transcelular, intercelular e dos apêndices cutâneos (Figura 6).

**Figura 6** - Representação esquemática das diferentes rotas de absorção percutânea de compostos através da pele.



Fonte: Adaptado de Bolzinger et al., 2012.

Uma vez que o fármaco é liberado da forma farmacêutica, é mencionado na literatura que a absorção através da pele ocorre geralmente pela difusão. Esse processo pode ser avaliado através da equação de difusão de Fick (HADGRAFT, 2001; MORROW et al, 2007).

$$J = \frac{KD\Delta C}{h} \quad (1)$$

No qual:

- J é o fluxo
- h é o tamanho do caminho percorrido na difusão
- K é o coeficiente de partição
- D é o coeficiente de difusão

- $\Delta C$  consiste na diferença de concentração do ativo na pele.

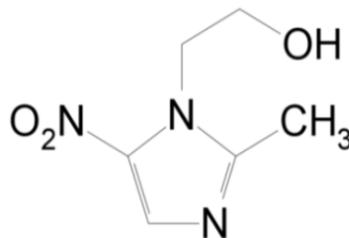
Atualmente, diversas formas farmacêuticas estão disponíveis e dentre elas destacamos os géis (UEDA, 2009; BENSON, 2012). Os géis, forma farmacêutica objeto deste estudo, são preparações de consistência semi-sólida, definidos como dispersões coloidais. Apresentam baixo grau de toxicidade, e são de fácil aplicação (LOPES et al., 2006; UEDA, 2009; BENSON, 2012). Ainda na literatura é mencionado que os géis são sistemas que apresentam alta segurança (JUSTIN-TEMU et al., 2004; ANSEL et al., 2007).

Apesar das suas diferentes propriedades físico-químicas, fármacos como metronidazol e lapachol são excelentes ativos para serem veiculados na forma farmacêutica em gel, além de apresentarem eficácia e segurança (MCCLELLAN & NOBLE, 2000; LIRA et al., 2008).

### 3.2.3 Metronidazol

O Metronidazol (MTZ) (Figura 7), é denominado quimicamente como 2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-etanol e tem fórmula molecular de  $C_6H_9N_3O_3$ . Apresenta característica hidrofílica com log de P de -0,02, peso molecular de 171,15 g/mol, apresentando temperatura de fusão de 159°C - 163°C (HANSCH et al., 1995; F. BRAS, 2010, ARAÚJO, 2016).

**Figura 7** - Representação da molécula do metronidazol, forma estrutural.



Fonte: Farmacopeia Brasileira (2010).

Atualmente, o MTZ pode ser utilizado na terapia de várias infecções causadas por bactérias e protozoários, além de ter ação anti-inflamatória (SILVA, 2002; F. BRAS, 2010; ZIP, 2010). Comercialmente existem diversas formas farmacêuticas para administração do metronidazol, e a formulação em gel comercializada no Brasil como ROZEX<sup>®</sup> é utilizada para o tratamento tópico da rosácea (DAHL, 1998, DUARTE, 2017).

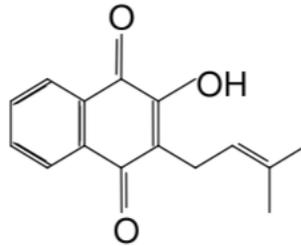
A rosácea consiste em uma patologia que acomete a face sendo de caráter crônico e etiologia desconhecida. Alguns fatores como anormalidades imunológicas e vasculares além da presença do microrganismo *Demodex folliculorum* podem gerar condições que propiciam o processo de desenvolvimento da patologia (ROSSI, 2006; FULLER & MARTIN, 2012).

Não é reportado na literatura os mecanismos pelos o quais o metronidazol atua na remissão da rosácea. Porém, estudos sugerem que o fármaco tem ação inibidora a nível dos mediadores inflamatórios, reduzindo a lesão oxidativa provocada na pele (MCCLELLAN et al, 2000; BARCO & ALOMAR, 2008; LOWE, 2003; CRAWFORD et al., 2004; TWO et al., 2015).

### 3.2.4 Lapachol

O lapachol (LAP) (2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenodiona) (Figura 8), pode ser isolado a partir da árvore *Tabebuia avellanedae* (HUSSAIN et al., 2007).

**Figura 8** - Representação da molécula do lapachol, forma estrutural.



Fonte: Fonseca e colaboradores (2003).

O fármaco apresenta característica lipofílica com baixa solubilidade em água e o peso molecular é de 242,26g/mol. O lapachol é encontrado na forma de cristais na cor amarela. Sua fórmula química é de  $C_{15}H_{14}O$  com temperatura de fusão de 141°C– 143°C e log de P de 2,69 (PISANO et al., 1986; OSSOWSKI et al., 2008; TABOSA et al., 2014; EPIFANO et al., 2014).

No Brasil, o Lapachol já foi comercializado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) na forma de cápsulas para tratamento de neoplasias malignas como adenocarcinoma do aparelho digestivo. Entretanto, foi retirado do mercado devido a sua toxicidade (SILVA et al., 2003; YAMASHITA et al., 2009).

Além do tratamento para neoplasias, estudos descritos na literatura ressaltam a atividade anti-inflamatória do lapachol. Lira e colaboradores (2008), realizaram estudo com lapachol na forma farmacêutica gel e foi relatado que o fármaco apresentou significativa atividade antiedematogênica.

### **3.3 Avaliação Do Comportamento Biofarmacotécnico De Produtos Tópicos**

#### *3.3.1 Estudos de permeação cutânea*

Vários métodos são descritos na literatura para avaliar o perfil de absorção cutânea de fármacos em formulações tópicas. Entretanto, devido à dificuldade de se realizar experimentos *in vivo*, os experimentos *in vitro* são uma grande alternativa, pois possibilitam uma correlação dos dados *in vitro/in vivo* (TANOJO et al., 1997).

Conforme diversos relatos na literatura, a célula de Franz consiste no aparato mais utilizado para realizar os estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* (FRANZ, 1975; ARAÚJO, 2016; LU et al., 2016; LEAL et al.; 2017). A célula de Franz, mostrada anteriormente (Figura 1), apresenta um compartimento receptor e um compartimento doador e entre eles a biomembrana é colocada com a superfície da epiderme voltada para o sistema doador da célula. O uso dessas células é prático e de fácil reprodução (LEVEQUE et al., 2003). No compartimento doador, a formulação em estudo é adicionada sobre a pele ou biomembrana e no compartimento receptor é adicionada uma solução onde as amostras são coletadas. Posteriormente, a concentração do fármaco pode ser avaliada (OECD, 2004; PHARMACOPEIAL, 2006).

Nos estudos de permeação cutânea, a biomembrana mais aconselhada a ser utilizada consiste na pele humana *ex vivo* que geralmente é proveniente de cirurgia plástica (FRANZ et al., 2011; VERBAAN et al., 2008). Embora a pele humana seja a melhor opção para a realização dos estudos, muitas vezes é inviável em uma rotina laboratório a sua utilização devido a limitada disponibilidade.

Sendo assim, ainda existe uma busca constante por mais modelos de biomembranas que sejam compatíveis com a pele humana. Como mencionado anteriormente, a pele de porco é a mais utilizada como modelo (BARBERO & FRASCH, 2009; PANCHAGNULA et al., 2005).

Uma vez que todo o protocolo é previamente definido para o desenvolvimento dos estudos de permeação cutânea *in vitro*, os parâmetros estabelecidos devem ser cuidadosamente seguidos e

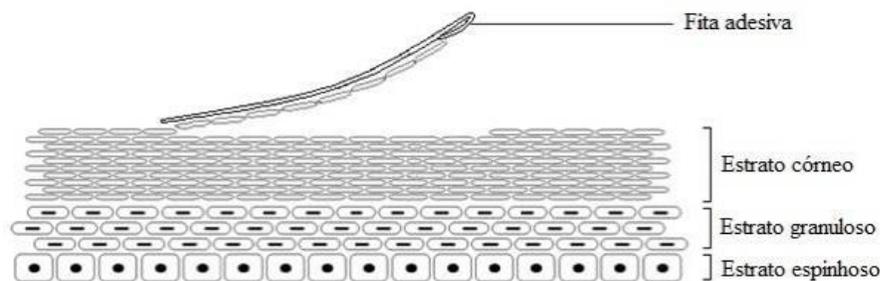
mantidos em todo o decorrer dos estudos. Assim, é possível garantir, dentro outros fatores, a reprodutibilidade na metodologia e segurança nos resultados.

### 3.3.2 Estudos de dermatofarmacocinética

Uma vez realizado o estudo de permeação, a quantificação do fármaco nas camadas mais superficiais da pele ou da biomembrana podem ser avaliadas. Isto é realizado pela metodologia da dermatofarmacocinética (DPK) através da técnica de *tape-stripping*.

A dermatofarmacocinética consiste em uma metodologia na qual é possível determinar a concentração de fármaco no estrato córneo em função do tempo. A avaliação ocorre através da técnica de *tape-stripping*, em que a remoção das camadas do estrato córneo é realizada com fitas adesivas (Figura 9). Através desta metodologia, a quantidade de fármaco retida no estrato córneo ao longo do estudo pode ser quantificada (N'DRI-STEMPFER et al., 2008; NARKAR, 2010).

**Figura 9** - Representação da remoção das camadas de estrato córneo com fita adesiva.



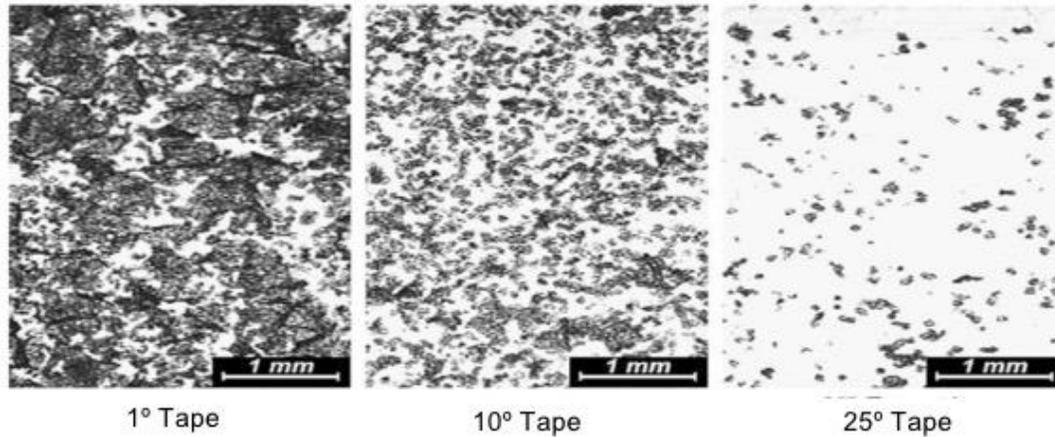
Fonte: Kanfer (2010).

Esta técnica de *tape-stripping* permite a obtenção dos dados da DPK e consiste em um procedimento não invasivo que pode ser usado tanto nos estudos *in vitro* quanto *in vivo* (MOSER et al., 2001; FLUHR et al., 2002).

Durante a execução da técnica, a quantidade de EC removida por uma única fita adesiva irá depender de alguns parâmetros. Como exemplo, a espessura do EC, quantidade de força sob a fita ao remover o EC, tipo de fita adesiva, duração da aplicação dessa força, características das substâncias em estudo, dentre outros (BLACK et al., 2000; LOFFLER et al., 2004; BRETERNITZ et al., 2007). Diante disto, o protocolo desenvolvido deve ser devidamente executado pelo pesquisador visando a reprodutibilidade da pesquisa.

Outra questão relevante relacionada a técnica consiste no número de fitas necessárias para a remover o estrato córneo. Com o aumento do número de fitas, a quantidade de corneócitos torna-se cada vez menor, como demonstrado na figura 10 (LADEMANN et al., 2009).

**Figura 10** - Imagem do corneócitos presentes na fita adesiva durante a remoção sequencial do estrato córneo através da técnica de *tape-stripping*.



Fonte: Adaptado de Lademann et al. (2009).

Baseando-se em dados da literatura e no trabalho desenvolvido por Lademann e colaboradores (2009), o protocolo de estudo desta pesquisa padronizou o uso de 30 fitas por pele para serem removidas sequencialmente. Ainda analisando a figura 10, é possível perceber que a existe uma relativa quantidade de EC no *tape-stripping* de número 25, portanto, ao se padronizar 30 fitas, a segurança de remoção de uma maior quantidade do estrato córneo pode ser garantida.

Como mencionado nos estudos de permeação, na dermatofarmacocinética também é de extrema importância escolher o melhor modelo preditivo de membrana. A pele humana deve ser utilizada sempre que estiver disponível para avaliar as propriedades de permeação do fármaco, no entanto, na falta de amostra de pele, seja pela quantidade, tamanho e viabilidade, deve-se utilizar a pele de animal (HENNING et al., 2009; SCHMOOK et al., 2001).

O estudo de dermatofarmacocinética, ainda pode vir a ser utilizado como substituição aos testes clínicos nos estudos de bioequivalência para avaliação de produtos tópicos, por ser uma metodologia rápida com um menor número de voluntários e boa correlação *in vitro/ in vivo* (SHAH et al., 1998; BHASKAR et al., 2010; ARAÚJO 2016).

Considerando os resultados do DPK, no qual os fármacos podem ser quantificados no estrato córneo, e ao acrescentar as informações do estudo de retenção (epiderme e derme) e do líquido receptor, o perfil de permeação *in vitro* do ativo na pele pode ser mais bem definido.

### 3.3.3 Correlação *in vitro/in vivo* de produtos tópicos através da dermatofarmacocinética

A correlação *in vitro/in vivo* auxilia no estabelecimento da relação entre uma resposta *in vitro* e uma possível resposta *in vivo*. Nesse sentido, há uma crescente busca por metodologias *in vitro*, onde os resultados possibilitem uma correlação segura com os estudos *in vivo* (FDA, 1998; UPOOR, 2001; EMAMI, 2006).

Porém, essa correlação na área de avaliação de produtos tópicos apresenta algumas adversidades (GODIN & TOUITOU, 2007). Em relação aos estudos *in vivo*, metodologias como os estudos clínicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos além de serem invasivas, em alguns casos, precisam de um grande número de voluntários (NARKAR, 2010). Alternativamente, uma das formas de avaliação das formulações tópicas tanto *in vitro* quanto *in vivo* é através da dermatofarmacocinética.

Na literatura são encontrados estudos de dermatofarmacocinética que apresentam reprodutibilidade na coleta de estrato córneo. Por exemplo, estudos realizados *in vitro* e *in vivo* com fármacos de ação antifúngica e antibacteriana obtiveram resultados seguros utilizando a DPK como metodologia avaliativa (ARAÚJO, 2016; DUARTE, 2017; LEAL et al., 2017).

Estudos utilizando a DPK para avaliação de produtos tópicos ainda demonstram que 14 participantes são suficientes para gerar resultados confiáveis e que possibilitem a determinação de uma correlação *in vitro / in vivo* (HERKENNE, 2006a; SHAH, 2005; ARAÚJO, 2016).

Diante dessas informações, a dermatofarmacocinética é uma metodologia eficaz que pode ser aplicada como forma de avaliação *in vitro* e *in vivo* de produtos tópicos, além do mais, é de fácil, requer um menor número de voluntários e não é invasiva (BRADDY et al., 2015).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Materiais

Foi utilizado o lapachol (cedido pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco), metronidazol (cedido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, lote no16754 ), Tween 80 (Vetec®), etanol (Vetec®), acetonitrila (JT Baker®), metanol (JT Baker®), filtros de seringa e membranas de ésteres de celulose 0,45µm e 0,22 µm (Millipore®), fita adesiva (Book Scotch Tape, 3M, St. Paul, MN), swab de álcool isopropílico (Biosoma®), água purificada (Milli<sup>Q</sup>®), tesouras, bisturis e pinças. Todos os solventes utilizados nas análises foram de grau analítico.

### 4.2 Formulações Avaliadas

Neste estudo foram utilizados dois diferentes tipos de fármacos, ambos na forma farmacêutica gel e os componentes são descritos na tabela 2. A formulação em gel contendo metronidazol 0.75% foi obtida de acordo com Araújo (2016) e a formulação geleificada contendo lapachol 0,5% foi obtida de acordo com o descrito por Tabosa (2014).

**Tabela 2** - Composição qualitativa e quantitativa (%) do gel de lapachol e metronidazol.

COMPOSIÇÃO (%)	LAPACHOL	METRONIDAZOL
Carbopol Ultrex®	0.5	1
Tween 80®	0.025	—
Trietanolamina	pH8.0	—
NAOH	—	pH 4.0
Etanol	28	—
Glicerina	12	—
Lapachol	0.5	—
Metronidazol	—	0,75
Propilparabeno	—	0,02
Metilparabeno	—	0,18
Propilenoglicol	—	5
EDTA	—	0,05
Água q.s.p.	100	100

### 4.3 Caracterização Físico-Química

#### 4.3.1 Determinação do pH

O pH foi medido através de pHmetro PG 1800 (GEHAKA), previamente calibrado (pH 7,0 e pH 4,0), à temperatura ambiente.

#### 4.3.2 Espalhabilidade

Uma placa de vidro foi colocada sobre papel milimetrado e 0,5 g de cada formulação foi adicionado no centro do papel. Em seguida, placas com pesos conhecidos foram colocadas sucessivamente uma sobre a outra até um total de 5 placas. O diâmetro para cada placa foi aferido e o método seguido foi adaptado de Borghetti & Knorst (2006). Os resultados obtidos foram aplicados na equação abaixo e a espalhabilidade determinada:

$$Ei = d^2 \frac{\pi}{4} \quad (2)$$

No qual,  $Ei$  é a espalhabilidade da amostra para um determinado peso  $i$  (mm<sup>2</sup>) e  $d$  consiste no diâmetro médio (mm).

#### 4.3.3 Viscosidade e reologia

A reologia e viscosidade para cada gel foi determinada com o auxílio do viscosímetro rotacional Rheology International Digital. Todas as medidas foram efetuadas a 25°C±2 °C e a viscosidade aparente de cada formulação foi verificada com velocidade de rotação do *spindle* a 30 rpm.

#### 4.3.4 Teor

Para a análise do teor da formulação contendo o metronidazol, 500 mg do gel de metronidazol foi extraído com 5 mL de N,N-dimetilformamida, seguido de aquecimento à temperatura de 60°C. Posteriormente, as amostras foram diluídas em metanol e água na proporção de 1:1, filtradas e analisadas (BEDOR et al, 2008). Para a formulação contendo o lapachol, o teor foi analisado através da pesagem de 500 mg do gel, método adaptado de Bedor (2008). Finalizada

a extração, as amostras foram filtradas e analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV).

#### **4.4 Avaliação Do Potencial Irritante Das Formulações**

##### *4.4.1 Teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP)*

A metodologia utilizada teve como base as diretrizes do protocolo nº 437 da OECD. Os olhos de boi foram adquiridos em matadouro local (Paulista - PE) e para a realização do BCOP, 4 córneas por formulação foram necessárias.

Como controles, solução salina (NaCl 0,9% p/v) para negativo e solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N para positivo. Antes de iniciar o procedimento, as córneas foram submetidas a uma avaliação de integridade e caso fosse evidenciada alguma lesão, as mesmas não seriam utilizadas. Em seguida, as córneas foram excisadas e colocadas no suporte do opacitômetro com *Minimum Essential Medium Eagle* (EMEM) e incubadas por 1 hora a 32 °C.

Após esse tempo, a primeira leitura da opacidade foi obtida e o EMEM foi removido da câmara anterior para adição de 750 µL de formulação que permaneceu em contato com as córneas por 10 minutos. Posteriormente, as formulações foram removidas das córneas com lavagens e incubadas por 2 horas a 32 °C, após esse processo a opacidade final foi avaliada.

Para avaliação da permeabilidade, foi adicionado 1 mL de solução de fluoresceína sódica a 0,4% por 90 minutos com posterior remoção. Todo o meio contido na câmara posterior do opacitômetro foi avaliado na densidade óptica de 490nm. O cálculo do índice de irritação *in vitro* (IVIS) foi estabelecido com a equação abaixo, seguido de classificação final do potencial irritante (Tabela 3).

$$IVIS = \text{valor médio de opacidade} + ( 15 \times \text{média permeabilidade OD 490 valor} ) \quad (3)$$

**Tabela 3** - Classificação final do potencial irritante no BCOP.

Índice de irritação	Classificação
$\leq 3$	Sem categoria
$> 3 \leq 55$	Não determinado
$> 55$	Categoria 1

Fonte: OECD, 2013.

#### 4.4.2 Teste em Membrana Cório-alantoide de Ovo de Embrionado de Galinha (HET - CAM)

Para execução do teste HET-CAM, ovos fertilizados de galinha do tipo *Specific Pathogen Free* (SPF), da raça White Leghorn, foram adquiridos. Os ovos permaneceram incubados por período igual de 10 dias, em chocadeira automática na temperatura de  $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de 65%. Como controles, solução salina (NaCl 0,9% p/v) para negativo e solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N para positivo.

A técnica foi conduzida com seis ovos para cada formulação. No décimo dia de incubação, a membrana da casca foi removida, expondo a membrana corioalantóide (CAM). Na sequência, 300  $\mu\text{L}$  de formulação foi adicionado sobre a superfície da membrana cório-alantóide. Após o período de contato de 20 segundos, mediante lavagem com solução salina, a formulação foi removida e a membrana (CAM) observada por 5 minutos para determinar o aparecimento dos possíveis efeitos irritantes: hiperemia, hemorragia e coagulação. Pontuações foram atribuídas para cada efeito evidenciado (Tabela 4) e o potencial irritante definido (Tabela 5).

**Tabela 4** - Pontuações atribuídas as alterações evidenciadas na membrana cório-alantoide.

Efeito	Tempo	$\leq 30$ segundos	$30 \text{ segundos} < t \leq 2$ minutos	$2 \text{ minutos} < t \leq 5$ minutos
		Hiperemia	5	3
Hemorragia	7	5	3	
Coagulação	9	7	5	

Fonte: Journal Officiel de la Republique Française (1996).

**Tabela 5** - Classificação final do potencial irritante no HET - CAM.

<b>Faixa</b>	<b>Classificação Final</b>
<b>0,00 a 0,99</b>	Não irritante
<b>1,00 a 4,99</b>	Irritante Leve
<b>5,00 a 8,99</b>	Irritante moderado
<b>9,00 a 21,00</b>	Irritante severo

Fonte: Journal Officiel de la Republique Française (1996).

## 4. 5 Estudo de Liberação

### 4.5.1 *Preparo da membrana*

Para os estudos de liberação *in vitro* foi utilizado membrana sintética de ésteres (acetato) de celulose (Millipore®; lote 02690), porosidade de 0,45µm, com prévia hidratação em tampão fosfato pH 7,4 por um período de 12 horas.

### 4.5.2 *Montagem da célula de Franz*

O equipamento utilizado foi o microette (Vision®), na qual consiste em um sistema de células de Franz automatizado. O compartimento doador foi preenchido com tampão fosfato (PBS), pH 7,4, para o metronidazol e tampão fosfato pH 7.4 com polioxietileno 20-oleil éter (Brij 98®) 4% para o lapachol. Foram adicionados 100 mg do gel de metronidazol e 300 mg do gel de lapachol no compartimento doador do sistema, no qual foi agitado magneticamente a 600 rpm na temperatura de 32± 0,5°C. Toda a metodologia foi mantida nas condições *sink*.

### 4.5.3 *Coleta e quantificação das amostras*

Coletas de 3mL foram realizadas nos tempos de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 e 6.0 horas. Essas amostras foram filtradas em membrana de 0,22µm. As amostras foram quantificadas através de CLAE com métodos previamente validados, para o lapachol o protocolo seguido foi de o descrito por Fonseca (2004) e para o metronidazol o descrito por Melo (2016). Os valores obtidos foram calculados para definir a quantidade real liberada (equação 4). As análises foram realizadas em

sextuplicatas para cada formulação e os resultados foram definidos de acordo com o modelo de cinética adequado.

$$Q_{\text{real}} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad (4)$$

Onde:

$Q_{\text{real}, t}$  = quantidade real permeada referente ao tempo t ;

$C_t$  = concentração obtida referente ao tempo t;

$V_r$  = volume da solução receptora (6 mL)

$C_c$  = concentração da amostragem anterior

$V_c$  = volume coletado

#### 4.5.4 Análise da cinética de liberação *in vitro*

Para a avaliação da cinética de liberação do metronidazol e lapachol, os resultados foram plotados em gráficos de dispersão XY, característicos de três modelos de cinética:

- Ordem zero: quantidade liberada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *versus* tempo (h);
- Higuchi: quantidade liberada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *versus* raiz do tempo (h);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *versus* tempo (h).

Diante das análises de regressão linear para os dois fármacos, foi obtido o coeficiente linear (r) para cada modelo de cinética e o que apresentou valor de r mais próximo a 1 foi selecionado. A taxa de liberação é correspondente à inclinação (a) da porção linear do modelo de cinética definido (COSTA & LOBO, 2001).

#### 4.6 Obtenção E Dermatômização Da Pele De Porco

As três diferentes regiões da pele de porco (dorso, orelha e ventre) foram obtidas em matadouro local (Paulista - PE). Para garantir a total integridade das amostras de pele obtidas, essas foram removidas pós-sacrifício e imediatamente trazidas para o NUDFAC a fim de evitar a exposição das peles ao processo de limpeza habitual em alta temperatura. As peles foram lavadas com água e com o auxílio de bisturis e tesouras, o excesso da camada gordurosa e o excesso de pelos visíveis foram removidos. Em seguida, as peles do dorso e ventre foram dermatomizadas a

uma espessura de aproximadamente 700 $\mu$ m com o auxílio do dermatômetro (Zimmerair dermatome, Dover, Delaware) e armazenadas a -20°C até a utilização. Antes da utilização, a pele foi retirada do armazenamento de -20°C para descongelar durante 15 minutos.

#### **4.7 Análise Microscópica**

Amostras dos diferentes locais da pele de porco (dorso, orelha e ventre), foram submetidas a cortes histológicos para que as camadas da pele pudessem ser evidenciadas e identificadas, objetivando também a visualização da integridade do estrato córneo das diferentes regiões da pele do animal antes de iniciar os estudos. Foram analisadas 3 amostras de cada local da pele de porco.

Com posterior fixação em parafina, os cortes histológicos foram submetidos a técnica de coloração denominada Tricrômio de Masson. O método de coloração escolhido proporciona a análise de fibras de colágeno, conferindo a coloração azul/esverdeado, e de queratina, coloração vermelha. O método foi baseado no Técnico em Citopatologia do Ministério da Saúde (2012).

As lâminas obtidas foram visualizadas em microscópio ZEISS e fotografadas na objetiva de 40x, com auxílio do software Axion Vison versão 4.8.2 SP3, em colaboração com o Departamento de Histologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

#### **4.8 Estudo De Permeação Cutânea *In Vitro***

Foram realizados experimentos de permeação cutânea nas peles do dorso, orelha e ventre do porco utilizando-se o gel de metronidazol a 0,75% e o gel de lapachol a 0,5%. Para cada região da pele avaliada foi obtido um total de 14 amostras.

Antes de iniciar o estudo foi necessário verificar a função de barreira da pele, através da perda de água transepidérmica (TEWL) com auxílio do equipamento Tewameter (Courage + Khazaka eletrônico GmbH -CK eletrônico).

Antes do experimento, a pele, previamente dermatomizada, foi descongelada à temperatura ambiente e, em seguida, cortada em seções de tamanho suficiente para caber nas células de difusão de Franz automatizadas (VISION® MICROETTE™). No compartimento doador, foram adicionados 100 mg da formulação de metronidazol e 300 mg do lapachol sobre a pele em estudo (orelha, ventre e dorso), com posterior fechamento das células de forma hermética. O lado dérmico da pele foi mantido em contato com o líquido receptor (câmara receptora) constituído por tampão fosfato de sódio monobásico (20 mM) pH 7,4, para o metronidazol e tampão fosfato pH 7.4 com

polioxietileno 20-oleil éter (Brij 98<sup>®</sup>) a 4% para o lapachol (TABOSA et al., 2014; ARAÚJO, 2016). Todas as células foram montadas num aparato de difusão na qual a temperatura da superfície da pele foi mantida à  $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Ao fim de 6 horas de permeação, uma única coleta do conteúdo da câmara receptora foi realizada. Toda a metodologia foi mantida nas condições *sink*.

As amostras foram filtradas e quantificadas por CLAE-UV, por método descrito por Melo e colaboradores (2016) para o metronidazol e por Fonseca (2004) para o lapachol. A quantidade permeada dos fármacos obtidas no compartimento receptor foram calculadas levando-se em consideração o volume total da célula ( $\pm 6$  mL) e a área de exposição no compartimento doador ( $1,77 \text{ cm}^2$ ).

#### **4.9 Estudo De Dermatofarmacocinética *In Vitro***

Uma vez finalizado o experimento de permeação, a quantidade do fármaco retido na pele de porco ao final do estudo foi examinada através da dermatofarmacocinética. Com o auxílio de swab embebido com álcool isopropílico (Biosoma<sup>®</sup>), uma limpeza para remover a formulação residual na superfície da pele foi realizada. A abordagem utilizada nesses experimentos foi baseada no protocolo publicado por N'Dri-Stempfer *et al.* (2009).

O estrato córneo (EC) foi removido por *tape-stripping* com o uso de fitas adesivas (NARKAR, 2010). Cada fita foi previamente pesada antes da sua utilização. Após a remoção do estrato córneo a mesma fita foi pesada novamente em uma balança de precisão (Sartorius), para determinar a massa e a espessura da camada do EC removido (KALIA et al., 2001; HERKENNE et al, 2006; LEAL et al., 2017). Foram utilizadas 30 fitas adesivas (Book Scotch Tape, 3M, St. Paul, MN) por unidade de pele analisada, somando assim um total de 2520 fitas nas análises realizadas para o metronidazol e lapachol.

Em seguida, a área da pele tratada foi excisada a partir do centro da amostra de pele e triturada (ULTRA TURRAX<sup>®</sup>) e sonicada para a quantificação de fármaco nas camadas da epiderme e derme com posterior extração. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada após a extração.

## **4.10 Estudo De Dermatofarmacocinética *In Vivo***

### *4.10.1 Comitê de ética em pesquisa*

O estudo foi aprovado para o fármaco metronidazol pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 34657814.2.0000.5208) e foi conduzido de acordo com a Declaração de Princípios de Helsinque e de acordo com as Diretrizes para Boas Práticas Clínicas. Todos os participantes receberam uma descrição detalhada sobre o estudo e consentimento prévio foi obtido por escrito.

Os critérios de inclusão foram: idade entre 18-72 anos; homem ou mulher não grávida de qualquer origem étnica; saudável; não fumante; disposição para fornecer informações básicas (ex., idade, altura, peso, sexo e etnia); fornecer consentimento por escrito antes do início de qualquer procedimento de estudo; concordar em não participar de outro ensaio clínico durante o período de estudo; capaz de se comunicar bem com os investigadores; capaz de aderir às restrições e ao cronograma do estudo; possuir antebraço de pelo menos 22 cm de comprimento já que a área de trabalho começa, pelo menos, 5 cm do pulso e termina com um mínimo de 0,5 cm abaixo da fossa antecubital.

Os critérios de exclusão foram: história relatada pelo participante da pesquisa ou evidente para o investigador de doença infecciosa ou infecção de pele ou de doença de pele crônica (por exemplo, psoríase, dermatite atópica); doenças de pele hereditárias ou quaisquer condições inflamatórias da pele, conforme relatado pelo participante ou evidente para o investigador; excesso de pigmentação, pelo, defeitos da pele, queimaduras solares, manchas ou tatuagens, que possam interferir com a avaliação do fármaco; grávida ou lactantes; obesos com  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ; fumante e/ou ter consumido álcool nas 24 horas anteriores ao estudo com base em informações fornecidas pelo participante; participação em qualquer outro ensaio clínico ou estudo de cosmético; utilização simultânea de quaisquer medicamentos de uso tópico na área do local de teste, ter realizado exercício extenuante durante o período do estudo; planejar expor os antebraços à luz solar / UV na semana seguinte participação; incapacidade de atender a todos os pontos de tempo de coleta de dados; qualquer reação adversa prévia ou hipersensibilidade ao fármaco em estudo ou aos outros excipientes das formulações testadas ou às fitas adesivas utilizadas durante o ensaio; por último, os participantes foram instruídos a abster-se de tomar qualquer medicação 30 dias antes e durante o período do estudo (com exceção do uso de contraceptivos nas participantes do sexo feminino).

#### 4.10.2 Tolerabilidade

A tolerabilidade dos voluntários frente a pesquisa realizada foi avaliada registrando os possíveis eventos relatados pelos participantes e observados com o decorrer do estudo pelo pesquisador.

#### 4.10.3 Procedimento de DPK

No dia do estudo, o antebraço dos voluntários foi higienizado com o auxílio de swab embebido com álcool isopropílico (Biosoma®). Cada local de aplicação (2,54 cm<sup>2</sup>) foi demarcado com uma moldura em forma circular de adesivo (Book Scotch Tape, 3M, St. Paul, MN, EUA) e 143 mg da formulação de metronidazol 0,75% foi aplicada em 2 locais de tratamento em cada braço com posterior oclusão (Figura 11). Um local não tratado foi utilizado como controle negativo (sem fármaco).

**Figura 11** - Imagem do antebraço contendo gel de metronidazol em dois locais de tratamento e mais um controle mediante oclusão. A- Antebraço esquerdo, 1 e 2 local de aplicação do gel de metronidazol, 3 controle.



Fonte: Acervo pessoal.

Após 6 horas de contato com a pele, a formulação residual foi removida dos locais de aplicação com o auxílio de swabs contendo álcool isopropílico (Biosoma®). A verificação da função de barreira da pele dos participantes também foi medida através da perda de água

transepidérmica (TEWL) como o auxílio do Tewameter (Courage + Khazaka eletrônico GmbH - CK eletrônico).

Os locais de aplicação foram delimitados por um molde de 1,77 cm<sup>2</sup> e foi realizado o procedimento de *tape-stripping*. O estrato córneo dos participantes foi removido sequencialmente com 30 fitas adesivas (Book Scotch Tape, 3M, St. Paul, MN, EUA). Como realizado para o procedimento de *tape stripping - in vitro*, cada fita foi pesada antes e após a remoção do estrato córneo em uma balança de precisão (Sartorius®), para a determinação da massa e da espessura da camada do EC removido (HERKENNE *et al*, 2006; KALIA *et al.*, 2001).

O metronidazol presente em cada fita posteriormente foi extraído de acordo com método descrito por Araújo (2016) e analisado por CLAE-UV por método de acordo com Melo e colaboradores (2016).

O perfil de concentração do fármaco (C em função da posição de profundidade x) no estrato córneo após 6 h foi ajustado segundo a equação da 2ª lei de difusão de Fick abaixo, para concentração no veículo considerada constante (C<sub>veh</sub>) na superfície (x = 0) do estrato córneo inicialmente livre de fármaco. A partir da equação abaixo foi possível obter os valores de coeficiente de partição (K), difusividade (D/L<sup>2</sup>), coeficiente de permeabilidade através do estrato córneo (K<sub>p</sub>) e o fluxo do estado estacionário (J<sub>ss</sub>).

$$C = K \cdot C_{veh} \left\{ \left( 1 - x/L \right) - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\sin(n\pi x/L)}{n} \cdot \exp\left(-\left(D/L^2\right)n^2\pi^2 t\right) \right\} \quad (5)$$

#### 4.11 Processo De Extração

Ao final do procedimento de *tape-stripping* realizado *in vitro* e *in vivo*, as fitas foram separadas em tubos do tipo eppendorf na ordem: as primeiras 14 fitas foram colocadas em cada tubo isoladamente e a partir da fita número 15 à 26 foram colocadas três a três em cada eppendorf, as últimas 4 últimas fitas foram adicionadas em um único tubo.

Para o processo de extração em cada tubo foi adicionado 1 mL de metanol para extração do lapachol e 1mL de acetonitrila para extrair o metronidazol (TABOSA, 2014; ARAÚJO, 2016).

Ainda em relação ao processo de extração do metronidazol, foi também adicionado 1 mL de água ultra-pura ao final do período de agitação. As amostras na sequência foram filtradas e submetidas à análise por CLAE.

#### 4.12 Doseamento das Amostras por CLAE-UV

As amostras foram doseadas por um método previamente desenvolvido e validado, de acordo com as normas estabelecidas pela RE 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC).

##### 4.12.1 *Metronidazol*

A quantificação foi realizada utilizando os parâmetros cromatográficos de acordo com o descrito por Melo e colaboradores (2016). As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu equipado com detector ultravioleta (UV).

**Tabela 6** - Condições cromatográficas do método descrito por Melo e colaboradores (2016) utilizado para a quantificação do metronidazol por CLAE-UV.

Condições Cromatográficas (Metronidazol)	
<b>Coluna</b>	Coluna Shim-pack C18 150 x 4,60 mm (Shimadzu®)
<b>Modo de eluição</b>	Isocrático
<b>Fase móvel</b>	Fosfato de sódio monobásico 20 mM pH 3,0: acetonitrila (88:12)
<b>Fluxo</b>	1,0 mL/min
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Comprimento de onda</b>	320nm
<b>Temperatura</b>	35°C
<b>Tempo de retenção</b>	4,5 min.

#### 4.12.2 *Lapachol*

A quantificação foi realizada de acordo com o método adaptado de Fonseca (2004) (Tabela 7). Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu equipado com detector ultravioleta (UV).

**Tabela 7** - Condições cromatográficas do método utilizado para a quantificação do lapachol por CLAE-UV em método adaptado Fonseca (2004).

<b>Condições Cromatográficas (Lapachol)</b>	
<b>Coluna</b>	Coluna 100 RP-18 (250 x 4 mm, 5 $\mu$ m) (Lichrospher <sup>®</sup> )
<b>Modo de eluição</b>	Isocrático
<b>Fase móvel</b>	Metanol:solução de ácido acético 5% (80:20)
<b>Fluxo</b>	1,0 mL/min
<b>Volume de injeção</b>	20 $\mu$ L
<b>Comprimento de onda</b>	278nm
<b>Temperatura</b>	—
<b>Tempo de retenção</b>	5,3 min.

#### 4.13 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e analisados usando o software GraphPad Prism<sup>®</sup>. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA com nível de significância definido como  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização Físico-Química

O desempenho de uma forma farmacêutica depende dentre outros fatores da sua eficácia e segurança. Uma das formas de avaliação das formulações consiste na realização dos testes de caracterização físico-química em que informações relevantes acerca do produto são obtidas. Os estudos de caracterização dos géis deste trabalho foram conduzidos para determinar o pH, a espalhabilidade, o teor e o comportamento reológico.

Em relação a caracterização organoléptica, o gel de metronidazol e o placebo demonstraram cor levemente amarelada e inodoros. O gel de lapachol e o placebo permaneceram inodoros, porém com cores diferentes. O placebo permaneceu incolor e o gel contendo o fármaco apresentou coloração vermelha devido a correção do pH do meio. O lapachol dissolve-se em soluções alcalinas e na presença de hidróxido de sódio ocorre a formação de um sal sódico que confere a cor vermelha brilhante (FONSECA, 2001; TABOSA, 2014).

#### 5.1.1 Avaliação do pH e teor

O valor de pH obtido para o gel contendo metronidazol foi de  $4,43 \pm 0,1$  e para o placebo de  $5,4 \pm 0,5$  (Tabela 8). Mesmo havendo mudanças de leve no valor do pH com a presença do fármaco na formulação, pesquisa realizada em humanos por Duarte (2017) demonstrou que formulações geleificadas contendo metronidazol nessa mesma faixa de pH, em regime de dose única e contínua (estudo clínico em dose repetida), não foi evidenciado danos na pele dos voluntários ao longo do estudo, fato este corroborado através da avaliação do potencial irritante pelo método do HET-CAM e BCOP realizados neste trabalho e discutidos posteriormente.

**Tabela 8** - Valores de pH e teor das formulações placebo e com metronidazol e lapachol.

Formulação	pH (Média $\pm$ DP)	Teor (% $\pm$ DP)
Gel Placebo MTZ	$5,4 \pm 0,5$	—
Gel de MTZ	$4,43 \pm 0,4$	$97,82 \pm 3,98$
Gel Placebo LAP	$8,15 \pm 0,2$	—
Gel de LAP	$8,10 \pm 0,01$	$98,11 \pm 0,66$

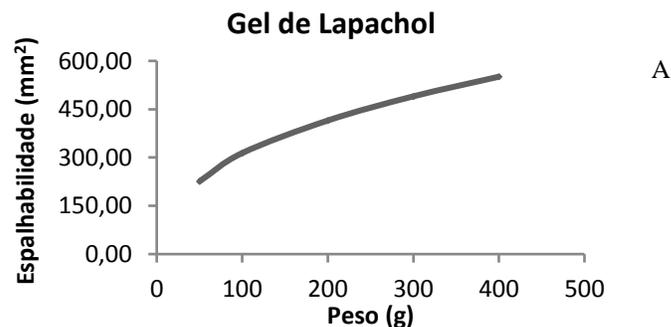
O pH do gel de lapachol apresentou média de  $8,15 \pm 0,2$  e para o placebo de  $8,10 \pm 0,01$ , evidenciando que a incorporação do ativo na formulação não alterou significativamente este parâmetro (Tabela 8). Valores de pH apresentados por Lira e colaboradores (2008) de diferentes formulações tópicas contendo o lapachol apresentaram-se na faixa de 8 o que não difere dos dados obtidos neste estudo. De acordo com Silva e colaboradores (2001) o pH de formulações destinadas ao uso tópico ainda possui valores em uma de faixa de tolerabilidade entre 5,5 - 8,0.

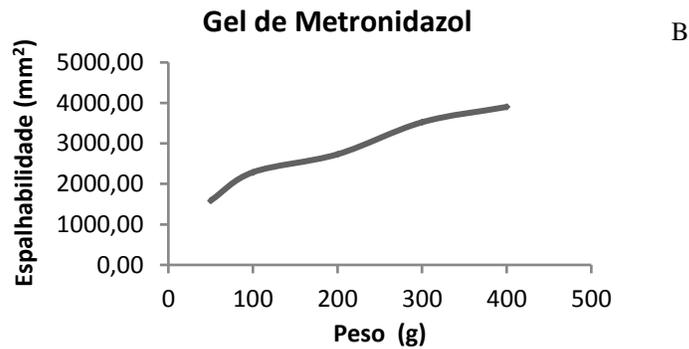
Em relação ao teor, os géis apresentaram teor de fármaco dentro dos limites aceitos (90-110%), segundo a farmacopéia brasileira (BRASIL, 2010). Os valores obtidos para o metronidazol e lapachol foram de respectivamente de 97,82% e 99,04%.

#### 5.1.2 Avaliação da espalhabilidade

A espalhabilidade é definida como a expansão de uma formulação semi-sólida sobre uma superfície após um determinado período de tempo e está relacionada com a aplicação destas formulações no local de ação (FELTKAMP et al., 1983; KNORST, 1991). Esse estudo consiste em uma das características essenciais das formas farmacêuticas que são aplicadas topicamente e a Figura 12 e a tabela 9 apresentam os resultados obtidos.

**Figura 12** - Gráficos obtidos do estudo de espalhabilidade. (A) Gel de Lapachol (B) Gel de Metronidazol.





**Tabela 9** - Valores obtidos relacionados a espalhabilidade.

Formulação	Espalhabilidade
Gel de Metronidazol	2618,27 ± 22,74
Gel de Lapachol	1998,02 ± 20,3

As características da espalhabilidade são importantes tanto do ponto de vista sensorial, como de eficácia (ISAAC et al., 2008). Os géis avaliados apresentaram características de espalhabilidade que podem facilitar a aplicação do produto quando em contato com a pele.

### 5.1.3 Reologia e viscosidade

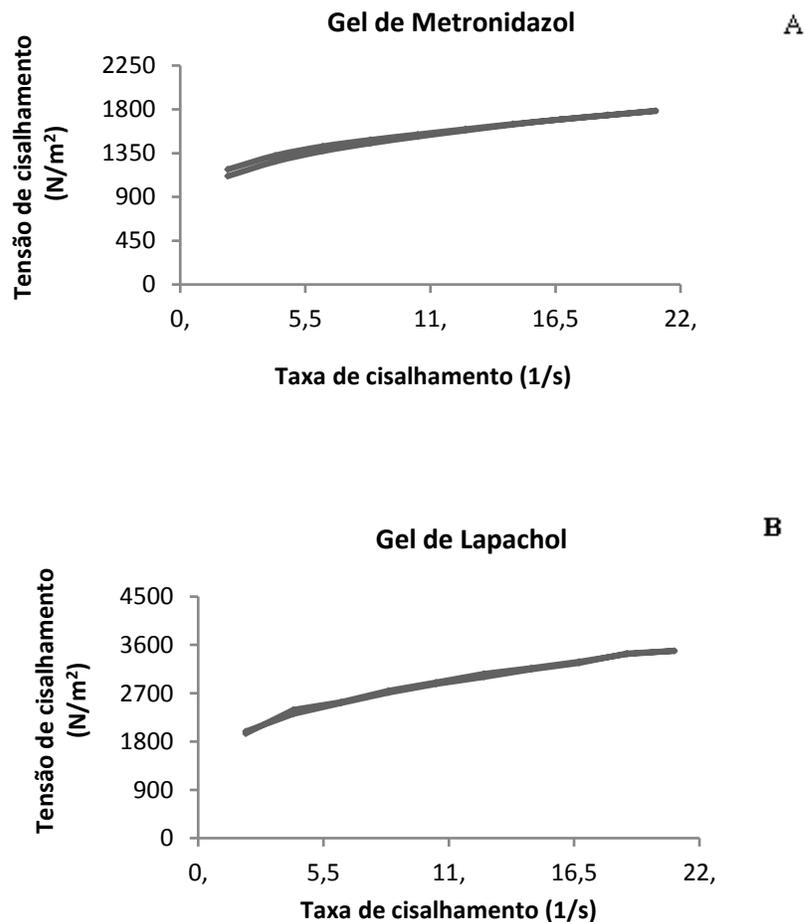
As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas no desenvolvimento de uma forma farmacêutica e cada forma farmacêutica apresenta um comportamento reológico adequado (LEONARDI, 2001). Nos estudos de reologia, as formulações podem ser classificadas em newtonianas e não-newtonianas. O comportamento não newtoniano, ainda apresenta três variações: plástica, pseudoplástica e dilatante (ANSEL, 2000).

O estudo do comportamento reológico das formulações foi avaliado por meio dos reogramas e dos valores de viscosidade aparente obtidos (Tabela 10).

**Tabela 10** - Viscosidade aparente do gel de metronidazol (MTZ) e gel de lapachol (LAP).

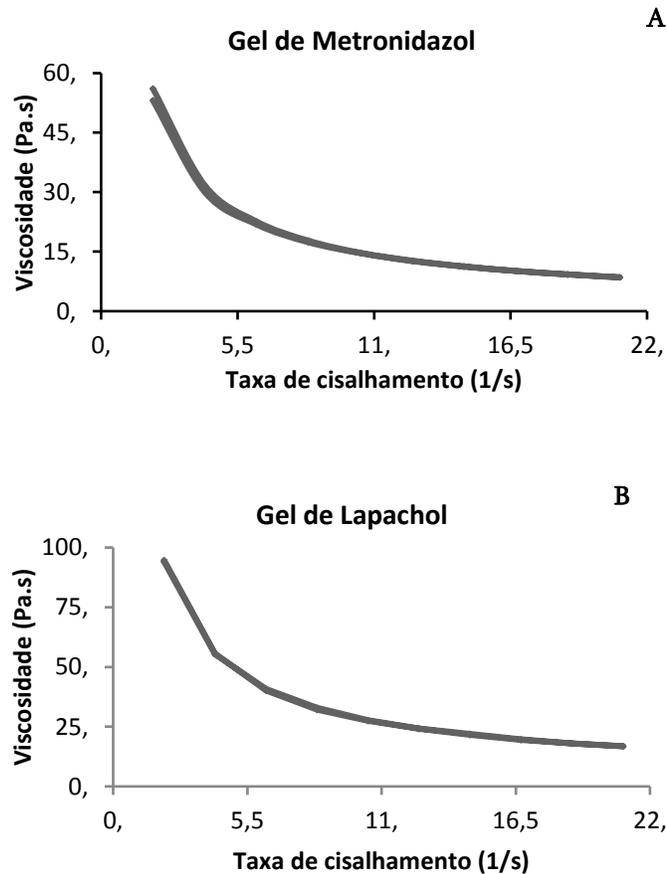
Formulação	Viscosidade aparente (Pa·s) ± DP
Gel de MTZ	39,50 ± 0,7
Gel de LAP	47,34 ± 0,1

Na Figura 13 está apresentado, o gráfico plotado com os valores de taxa de cisalhamento ( $\text{N/m}^2$ ) e os valores de tensão de cisalhamento ( $1/\text{s}$ ), sendo possível visualizar os dados relacionados a reologia dos géis de lapachol e metronidazol.

**Figura 13** - Gráficos de tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento. (A) Gel de Metronidazol (B) Gel de Lapachol.

Os valores obtidos da viscosidade pela taxa de cisalhamento das formulações estão plotados na figura 14.

**Figura 14** - Gráficos de viscosidade x taxa de cisalhamento. (A) Gel de Metronidazol (B) Gel de Lapachol.



Mediante a análise, os géis estudados apresentaram comportamento pseudoplástico. Considerando que as formulações são de aplicação tópica, esse tipo de fluxo pseudoplástico é bastante comum. É observado que os géis têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento (SCHOTT, 1995; LEONARDI, 2001).

Na literatura é mencionado que os géis, na maioria das vezes, apresentam a propriedade de se deformar durante a aplicação facilitando assim o espalhamento. Entretanto, essa deformação é recuperada no momento em que a aplicação é cessada, evitando assim que o gel escorra da superfície da pele (AULTON, 2005).

## 5.2 Avaliação do potencial irritante

A importância de se investigar o potencial de irritação de produtos administrados topicamente é baseado no fato de que, muitas vezes, acidentalmente essas formulações podem entrar em contato com os olhos. E, principalmente, porque normalmente as formulações que não são irritantes para os olhos, também não demonstram potencial de irritação na pele (SOUSA et al., 2016).

### 5.2.1 BCOP

Dentre os testes alternativos validados e aceitos no Brasil, o teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP) é confiável e tem como objetivo a avaliação do potencial de causar danos severos à córnea (DONAHUE et al., 2011; SCHEEL et al., 2011).

De acordo com a metodologia utilizada, a pontuação e classificação das formulações foram definidas (Tabela 11). Os resultados obtidos foram classificados como: “categoria 1”, para danos graves; “sem categoria”, para os que não causam irritação e “não determinado”.

**Tabela 11** - Resultado do teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP).

Formulação	Pontuação (Média ± DP)	Classificação Final
Gel Placebo MTZ	26,3 ± 17,2	Não determinado
Gel de MTZ	15,3 ± 6,6	Não determinado
Gel Placebo LAP	38,40 ± 8,2	Não determinado
Gel de LAP	42,10 ± 6,8	Não determinado
NaOH 0,1N (controle positivo)	410,95 ± 34,8	Categoria 1
NaCl 0,9% (controle negativo)	0	Sem categoria

Mediante análise dos controles, a solução de NaOH 0,1N foi classificada como "categoria 1" o que significa a capacidade de causar danos à córnea. Já a solução de NaCl 0,9% foi classificada como “sem categoria”, esta por sua vez não tem potencial de irritação ocular. Ambos os controles, negativo e positivo, demonstraram os resultados dentro do esperado.

Ao observar a Tabela 11, foi verificado que as formulações de metronidazol estão na classificação de “não determinado”. As substâncias classificadas como não determinadas, devem

ser avaliadas por metodologias mais adequadas, uma vez que o método do BCOP é mais preditivo para substâncias com forte potencial irritante, ou seja, substâncias que causam danos severos na córnea. Quando comparado ao gel placebo, o fármaco presente na formulação não alterou o potencial irritante e a classificação no resultado final. Ao analisar o pH do gel placebo e gel como metronidazol, foi constatado que os mesmos estão dentro da faixa para os produtos não irritantes aos olhos que apresentam entre 4,3 - 8,4 (WORTH & CRONIN, 2001).

Em relação ao lapachol, a Tabela 11 apresenta pontuações que levam aos resultados para classificação de “não determinado”. Através do método do BCOP, tanto o gel placebo quanto o gel contendo fármaco não demonstraram capacidade de causarem potencial irritante com danos graves na córnea. Mesmo com aumento da pontuação média após adição do fármaco, não houve mudança de classificação, permanecendo as preparações sem causar irritação. Além do mais, o pH dos géis relacionados ao lapachol, de acordo com a literatura, encontram-se na faixa de não causar irritação a nível ocular (WORTH & CRONIN, 2001).

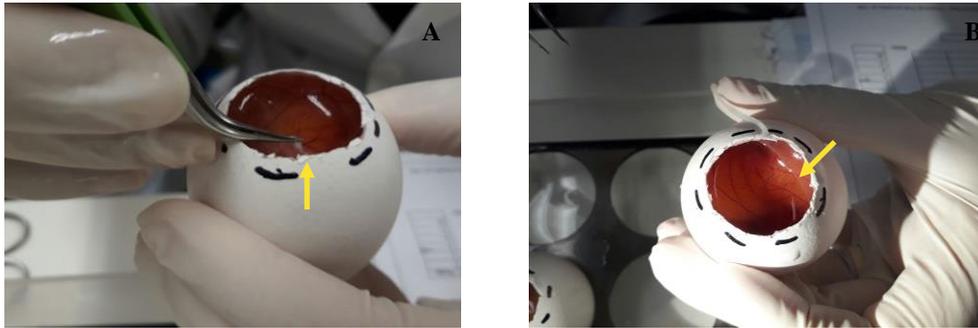
### 5.2.2 HET - CAM

Em acordo com o princípio dos 3R's, diversos guias propagam os estudos e validação de métodos alternativos. Uma das possibilidades para avaliação do potencial irritante consiste nos testes da membrana cório-alantoide do ovo embrionado de galinha.

O HET-CAM identifica e avalia o potencial de irritação leve de substâncias sobre a membrana cório-alantóide (CAM) do ovo embrionado da galinha. Atualmente no Brasil, o HET-CAM está passando pelo processo de validação. Diversos laboratórios estão em fase de teste de substâncias para validação deste método. Entretanto, esse mesmo método já é considerado válido pelo ECVAM (SOUSA, 2016).

No décimo dia de incubação a membrana da casca do ovo foi removida, expondo assim a membrana corioalantóide (CAM) (Figura 15).

**Figura 15** - Ovo de galinha fertilizado da raça White Leghorn. (A) Processo de remoção da membrana da casca do ovo. (B) Membrana cório-alantoide.



Fonte: Acervo pessoal.

Neste teste, é verificada a irritação da membrana por meio da hiperemia, hemorragia e coagulação. Ao final, obtém-se uma pontuação na qual é analisada por uma escala e o produto tem seu potencial de irritação classificado (TAVASZI & BUDAI, 2007; NÓBREGA et al., 2008).

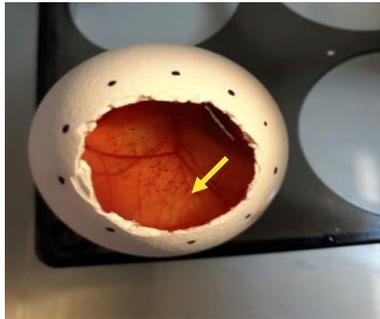
A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos ao finalizar o HET-CAM para as formulações do metronidazol e lapachol. As médias do teste foram obtidas a partir de sextuplicata para cada formulação e assim a classificação final foi definida.

**Tabela 12** - Resultado do HET-CAM para as formulações placebo e contendo fármaco.

Formulação	Pontuação (Média ± DP)	Classificação Final
Gel Placebo MTZ	0	Não irritante
Gel de MTZ	0	Não irritante
Gel Placebo LAP	5,00±0,00	Irritante moderado
Gel de LAP	8,43± 1,24	Irritante moderado
NaOH 0,1N (controle positivo)	18,6 ± 1,95	Irritante severo
NaCl 0,9% (controle negativo)	0	Não irritante

O contato da solução salina a 0,9% (controle negativo) com a membrana não produziu alterações visuais ao longo dos cinco minutos sendo classificada como não irritante. Todavia, ao aplicar a solução de NaOH 0,1N (controle positivo) pontos hemorrágicos e hiperemia dos vasos sanguíneos foram evidenciadas, diante disto a classificação foi de irritante grave (Figura 16).

**Figura 16** - Hiperemia dos vasos sanguíneos da solução de NaOH a 0,1N como controle positivo no teste de HET-CAM.



Fonte: Acervo pessoal.

Em relação as formulações de metronidazol, tanto o placebo quanto para o gel com o fármaco, foram classificados como potencialmente não irritantes. No decorrer do teste, nenhuma alteração na membrana cório-alantoide foi evidenciada. Considerando que o gel placebo e contendo metronidazol não apresentaram lesões na CAM do ovo, é possível inferir que a formulação com e sem fármaco é segura uma vez que não foi evidenciado potencial irritante a nível ocular.

Para as formulações geleificadas relacionadas ao lapachol um resultado diferente foi observado. Analisando os dados da Tabela 12, o gel placebo e com fármaco foram classificados como irritantes moderados. Um dos constituintes da formulação do gel placebo e com lapachol consiste no etanol, que por sua vez, pode estar relacionado ao resultado de potencial de irritação obtido considerando que conhecidamente apresenta potencial de irritação ocular (MUIR, 1985; GRANT, 1986; GAUTHERON et al., 1992; COOPER et al., 2001). Ainda ao analisar a Tabela 12, não foram observadas diferenças entre a pontuação média das formulações placebo e com o lapachol, além de estarem na mesma classificação final na avaliação potencial irritante a nível ocular pelo método do HET-CAM.

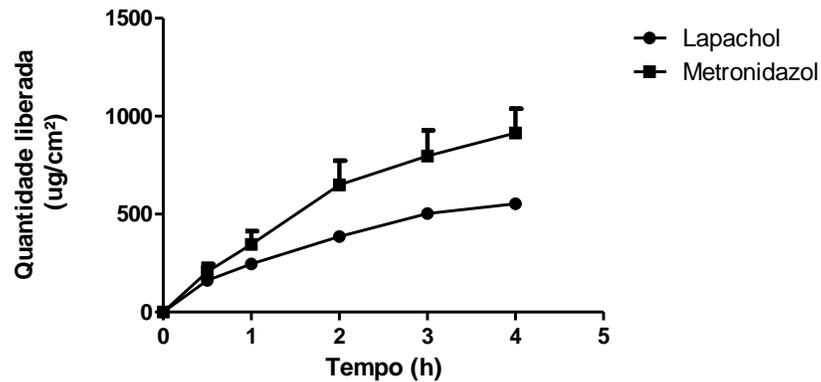
### **5.3 Avaliação da Liberação *in vitro***

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados em células de Franz, utilizando membranas sintéticas. Essas membranas não tem a capacidade de controlar o transporte dos compostos através delas e assim não são consideradas limitantes nos estudos de correlação (HELLEDI & SCHUBERT, 2001; COSTA, 2011).

No gráfico mostrado abaixo (Figura 17) é possível observar o perfil de liberação da formulação contendo o lapachol e metronidazol após 6 horas de ensaio. A partir das avaliações das

taxas de liberação, os perfis cinéticos do gel de metronidazol e de lapachol foram classificados como modelo cinético de Higuchi. Os dados obtidos corroboram com estudo prévio realizado por Tabosa (2014) e Araújo (2016), nos quais as formulações em teste apresentaram perfis semelhantes e o mesmo modelo cinético.

**Figura 17** - Perfil de liberação *in vitro* apresentado para as formulações contendo o metronidazol e o lapachol, utilizando membrana sintética.



#### 5.4 Avaliação Microscópica

A avaliação microscópica fornece informações sobre os tecidos como alterações, integridade e algumas estruturas celulares. A visualização de tecidos através do microscópio consiste em uma das técnicas para obtermos padronização, caracterização e controle de qualidade das amostras que venham a ser utilizadas nas pesquisas de avaliação de medicamentos.

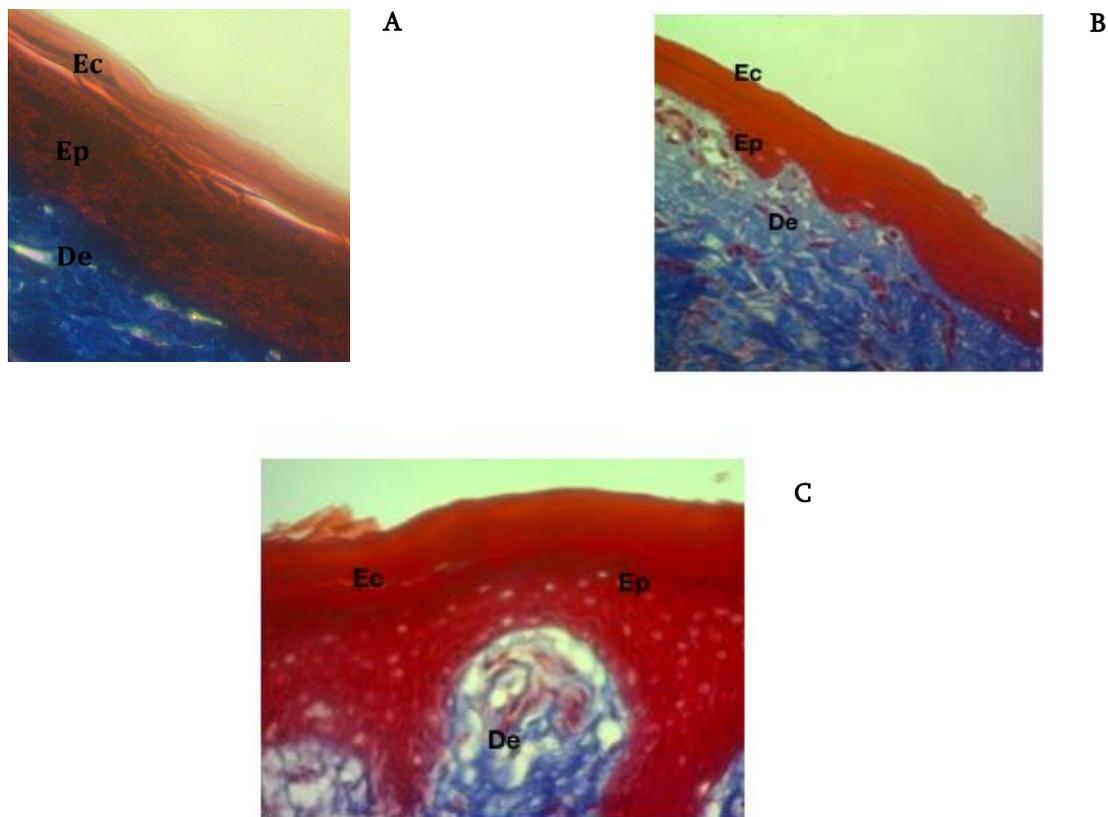
Os tecidos em sua forma natural não apresentam cor e para facilitar a visualização das estruturas bem como a diferenciação dos próprios tecidos, técnicas de colorações são realizadas. Considerando os tipos de células presentes na pele bem como a diferenciação do tecido em camadas, o método de coloração destacado para avaliar essas estruturas consiste no Tricómio de Masson, no qual é possível identificar as fibras de colágeno e queratina (BANCROFT, 2008; SANTOS, 2012; PEREIRA et al., 2017).

Considerando a escassez desse tipo de avaliação na literatura relacionada a pele de porco utilizadas nas avaliações de formas farmacêuticas, e diante do exposto acima, foram realizadas análises microscópicas das diferentes regiões da pele de porco com objetivo de avaliar não só a integridade das estruturas histológicas das peles utilizadas no estudo mas, principalmente, avaliar

as camadas da pele, com ênfase no estrato córneo, uma vez que a função de barreira de proteção e etapa limitante para a penetração de fármacos é garantida por esta camada mais superficial (SPARR et al., 2013; PHAM et al., 2016).

As diferentes regiões da pele de porco foram submetidas a cortes histológicos seguidos de coloração após o processo de dermatomização. Uma vez que as lâminas foram confeccionadas e levadas ao microscópio, a diferenciação histológica das camadas da pele foi evidenciada em virtude da diferença de coloração. Devido a isso, foi possível a visualização do estrato córneo, epiderme viável e derme nas peles provenientes do dorso, orelha e ventre (Figura 18).

**Figura 18** - Imagens das diferentes regiões da pele de porco obtidas em objetiva de 40x. (A) Dorso, (B) Ventre, (C) Orelha. Ec - estrato córneo, Ep - Epiderme viável, De- Derme.



Fonte: Acervo pessoal.

De acordo com o método de coloração empregado, a cor azul é característica da presença de fibras de colágeno presente na derme e a coloração vermelha é correspondente à presença de

queratina e conteúdo lipídico, os quais compõem as camadas de estrato córneo e epiderme viável. De acordo com as análises realizadas, a integridade da amostra de pele foi confirmada, corroborado pela avaliação da perda de água transepidermal realizada através do tewamêtro. Este resultado representa uma maior confiabilidade dos dados encontrados nos estudos de permeação, dermatofarmacocinética e retenção.

Em virtude dessas informações e considerando aspectos como idade, tamanho do animal, espécie, condições geográficas e de criação, dentre outros, o estrato córneo pode apresentar variações uma vez que tais condições são cruciais no desenvolvimento do animal. Entretanto, no presente estudo, a pele de um mesmo animal foi utilizada em toda a pesquisa para avaliação dos dois fármacos com objetivo de padronizar amostra de biomebrana.

## **5.5 Avaliação da Permeação Cutânea e Dermatofarmacocinética**

A escolha da membrana é um fator crítico na condução dos experimentos de permeação e dermatofarmacocinética *in vitro*. As membranas sintéticas não possuem as propriedades que se assemelhem a pele, impossibilitando possíveis correlações *in vitro/in vivo*. Sendo assim, os estudos devem ser conduzidos com biomembranas naturais, seja a pele humana proveniente de cirurgia plástica ou de animal.

Como mencionado, a pele de porco tem sido muito utilizada nos experimentos *in vitro* devido a semelhanças com a pele humana além da viabilidade de obtenção (HERKENNE et al, 2006; JUNG et al., 2015; SUMMERFIELD et al., 2016). Diante disto, as peles provenientes do dorso, ventre e orelha do animal foram selecionadas como modelos de biomembrana para as avaliações da absorção cutânea de fármacos com diferentes características.

### *5.5.1 Gel metronidazol*

#### **5.5.1.1 PERMEACÃO CUTÂNEA**

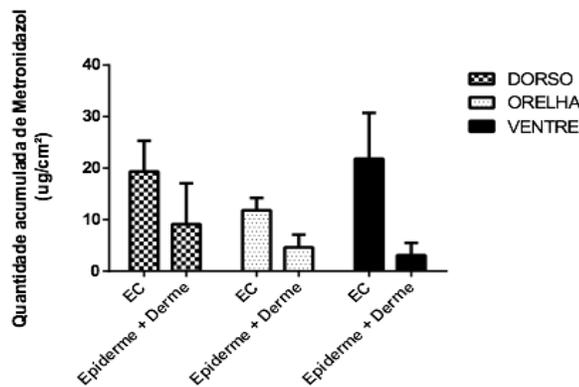
Após 6 horas de estudo, não foi encontrado o metronidazol no líquido receptor independente da região de pele utilizada, corroborando com pesquisa realizada por Araújo (2016), onde o metronidazol veiculado em forma farmacêutica gel, em diferentes concentrações de carbopol, não alcançou a solução receptora em quantidade significativa (limite de quantificação do método de doseamento foi de 0,1074µg/mL).

De acordo com Freeman e colaboradores (1997), a absorção sistêmica do gel MTZ 0,75% por via tópica também é baixa. Foi realizado um estudo aplicando 1g de gel na face de adultos com a rosácea e as concentrações na circulação sanguínea oscilaram na faixa de não detectável à 66µg/ L. Ainda é citado na literatura que os valores de metronidazol absorvidos sistemicamente após administração tópica são estatisticamente irrelevantes (MCCLELLAN et al., 2000; GOODMAN & GILMAN, 2003).

Segundo dados da literatura, características intrínsecas do fármaco interferem na absorção cutânea do mesmo e diversos estudos experimentais concluem que a permeação da maioria dos compostos através da camada do EC está dependente da lipofilicidade e da massa molecular do fármaco. A massa molecular do ativo para ser administrado via pele deve estar na faixa de 100-800 g/mol (GUY e HADGRAFT, 1992; BODDE et al., 1991; ELIAS, 1991; ISSA, 2011). Apesar da massa molecular do metronidazol ser de 171.15 g/mol e estar na faixa para ser um fármaco candidato a administração tópica, o fármaco possui solubilidade em água, fazendo com que a passagem através da camada hidrofóbica do estrato córneo seja dificultada.

Os resultados obtidos da quantificação do metronidazol no estrato córneo, epiderme e derme são apresentados na figura 19. Nela é possível a observação da relação da quantidade retida do metronidazol em µg/cm<sup>2</sup> na pele do porco provenientes das regiões do dorso, orelha e ventre após 6 h do estudo.

**Figura 19** - Quantidade acumulada do metronidazol no estrato córneo (EC), epiderme viável e derme das diferentes regiões da pele de porco após 6hrs de estudo.



Como mostrado na figura 19, o fármaco foi quantificado em maior concentração, independente da região de pele de porco investigada no estrato córneo. Mediante as concentrações totais encontradas no estrato córneo, epiderme e derme, o ativo foi recuperado predominantemente no EC (Tabela 13).

**Tabela 13** - Médias das concentrações obtidas de metronidazol no estrato córneo e epiderme+derme das peles provenientes do dorso, orelha e ventre.

<b>Pele</b>	<b>MTZ no EC µg/cm<sup>2</sup></b>	<b>MTZ na Epiderme +Derme µg/cm<sup>2</sup></b>
<b>Dorso</b>	19,35±5,97	9,13 ± 7,91
<b>Orelha</b>	11,81 ± 2,40	4,63± 2,45
<b>Ventre</b>	21,81 ± 8,90	3,08± 2,39

As médias das concentrações de metronidazol obtidas nas diferentes regiões de peles do porco podem ser relacionadas as alterações encontradas no próprio estrato córneo do animal. Nos humanos, a camada do estrato córneo varia de espessura de acordo com a região da pele escolhida, sendo assim, a absorção de fármacos pode ser diferenciada a depender da região (SCHWINDT et al., 1998).

Além do estrato córneo, o metronidazol foi quantificado nas camadas da epiderme viável e derme de todas as regiões da pele de porco analisadas, como mostra a Figura 19. As médias obtidas para retenção do fármaco na avaliação do dorso, orelha e ventre estão apresentadas na tabela 13.

Ao analisar a quantidade total de metronidazol encontrada nas diferentes regiões da pele de porco (estrato córneo, epiderme viável e derme), a avaliação dos dados indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA) entre a quantidade total de fármaco obtida. Foi encontrada uma quantidade menor de MTZ na pele da orelha do porco em relação as regiões dorsais e ventrais. Todavia, entre a pele da região dorsal e ventral não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ , ANOVA).

Pode-se ressaltar que a forma de distribuição do fármaco nas camadas da pele foi similar entre as diferentes regiões do animal. As diferentes regiões da pele do porco apresentaram perfis

semelhantes de distribuição nos meios avaliados (maior concentração encontrada no estrato córneo, uma concentração mediana do fármaco na derme e epiderme, e por fim, sem quantificação no líquido receptor). Os dados obtidos sugerem que há a possibilidade de usar as diferentes regiões da pele de porco nas avaliações *in vitro*, considerando que a distribuição do fármaco entre elas foi semelhante.

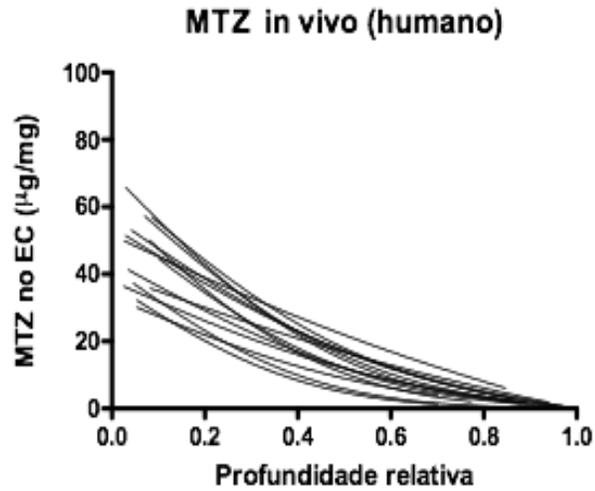
#### 5.5.1.2 DERMATOFARMACOCINÉTICA

Dentro de um contexto de avaliação de formulações tópicas, uma correlação *in vitro/in vivo* tem como objetivo examinar se as medições *in vitro* do medicamento tópico podem se correlacionar com os resultados *in vivo*, de modo que metodologias de avaliação mais eficientes possam ser utilizadas de forma reprodutível na avaliação cutânea (LEAL et al, 2017).

Diante do exposto, foi realizado estudo dermatofarmacocinético em humanos com a mesma formulação geleificada do metronidazol a 0,75% aplicada nos estudos *in vitro* e na mesma quantidade (143mg). Um total de 14 participantes saudáveis, 12 mulheres e 2 homens, foram incluídos no estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O objetivo da pesquisa em humanos foi avaliar o perfil de penetração do fármaco no EC visando uma possível correlação *in vitro/in vivo*.

A Figura 20 apresenta os perfis individuais de concentração do metronidazol por profundidade no estrato córneo para os 14 participantes, após aplicação da formulação que permaneceu em contato com a pele por um período de 6 hrs. Mediante análise dos dados, é possível dizer que a reprodutibilidade dessas medidas *in vivo* foram aceitáveis com coeficiente de variação menor que 50% para todos os parâmetros analisados, sugerindo que o procedimento realizado foi efetivo.

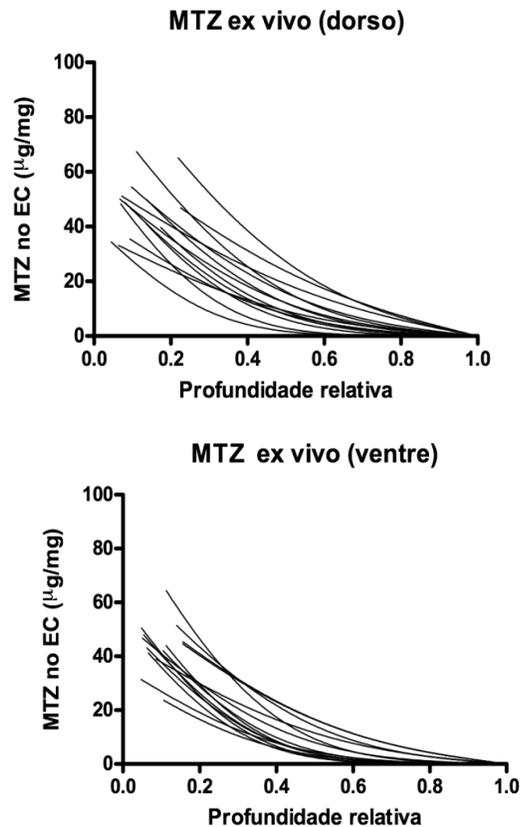
**Figura 20** - Perfis de concentração de MTZ (n = 14) em estrato córneo humano (*in vivo*) após aplicação do gel de metronidazol por 6hrs.



Analisando a Figura 20, ainda é possível observar que em todos os dados dos voluntários, a concentração do fármaco diminuiu a medida que os *tapes* se aprofundaram na camada de EC, conforme o esperado. Ao analisar os dados da quantidade de metronidazol disponível no estrato córneo dos voluntários uma média foi obtida no valor de  $19,43 \pm 9,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Após análise estatística, foi verificado que a quantidade de fármaco retida no estrato córneo humano foi semelhante aquela retida no dorso e região ventral do porco e diferente (maior) da encontrada na orelha do porco (Figura 21). O perfil do metronidazol na pele do dorso e ventre do animal seguiram a mesma tendência obtida nos estudos conduzidos *in vivo*. A concentração do fármaco diminuiu a medida que os *tapes* se aprofundaram na camada de EC.

**Figura 21** - Perfis de concentração de MTZ ( $n = 14$ ) em estrato córneo do dorso e ventre da pele de porco (*in vitro*) após aplicação do em gel de metronidazol por 6hrs.



Muitos estudos tentam comparar a absorção cutânea *in vitro* e *in vivo*, baseado que se as medições da metodologia *in vitro* forem adequadamente conduzidas, podem ser utilizadas para prever a absorção *in vivo*. Estudos *in vitro* podem prever a absorção *in vivo* quando a metodologia correta para ambos é utilizada (WHO, 2005).

Os estudos desenvolvidos neste trabalho seguiram entre outros, a metodologia da dermatofarmacocinética, que se apresentou reprodutiva e de fácil execução. Como resultado, os parâmetros dermatofarmacocinéticos do metronidazol no estrato córneo dos participantes e na pele do dorso e ventre puderam ser estabelecidos (Tabela 14).

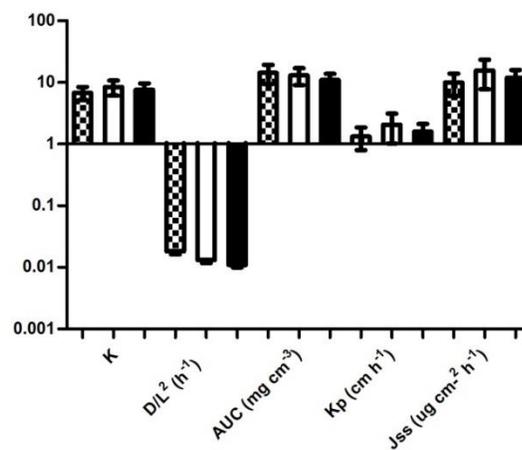
**Tabela 14** - Valores de parâmetros dermatofarmacocinéticos de partição (K), difusão ( $D/L^2$ ), área sob a curva (AUC), constante de permeabilidade ( $K_p$ ) e fluxo ( $J_{ss}$ ) obtidos na pele humana e no dorso e ventre do porco com a formulação de metronidazol (média  $\pm$  SD, n=14).

Pele	Humano	Dorso	Ventre
Tempo de aplicação (h)	6	6	6
K	6,81±1,62	8,43±2,34	7,63±2,03
D/L <sup>2</sup> [h <sup>-1</sup> ]	0,018±0,007	0,013±0,005	0,010±0,003
AUC (mg/cm <sup>2</sup> )	14,38±4,95	13,03±3,99	10,99±2,82
Kp(cm h <sup>-1</sup> )	1,32±0,52	2,07±1,04	1,58±0,53
Jss(μg cm <sup>2</sup> h <sup>-1</sup> )	9,96±3,95	15,57±7,85	11,95±4,01

Avaliação comparativa dos parâmetros de partição (K), difusão (D/L<sup>2</sup>), área sob a curva (AUC), contante de permeabilidade (KP) e fluxo (J) obtidos nos estudos *in vivo* e *in vitro* (Tabela 14 e Figura 22) demonstram uma correlação *in vitro/ in vivo* significativa, exceto para o parâmetro D/L<sup>2</sup>, onde existe diferença entre a pele humana e a região ventral.

**Figura 22** - Valores derivados (n = 14, média ± DP) no eixo X dos coeficientes de partição do MTZ no estrato córneo (K), parâmetro de difusividade (D/ L<sup>2</sup>), coeficientes de permeabilidade (Kp) e o fluxo (Jss). No eixo Y, escala logarítmica na base 10. Legenda: Barra hachurada corresponde ao estudo em humanos, barra branca estudo *in vitro* na pele do dorso e barra preta na pele do ventre.

### Parâmetros dermatofarmacocinéticos



Os resultados da avaliação da dermatofarmacocinética demonstram que os estudos *in vitro* cuidadosamente realizados sobre a pele do dorso e ventre de porco, podem ser utilmente preditivos da situação *in vivo*. A avaliação estatística demonstra que, para todos os parâmetros analisados, não existe diferença na utilização da região dorsal ou ventral do porco.

Levando em consideração que o metronidazol tópico uma das suas aplicações consiste no tratamento de doenças locais que acometem a pele, como a rosácea, a análise do fármaco *in vitro/in vivo* através da DPK foi adequada, elucidativa, simples, gerando dados confiáveis.

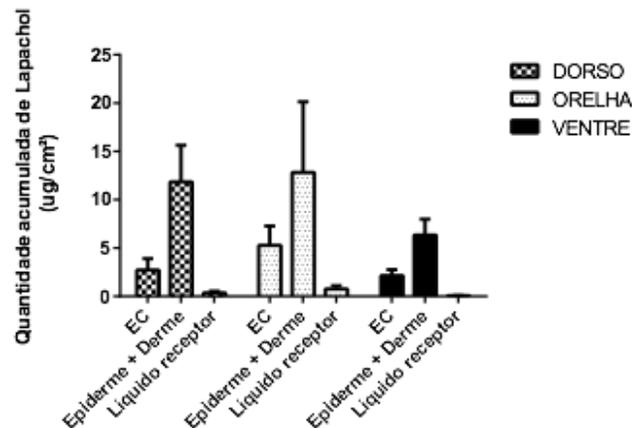
### 5.5.2 Gel de lapachol

Como já mencionado, um dos principais desafios para administração de fármacos via pele consiste em ultrapassar barreira do EC que limita a absorção cutânea. Para isso, formulações eficientes que auxiliem na liberação do ativo através desta barreira são necessárias (CHAIYANA et al., 2013).

A veiculação de fármacos como o lapachol em formulações de aplicação tópica é atrativa pois, o ativo apresenta características favoráveis como lipofilicidade e baixa massa molecular para penetrar a pele (LIMA et al., 2004; TABOSA, 2014). Essa capacidade de penetração cutânea do ativo foi avaliada em estudos *in vitro* em diferentes regiões da pele de porco.

Diante dos resultados da permeação cutânea do lapachol, é possível dizer que a formulação em gel foi bastante eficaz na liberação do fármaco independente da região da pele de porco utilizada. O resultado da quantificação do fármaco no estrato córneo, epiderme viável e derme, líquido receptor das peles provenientes do dorso, ventre e orelha são mostradas na Figura 23 e na Tabela 15.

**Figura 23** - Quantidade acumulada de lapachol nas camadas da pele das diferentes regiões da pele de porco após 6hrs de estudo (n=14).



**Tabela 15** - Concentrações de lapachol encontradas no estrato córneo, epiderme viável e derme, líquido receptor nas peles provenientes do dorso, orelha e ventre. Valores apresentados em média  $\pm$  DP.

Pele	LAP no EC $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	LAP na Epiderme +Derme $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	LAP no Líquido Receptor $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
<b>Dorso</b>	2,71 $\pm$ 1,19	11,84 $\pm$ 3,8	0,77 $\pm$ 0,31
<b>Orelha</b>	5,29 $\pm$ 1,99	12,82 $\pm$ 7,31	0,37 $\pm$ 0,16
<b>Ventre</b>	2,16 $\pm$ 0,6	6,35 $\pm$ 1,63	0,08 $\pm$ 0,02

Como demonstrado na Tabela 15, a maior concentração do fármaco foi encontrada na epiderme viável e derme em todas as regiões da pele de porco analisadas. Mediante as concentrações totais encontradas (estrato córneo, epiderme e derme, líquido receptor) o ativo foi recuperado predominantemente na epiderme viável e derme em todas as regiões de pele de porco avaliadas, na faixa de 67% - 79%.

Considerando que o lapachol apresenta característica lipofílica (log de P 2,69), baixo peso molecular (242g/mol), além da presença do etanol como promotor de permeação na formulação, a difusão do fármaco na pele pode ser facilitada (OSSOWSKI et al., 2008; BENSON et al., 2012). Os resultados obtidos corroboram com o citado acima, demonstrando que foi possível a quantificação significativa do lapachol no estrato córneo, epiderme e derme e no líquido receptor em todas as regiões da pele de porco investigadas.

O comportamento obtido do lapachol neste estudo apresentou perfil semelhante ao estudo desenvolvido por Tabosa (2014). No qual, o ativo foi veiculado em forma farmacêutica geleificada, emulgel e microemulsionada sendo também devidamente quantificado no EC, epiderme e derme, e no líquido receptor utilizando a pele da orelha de porco como biomembrana.

Ainda analisando a Figura 23 e a tabela 15, é evidenciado uma pequena concentração, porém significativa, do lapachol no líquido receptor. Estudo conduzido por Lira (2008) com gel de lapachol também apresentou quantidades significativas do fármaco no líquido receptor utilizando a pele de orelha de porco e Tabosa (2014) demonstrou em estudo *in vivo* conduzido com animais que de fato o lapachol passa pelas camadas da pele, uma vez que o efeito anti-inflamatório sistêmico do gel de lapachol a 0,5% foi evidenciado, após aplicação tópica deste produto no dorso do animal. Na literatura ainda é mencionado que uma vez que o fármaco se encontra na derme, a passagem para circulação sanguínea é relativamente mais fácil de ser alcançada (BOLZINGER et al., 2012; TABOSA, 2014).

Ao analisar a quantidade total de lapachol encontrada nas diferentes regiões da pele de porco, a avaliação dos dados indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA) entre a quantidade total de fármaco. Foi encontrada uma quantidade menor de LAP na pele do ventre do porco em relação a região do dorso e orelha. Todavia, entre a pele do dorso e orelha não foi observada diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ , ANOVA).

Neste estudo foi observado que tanto a pele da orelha do porco quanto a do dorso e ventre apresentaram variabilidade similar uma vez que o perfil de distribuição foi semelhante nas diferentes camadas da pele. Uma tendência na recuperação do lapachol foi obtida independente da região de pele do porco analisada: menor concentração no líquido receptor, uma quantidade intermediária no estrato córneo e uma maior quantidade na epiderme e derme. Estes dados sugerem a possibilidade de usar as diferentes regiões da pele de porco como biomembrana, uma vez que os perfis de distribuição obtidos se assemelham.

## **5.6 Considerações Sobre Os Modelos De Pele Investigados**

O uso de pele de animal consiste uma das metodologias alternativas na avaliação de produtos tópicos com possível predição nos humanos. Porém, um dos desafios para o estudo consiste na seleção da pele de um animal que apresente características semelhantes ao ser humano para assim, correlacionar os dados, possibilitando a substituição.

O uso de diferentes regiões da pele de porco provenientes do dorso, orelha e ventre como biomembranas para predição da absorção cutânea de fármacos em humanos é discutida na literatura em estudos realizados separadamente.

Considerando os resultados obtidos com a quantificação do metronidazol, fármaco mais hidrofílico, o mesmo perfil de distribuição foi encontrado em todas as regiões da pele do porco avaliadas. A maior concentração de MTZ foi obtida no estrato córneo, a mediana na epiderme e derme e não foi encontrado o fármaco no líquido receptor. No mais, a quantidade/perfil de permeação do fármaco no EC do dorso e ventre do porco foram semelhantes ao encontrado nos estudos conduzidos em humanos. A avaliação dos parâmetros  $K$ ,  $D/L^2$ ,  $AUC$ ,  $K_p$ ,  $J_{ss}$  corroboram este resultado.

Já em relação ao estudo realizado com o lapachol, fármaco mais lipofílico, veiculado em uma formulação geleificada, foi verificado que independente da região de porco utilizada, uma mesma distribuição foi encontrada nas diferentes camadas da pele. Diante dos testes pré-clínicos realizados por Tabosa (2014), fica claro que a metodologia da dermatofarmacocinética consiste em uma opção não adequada para avaliação deste tipo de formulação a nível de estrato córneo, mesmo sendo utilizada para avaliação dos produtos tópicos de ação sistêmica, como os adesivos (patches) (CHEN et al., 2015). No entanto, a partir das análises dos dados e da distribuição obtida em todas as camadas da pele, a formulação geleificada de lapachol é possível inferir que todas as regiões da pele são aptas como biomembrana.

Considerando as lipofilias dos ativos utilizados neste estudo, tanto para o fármaco hidrofílico quanto para o lipofílico, tendências foram mantidas em todas as peles analisadas. A questão da invariabilidade dos tipos de peles investigadas, a partir das características de cada fármaco, foi evidenciada no sentido de que um mesmo comportamento de absorção cutânea foi mantido independente da pele do dorso, orelha ou ventre.

Para os fármacos estudados, os resultados demonstram que as diversas regiões da pele de porco mostraram resultados semelhantes em relação a distribuição entre as diferentes camadas. Sendo assim, qualquer região da pele de porco à princípio, estaria apta para uso, sendo importante avaliar anteriormente a conveniência experimental (disponibilidade, quantidade, integridade, etc.).

Vale ressaltar que em todos os estudos, todas as peles se mantiveram íntegras, ausente de feridas e mudanças de coloração visíveis ao longo do trabalho. Independente da região escolhida,

todas as peles utilizadas foram dermatomizadas. Mesmo assim, seria importante no procedimento de padronização, a utilização de um método específico para avaliação da integridade, bem com uma padronização de espessura, considerando principalmente a diminuição da variabilidade dos dados, evitando gerar resultados equivocados.

Levando essas informações em consideração, fica sugestivo que uma vez padronizada a região do corpo do animal que será utilizada nos estudos, esta deverá ser mantida, não ocorrendo, portanto, a substituição ou troca entre peles obtidas de diferentes regiões de um mesmo animal, diminuindo assim a variabilidade e aumentando a reprodutibilidade do ensaio. Nossos resultados recomendam uma validação dos protocolos para os estudos com peles *in vitro* também devam ser realizados antes de iniciar de fatos os experimentos para obter dados confiáveis e reprodutíveis.

## 6 CONCLUSÕES

- Os estudos de pH, viscosidade e espalhabilidade permitiram caracterizar adequadamente cada formulação estudada e os sistemas se mantiveram estáveis em todo o processo.
- As formulações estudadas apresentaram comportamento reológico do tipo pseudoplástico, pois sua viscosidade aparente é diminuída gradualmente, à medida que aumenta a taxa de cisalhamento.
- Os métodos alternativos utilizados neste estudo possibilitaram a classificação das formulações quanto ao potencial que possuem de causar irritação ocular.
- A formulação de metronidazol foi classificada como “não determinada” pelo método do BCOP e classificada como não irritante pelo HET-CAM. Com isso, é possível afirmar que essa formulação tópica é segura para aplicação dérmica, sendo não irritante em caso de contato com os olhos.
- O gel de lapachol no método de BCOP foi classificado como “não determinado”, porém pelo HET-CAM foi classificado como irritante moderado. Os constituintes da formulação podem estar relacionados ao resultado obtido. Não foram observadas diferenças entre a pontuação média das formulações placebo e com o lapachol, além de estarem na mesma classificação final na avaliação do potencial irritante pelo método do HET-CAM.
- Nos estudos de liberação *in vitro*, utilizando membrana de ésteres de celulose, as formulações em gel de metronidazol e lapachol seguiram o modelo de Higuchi.
- A análise dos dados *in vitro* demonstrou que a maior concentração de MTZ foi retida no estrato córneo, concentração mediana do fármaco foi retida na epiderme e derme e não foi encontrado o metronidazol no líquido receptor independente da região da pele do animal utilizada. Dessa forma, o perfil de distribuição do fármaco nas camadas da pele foi similar entre as regiões e a consistência dos dados experimentais foi demonstrada, pela pequena variabilidade encontrada, através das análises de MTZ no estrato córneo de cada região. Fato este de grande importância, uma vez que, este produto desempenha uma função local.

- Na avaliação dos parâmetros obtidos a partir do perfil de permeação do MTZ no EC, foi possível obter uma boa correlação *in vitro/in vivo*, sugerindo fortemente a utilização da DPK para avaliação de produtos tópicos.
- Para o estudo *in vitro* do lapachol uma tendência da recuperação da quantidade do lapachol foi observada independente da região de pele de porco analisada, na qual para todas as peles a menor quantidade encontrada foi no líquido receptor, uma quantidade intermediária no EC e uma maior quantidade na epiderme e derme.
- Qualquer região da pele de porco à princípio, estaria apta para uso, sendo importante avaliar anteriormente a conveniência experimental (disponibilidade, quantidade, integridade, etc.), bem como a utilização de um método específico para avaliação da integridade, além da padronização de espessura, considerando principalmente a redução da variabilidade dos dados, evitando gerar resultados equivocados.
- Todos os métodos alternativos demonstraram reprodutibilidade e eficiência na avaliação da segurança das formulações.

## REFERÊNCIAS

- ABD, E.; et al. Skin models for the testing of transdermal drugs. **Clinical Pharmacology: Advances and Applications.**, v. 28, p.163-176, 2016.
- ABREU, C. L. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Metodologias alternativas à experimentação animal: aplicação no controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 45, p. 20 - 7, 2008.
- ALEXANDER, A.; et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **J Control Release**, v. 164, n. 1, p. 26-40, 2012.
- ALI, S.M. & YOSIPOVITCH, G. Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. **Acta Derm Venereol**, v.93, p.261-267, 2013.
- MEIRA, A. S. **Avaliação de condições experimentais de estudos *in vitro* de permeação/retenção cutânea empregando pele suína para creme comercial e nanoemulsão contendo penciclovir. 2013. 76p.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2013.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C; OLIVEIRA, R.S. (orgs). **Animais de Laboratório: Criação e Experimentação.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. 385 p.
- ANSEL, H. C.; et al. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 8a ed. São Paulo: Premier, 2007. 775p.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR., L. V. **Farmacotécnica – Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos.** São Paulo: Premier, 2000. p.288-291.
- ARAÚJO, T. P. **Bioequivalência tópica de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK).** 2016. 98p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- AULTON, M.E. **Pré-formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas.** 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.
- AVON, S.L., WOOD, R.E. Porcine skin as an in-vivo model for ageing of human bite marks. **J. Forensic Odontostomatol.**, v. 23, p. 30-39, 2005.
- BALAGUER A., SALVADOR, A. C.; MELIA, M. M.; HERRÁEZ, O. DÍEZ, **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 385, p. 1225, 2006.
- BANCROFT, J.; GAMBLE, M. **Theory and Practice of Histological Techniques.** 6a ed. Philadelphia: Elsevier, 2008.
- BARBERO, A. M.; FRASCH, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in-vitro* penetration studies: a quantitative review. **Toxicology in vitro**, v. 23, p. 1-13, 2009.

- BARCO, D.; ALOMAR, A. **Rosacea. Spain Actas Dermo.**, v.99, p. 244-56, 2008.
- BARRY, B. W. *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*, v. 18. New York: Marcel Dekker, 1983.
- BEDOR, D. C. G. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de metronidazol em forma farmacêutica (Gel Vaginal). **Lat. Am. J. Pharm.** v. 27, n. 2, p. 263-5, 2008.
- BEEKHUIJZEN M. 2017. The era of 3Rs implementation in developmental and reproductive toxicity (DART) testing: current overview and future perspectives. **Reprod Toxicol.**, v. 72, p. 86–96, 2017.
- BEMVINDO, C. S. **Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas Comerciais** [Dissertação]. Rio de Janeiro: Faculdade de Farmácia, UFRJ; 2006.
- BENECH-KIEFFER, F.; et al. Percutaneous absorption of sunscreens in vitro: Interspecies comparison, skin models and reproducibility aspects. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v. 13, p. 324-335, 2000.
- BENSON, H. A. E.; WATKINSON, A. H. *Transdermal and Topical Drug delivery, Principles and Practice*. **John Wiley & Sons**, 2012.
- BHASKAR K. et al. Biopharmaceutical and pharmacodynamic studies on topically applied diclofenac gel available in Indian market. **Boll Chim Farm**, v. 143, n. 5, p. 208-210, 2004.
- BLACK, D.; et al. Seasonal variability in the biophysical properties of stratum corneum from different anatomical sites. **Skin Res. Technol.**, v. 6, p. 70–76, 2000.
- BODDÉ, H.; et al. Visualisation small-angle X-ray scattering. **J. Invest. Dermatol.**, v. 97, 1991.
- BOLZINGER M. A., et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, vol. 17, no. 3, pp. 156–165, 2012.
- BOS, J. D.; MEINARDI, M. M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. **Exp. Dermatol.**, v. 9, p. 165 - 169, 2000.
- BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, 2006.
- BOUWSTRA, J. A.; et al. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Prog. Lipid Res.**, v. 42, p. 1 - 36, 2003.

- BRADDY, A. C.; et al. Survey of international regulatory bioequivalence recommendations for approval of generic topical dermatological drug products. **AAPS J.**, v. 17, p. 121–133, 2015.
- BRASIL. Decreto No 6.899, de 15 de julho de 2009. Diário Oficial da União. 16 de Julho de 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Brasília, 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira.** Volume II. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para avaliação e segurança de produtos cosméticos. 2. ed. Brasília: Anvisa; 2012.
- BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA no 18, de 24 de Setembro de 2014. Diário Oficial da União 25 de setembro de 2014.
- BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa CONCEA no 31, de 18 de Agosto de 2016. Diário Oficial da União 19 de Agosto de 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **TÉCNICO EM CITOPATOLOGIA.** Caderno de referência 3: Técnicas de histopatologia. 1. ed. Brasília-DF. ISBN 978-85-324-0035-2. 2012.
- BRETERNITZ, M.; et al. Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping. **Br. J. Dermatol.**, v. 156, p. 231–240, 2007.
- BROWN, M. B.; MARTIN, G. P.; JONES, S. A.; Akomeah, F. K. Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. **Drug Deliv**, v. 13, n. 3, p. 175-87, 2006.
- CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.
- CHAIYANA, W.; RADES, T.; OKONOJI, S. Characterization and in vitro permeation study of microemulsions and liquid crystalline systems containing the anticholinesterase alkaloidal extract from *Tabernaemontana divaricata*. **International journal of pharmaceutics.**, v. 452, p. 201-210, 2013.
- CHEN X., et al. Dermatopharmacokinetic bioequivalence study of two types of topical patches containing loxoprofen sodium. **Int J Clin Pharmacol Ther.**, v. 52, n. 10, p. 927-32, 2014.
- CHIEN, Y.W. **Novel drug delivery systems.** 2 ed. New York, Marcel Dekker, v.50. 1992.
- CILURZO, F.; MINGHETTI, P.; SINICO, C. Newborn Pig Skin as Model Membrane in In Vitro Drug Permeation Studies: A Technical Note. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 8(4), 2007.

COOPER, K. J. et al. Prediction of ocular irritancy of prototype shampoo formulations by the isolated rabbit eye (IRE) test and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Toxicology in vitro**, v. 15, n. 2, p. 95-103, 2001.

COSTA, M.A.B. **Caracterização, desenvolvimento e validação do Método analítico de teor e perfil de liberação *in vitro* – Suspensão de sulfassalazina 250 mg/5 ml.** . Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, 2011.

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

CRAWFORD, G. H.; PELLE, M. T.; JAMES, W. D. Rosacea: I. Etiology, pathogenesis, and subtype classification. **J Am Acad Dermatol**, v. 51, p. 327–344, 2004.

CRICKS, B.; BONNETBLANC J. M.; GUILLAUME, J. C. Comprendre la peau. Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes. **Ann. Dermatol. Venereol.**, v. 132, 2005.

CRUZ, S. M. da; ANGELIS, L. H. **Alternativas aos testes de segurança de cosméticos em animais.** 2012. Disponível em:  
<[http://blog.newtonpaiva.br/seer\\_3/index.php/RevistaPos/article/viewFile/261/250](http://blog.newtonpaiva.br/seer_3/index.php/RevistaPos/article/viewFile/261/250)> . Acesso em: 13 de janeiro de 2017.

DANGELO, J.G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

DAHL, M. V.; et al. Topical metronidazole maintains remissions of rosacea. **Arch Dermatol**, v. 134, p. 679-683, 1998.

DOMINGUEZ, M. H.; SALES, O. D. **Alternative Methods to Animal Testing for Cosmetic Products Evaluation.** Analysis of cosmetic products. Elsevier, Amsterdam, first edition, p. 423-461, 2007.

DONAHUE, D. A.; et al. Survey of ocular irritation predictive capacity using Chorioallantoic Membrane Vascular Assay (CAMVA) and Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test historical data for 319 personal care products over fourteen years. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 2, p. 563-572, 2011.

DRAIZE, J.H. ; WOODARD, G. ; CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, **J.Pharmacol. Exp. Ther.** 82 (1944) 377–390.

DUARTE, M. L. **Bioequivalência tópica após dose múltipla de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK).** 2017. 98p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

ELIAS, P.M. Epidermal barrier function: intercellular epidermal lipid structures, origin, composition and metabolism. **Journal of Controlled Release**, v.15, p. 199- 208, 1991.

EMAMI, J. *In vitro-in vivo* correlation: from theory to application. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science**, v.9, n.2, p. 31-51, 2006.

EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; FIORITO, S.; MATHIEU, V.; KISS, R. Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review. **Phytochem Rev.**, 2014.

Farmacopeia Brasileira. Parte I. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

FELTKAMP, H.; FUCKS, P.; SUCKER, H. **Pharmazeutische qualitaetskontrolle**. Stuttgart: Georg Thieme, 1983. p. 714- 735.

FLUHR, J. W.; et al. Impact of anatomical location on barrier recovery, surface pH and stratum corneum hydration after acute barrier disruption, **Br. J. Dermatol.**, v. 146, p. 770– 776, 2002.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 12, p. 417- 425, 2000.

FONSECA, S. G. C. **Desenvolvimento Farmacotécnico de Forma Farmacêutica Microparticulada Contendo Lapachol e Avaliação Comparativa da Atividade Antineoplásica sobre o Sarcoma de Yoshida frente a Forma Clássica**. 2001. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

FONSECA, S.G.C.; et al. Validação de metodologia analítica para doseamento de soluções de lapachol por CLAE. **Quim. Nova**, v.27, n.1, p.157-159, 2004.

FORSLIND, B. A domain mosaic model of the skin barrier. **Acta Dermatologica Venereologica**, v. 74, p. 1-6, 1994.

FRANZ T. J.; LEHMAN P. A.; RANEY S. G. Percutaneous absorption in man: in vitro-in vivo correlation. **Skin Pharmacol Physiol.**, v.24, n.4, p. 224-230, 2011.

FREEMAN, C. D.; KLUTMAN, N. E.; LAMP, K. C. Metronidazol - A Therapeutic Review and Update. **Drugs**, v. 54, n. 5, p. 679-708, 1997.

FULLER, D.; MARTIN, S.; Rosacea. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 57, n. 4, p. 403-409, 2012.

FURLANI, D. et al. Uso cosmético de patches: artigo de revisão. Florianópolis, mar. 2012.

GAUTHERON, P., et al., Bovine corneal opacity and permeability test: an in vitro assay of ocular irritancy. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 18, p. 442–449, 1992.

GERSTEL, D., et al. Comparison of protocols for measuring cosmetic ingredient distribution in human and pig skin. **Toxicol. In Vitro.**, v. 34, p. 153-160, 2016.

- GIACOMELLI, I.; et al. Oral Lapacho-Based Medication: An Easy, Safe, and Feasible Support to Prevent and/or Reduce Oral Mucositis During Radiotherapy for Head and Neck Cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 67, p.1249-1254, 2015.
- GILLERON, L. et al. Evaluation of a modified HET - CAM assay as a screening test for eye irritancy. **Toxicology in vitro**, v. 10, n. 4, p. 431 - 446, 1996.
- GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, p. 1152–1161, 2007.
- Hardman; J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G. Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1647p.
- GUY, R. H.; HADGRAFT, J. Physicochemical aspects of percutaneous-X-ray diffraction study. **Int. J. Pharm.**, v. 84, p. 205–216, 1992.
- GUY, R.H., HADGRAFT, J. **Transdermal drug delivery**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2003.
- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **Int. J. Pharm.**, v.224, p.1-18, 2001.
- HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Skin: the ultimate interface. **Physical Chemistry Chemical Physics.**, v. 13, p. 5215-5222, 2011.
- HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. **Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants**. Washington, DC, American Chemical Society., 1995.
- HANSEN, J. T.; LAMBERT, D. R. **Anatomia Clínica de Netter**. Artmed. 2007.
- HASANOVIC, A.; WINKLER, R.; RESCH, G. P.; VALENTA, C. Modification of the conformational skin structure by treatment with liposomal formulations and its correlation to the penetration depth of acyclovir. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 76–81, 2011.
- 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.
- HENNING, A.; SCHAEFER, U. F.; NEUMANN, D. Potential pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 324–331, 2009.
- HERKENNE, C. et al. Ibuprofen transport into and through skin from topical formulations: in vitro-in vivo comparison. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 887-894, 2006a.
- HERKENNE, C. et al. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 8, p. 1850-1856, 2006b.

HORITA, H. T.; SUGIBAYASHI, K. Effect of ethanol pretreatment on skin permeation of drugs. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 35, p. 1343 - 1348, 2012.

HUSSAIN, H., KROHN, K., AHMAD, V. U., MIANA, G. A., Greend I. R. Lapachol: an overview. **ARKIVOC.**, v.1, n.2, p.145-171, 2007.

ICCVAM. Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication 10-7553. ResearchTriangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2010.

ICCVAM. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods- *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives, 2006.

IDSON, B. Percutaneous absorption. **J. Pharm. Sci.**, v. 64, p. 901–924, 1975.

ISSA, M.G. **Avaliação do impacto de diferentes variáveis no ensaio de dissolução intrínseca de metronidazol**. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas do centro de ciências da saúde da USP- São Paulo, 2011.

JACOBI, U. et al. Porcine ear skin: an *in vitro* model for human skin. **Skin Research and Technology**, v. 13, p. 19–24, 2007.

JEPPS, O. G.; et al. Modeling the human skin barrier: towards a better understanding of dermal absorption. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 65, n. 2, p. 152–168, 2013.

JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE. **Relatif aux méthodes d'analyse nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques. Annexe IV: méthode officielle d'évaluation du potentiel irritant par application sur la membrane chorioallantoïdienne de l'oeuf de poule**, p. 19137 – 19138, 1996.

JUNG, E. C.; MAIBACH, H. I. Animal models for percutaneous absorption. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, p. 1–10, 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JUSTIN-TEMU, M.; et al. Intravaginal gels as drug delivery systems. **J Womens Health**, v. 13, p. 834–844, 2004.

KALIA, Y. N.; ALBERTI, I.; NAIK, A.; GUY, R. H.. Assessment of topical bioavailability *in vivo*: the importance of stratum corneum thickness. **Skin Pharmacol.**, v. 14, p. 82-86, 2001.

KARANDE, P.; MITRAGOTRI, S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, n. 11, p. 2362- 73, 2009.

KIREJEV, V.; ERICSON, M. B. **Topical Drug Delivery**. 2013. Disponível em: [http://www.physics.gu.se/english/research/Complex\\_Systems\\_Bioimaging/Biomedical\\_Photonics/projects/topical-drug-delivery/](http://www.physics.gu.se/english/research/Complex_Systems_Bioimaging/Biomedical_Photonics/projects/topical-drug-delivery/). Acessado em: 10 de Janeiro de 2018.

KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.Compositae**. 1991. 228p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do RioGrande do Sul, Porto Alegre, 1991.

KONG, R.; BHARGAVA, R. Characterization of porcine skin as a model for human skin studies using infrared spectroscopic imaging. **Analyst**, v.136, p. 2359, 2011.

KULKARNI, V. S. **Handbook of Non-invasive Drug delivery Systems**. USA: Elsevier Inc., 2010.

LADEMANN, J.; et al. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.**, v. 72, p. 317–323, 2009.

LANGER, R. Transdermal drug delivery: Past progress, current status, and future prospects. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.56, p.557-558, 2004.

LAVKER, R. M., et al. Hairless micropig skin. A novel model for studies of cutaneous biology. **Am. Pathol.**, v. 138, p. 687-97, 1991.

LEAL, L. B., et al. Bioequivalence Methodologies for Topical Drug Products: In Vitro and Ex Vivo Studies with a Corticosteroid and an Anti-Fungal. **Drug. Pharm Res.**, v. 34, p. 730-737, 2017.

LEONARDI, G. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estabilidade de formulações cosméticas. **Int. J. Pharm. Compounding.**, v. 3, n. 4, p.154-156, 2001.

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia Aplicada**. 1. ed. São Paulo: Medfarma, 2004.

LEVEQUE, N.; et al. Comparidon of Franz cells and midrodialysis for assessing salilylic acid penetration through human skin. **International Journal of Pharmaceutics France**, v. 269, n. 2, p. 323-328, 2003.

LIMA, N. M.; et al. Antileishmanial activity of lapachol analogues. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 99, n. 7, p. 757-761, 2004.

LIN, Y. K., et al. Using Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin as a Model to Measure the Skin Penetration of Anti-Psoriatic Drugs. **Plos One**, v.10, 19 páginas, 2015.

LIRA, A. A. M.; et al. Development of Lapachol Topical Formulation: Anti-inflammatory Study of a Selected Formulation. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 9, n. 1, p. 163-168, 2008.

LOFFLER, H.; DREHER, F.; MAIBACH, H. I. Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal, **Br. J. Dermatol.**, v. 151, p. 746–752, 2004.

LOPES A. R. A.; et al. Plantas e seus extratos administração e biodisponibilidade de fitoterápicos aplicados na pele. **Natureza on line**. v. 4, n.2, p.62-66, 2006.

LOWE, N. J. Use of Topical Metronidazole in Moderate to Severe Rosacea. **Advances in Therapy**, v. 20, n. 4, p. 177-190, 2003.

MADDEN, J. C. et al Strategies for the optimisation of in vivo experiments in accordance with the 3Rs philosophy. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 140–154, 2012.

MAGALHÃES, M.; ORTÊNCIO-FILHO, H. Alternativas ao uso de animais como recurso didático. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoológicas**, v. 9, p. 147-154, 2006.

MAHRHAUSER, D. S.; et al. Assessment of Raman spectroscopy as a fast and non-invasive method for total stratum corneum thickness determination of pig skin. **Int J Pharm.**, v. 1, n. 495, p. 482-484, 2015.

MARCARIAN, H. Q.; CALHOUN, M. L. Microscopic anatomy of the integument of adult swine. **Am J Vet Res**, v. 27, p. 765-72, 1966.

MCCLELLAN, K. J.; NOBLE, S. Topical Metronidazole - A Review of its Use in Rosacea. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 1, n. 3, p.191-199, 2000.

MELO, E. K. S. et al. Criteria for the bioanalytical method and its application in dermatopharmacokinetic (DPK) study in pig skin (ex vivo) using metronidazole. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v. 10, n. 38, p. 817-822, 2016.

MONTAGNA, W.; PARAKKAL, P. F. *The Structure and Function of Skin*. 3rd ed. New York: AcademicPress, 2012.

MONTANES, A. B. Relevance of equivalence assessment of topical products based on the dermatopharmacokinetics approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p. 173-179, 2011.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A. **Structure and function of skin**. In: MONTEIRO- RIVIERE, N. A., editor. *Toxicology of the Skin*. New York: Informa Health- care; p. 1–18, 2010.

MOSER, K.; et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 52, p. 103–112, 2001.

MORALES, M. M. MÉTODOS ALTERNATIVOS À UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM PESQUISA CIENTÍFICA: MITO OU REALIDADE?. **Cienc. Cult.**, v. 60, n. 2, São Paulo, 2008.

MUIR, C. K. A simple method to assess surfactant-induced bovine corneal opacity in vitro: preliminary findings. **Toxicology letters**, v. 22, n. 2, p. 199-203, 1984.

MUIR, C. K. Opacity of bovine cornea in vitro induced by surfactants and industrial chemicals compared with ocular irritancy in vivo. **Toxicology letters**, v. 24, n. 2-3, p. 157-162, 1985.

MORROW, D. I. J., et al. Innovative Strategies for Enhancing topical and Transdermal Drug Delivery. **The Open Drug Delivery Journal**, vol. 1, 2007.

MURTHY N. S.; SHIVAKUMAR. H. N. **Topical and Transdermal Drug Delivery. Handbook of Non - Invasive Drug Delivery Systems**. Department of Pharmaceutics, the University of Mississippi, USA, 2010.

MURTHY, N.S. **Topical Sem isolid Drug Product Critical Quality Attributes (Q3 Characterization) With Relevance to Topical Bioequivalence**. Characterization) With Relevance to Topical Bioequivalence. Disponível em: < [http://www.pharmtech.com/pharmtech - webcasts](http://www.pharmtech.com/pharmtech-webcasts)> Acesso em: 21 dez. 2017.

NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 9, p. 318-326, 2000.

NARKAR, Y. Bioequivalence for Topical Products—An Update. **Pharm Res** 27:2590- 2601, 2010.

N'DRI-STEMPFER, B. et al. Improved bioequivalence assessment of topical dermatological drug products using dermatopharmacokinetics. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 2, p. 316-328, 2009.

NÓBREGA, A.M.; ALVES, E.N.; PRESGRAVE, R.F.; COSTA, R.N.; DELGADO, I.F. Determination of eye irritation potential of low-irritant products: comparison of in vitro results with the in vivo draize rabbit test. **Braz. arch. biol. technol.** Curitiba, v. 55, n. 3, 2012.

OECD. Guideline for the testing of chemical, no 428. Skin Absorption: *in vitro* Method, Paris, France, 2004.

OECD. **Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants**. Section 4: Health Effects. 2009.

OECD. **Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section, v. 4, 2013.

OLIVEIRA, A.G.L.; SILVA, R.S; ALVES, E.N.; PRESGRAVE, R.F.; PRESGRAVE, O.A.F; DELGADO, I.F. Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM- TBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, p. 153-9, 2012.

OSHIZAKA, H. T.; TODO, K. S. Effect of direction (epidermis-to-dermis and dermis-to-epidermis) on the permeation of several chemical compounds through full- thickness skin and stripped skin. **Pharm. Res.**, v. 29, p. 2477 - 2488, 2012.

OSSOWSKI, T.; GOULART, M.O.F.; De ABREU, F.C.; SANTANA, A.E.G.; MIRANDA, P.R.B.; COSTA, C.O.; LIWO, A.; FALKOWSKI, P.; ZARZECZANSKA, D. Determination of

the pKa values of some biologically active and inactive hydroxyquinones. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.19, p.175-183, 2008.

PAIXÃO, R. L. & SCHRAMM, R. R. Ethics and animal experimentation: What is debated?. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, p. 99-110, 1999.

PAIXÃO, R.L. **Experimentação Animal: razões e emoções para uma ética**. Rio de Janeiro, 2001.189 p. Dissertação (Doutorado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 2001.

PANCHAGNULA, R.; BOKALIAL, R.; SHARMA, P.; KHANDAVILLI, S. Transdermal delivery of naloxone: skin permeation, pharmacokinetic, irritancy and stability studies. **Int J Pharm.**, v.293, p.213-223, 2005.

PEREIRA, S. G.; et al. Aspectos histológicos dos músculos da região da escápula e do braço de anta - *Tapirus terrestris* – *Perisodactyla*, Tapiridae. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 15, p. 1-6, 2017.

PHAM, Q. D.; et al. Chemical penetration enhancers in stratum corneum — Relation between molecular effects and barrier function. **Journal of Controlled Release**, v. 232, p.175–187, 2016.

PHARMACOPEIAL FORUM. **In Vitro Release: Collaborative Study Using the Vertical Diffusion Cell**, v. 32, n. 5, sept.-oct., p.1590-6, 2006.

PISANO, D.E.; ELLIOTT, A.J.; HINMAN, D.R.; AARONSON, L.M.; PARDINI, R.S. Relationship between inhibition of mitochondrial respiration by naphthoquinones, their antitumor activity, and their redox potential. **Biochemical Pharmacology**, v.35, n.21, p.3791-3798, 1986.

PRAUSNITZ. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature reviews. Drug discovery**, v.3, p.115, 2004.

PRISTA, L. N. et al. **Administração de Medicamentos**.Tecnologia Farmacêutica I Volume. 7a Edição. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 63-99, 2008.

PROPHET, E. B.; MILLIS, B.; ARRIGTON, J. B.; SOBIN, L.H. Armed Forces Institute of Pathology. Laboratory Methods in Histotechnology. Washington, D. C., American Registry of Pathology, 1994.

QUANTIN, P.; THÉLU, A.; CATOIRE, S.; FICHEUX, H. Perspectives and strategies of alternative methods used in the risk assessment of personal care products. In: **Annales Pharmaceutiques Françaises**. Elsevier Masson, p. 422-435, 2015.

REIFENRATH, W. G.; HAWKINS, G. S.; KURTZ, M. S. Percutaneous penetration and skin retention of topically applied compounds: An in vitro-in vivo study. **J Pharm Sci**, v. 80, p. 526–532, 1991.

ROBERTS, M. S.; CROSS, S. E.; PELLETT, M. A.; WALTERS, K. A. Skin transport. In: WALTERS, K. A., editor. *Dermatological and Transdermal Formulations*. New York: Marcel Dekker; p. 89–196, 2002.

ROSS, J. H.; DONG, M.H.; KRIEGER, M.I. Conservatism in pesticide exposure assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, p. 53-58, 2000.

ROSSI, S. **Australian Medicines Handbook**. Australian Medicines Handbook Pty Ltd, Adelaide, 2006.

RUSSELL, R. L.; BURCH, W. M. S. **The principles of humane experimental technique**. Universities Federation for Animal Welfare, Wheathamsted, UK, 1959 (reprinted 1992).

SANTIS, A. K. **Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica**. 2008. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.

SANTOS, E.R.; et al. Estudos de difusão cutânea do Lapachol: Ensaio *in vitro*. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 41, n. 3, p. 15-19,1991.

SANTOS, B.; et al. Verhöeff & Tricrômio de Masson: Aplicações e Importância de um Protocolo Combinado. **Revista Técnica de Anatomia Patológica**, n. 16, p.23-27, 2012.

SARTORELLI, P.; et al. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 8, p. 133-152,2000.

SCCS, 2010. Scientific Committee on Consumer Safety. Opinion on Basic Criteria for the In Vitro Assessment of Dermal Absorption of Cosmetic Ingredients. Updated 22nd June 2010. SCCS/1358/10.

SCHEEL, J. et al. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). **Regul Toxicol Pharmacol.**, v. 59, p. 471-492, 2011.

SCHWINDT, D. A.; WILHELM, K. P.; MAIBACH, H. I. Water diffusion characteristics of human stratum corneum at different anatomical sites *in vivo*, **J. Invest. Dermatol.**, v. 111, p. 385–389, 1998.

SCHMOOK, F. P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 51–56, 2001.

SCHOTT, H. Reología. In: Remington Pharmacia. 19. ed. Phennsylvania: Mack Publishing Company, 1995. p. 426- 455.

SCOTT, L.; ESKES, C.; HOFFMANN, S.; ADRIAENS, E.; ALEPÉE, N.; BUFO, M.; et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. **Toxicol in Vitro**. 24: 1-9, 2010.

SESTER, E.A. **Avaliação biofarmacêutica do lapachol tópico: ensaios *in vitro* e *in vivo***. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas do centro de ciências da saúde da UFPE-Recife, 1996.

SEKKAT, N.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Biophysical study of porcine ear skin *in- vivo* and its comparison to human skin *in- vivo*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 11, p. 2376-2381, 2002.

SILVA, M. F. **Determinação da bioequivalência do metronidazol a partir de comprimidos revestidos**. 2009. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo. **SÃO PAULO - 2009**.

SILVA, A.T.A. **Síntese de pró-fármacos derivados de metronidazol**. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. ARARAQUARA – SP, 2002.

SILVA, J. A. **Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados**. [Tese] Recife: Departamento Ciências Farmacêuticas, UFPE; 2008.

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. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SHAH, V.P. et al. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms – methods of evaluation of bioequivalence. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 167-171, 1998.

SHAH, VINOD P. IV–IVC for topically applied preparations—a critical evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.60, p. 309–314, 2005.

SOUSA, G. D. **Avaliação biofarmacotécnica e do potencial irritante de sistemas microemulsionados e convencionais contendo o óleo de *Syagrus cearensis* para administração tópica de Anfotericina B, utilizando métodos alternativos**. 98p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407–416, 2003.

SPARR, D. E.; et al. Controlling the hydration of the skin through the application of occluding barrier creams. **J. R. Soc.**, v. 10, 2013.

STORPIRTIS, S.; GAI, M.N.; CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J.E.; **Farmacocinética básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SULLIVAN, T. P.; et al. The pig as a model for human wound healing. **Wound Repair Regen.** v. 9, p. 66-76, 2001.

SUMMERFIELD, A.; MEURENS, F.; RICKLIN, M. E. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. **Mol. Immunol.**, v. 66, p. 14-21, 2015.

TABOSA, M.A.M. **Microemulsões contendo lapachol: desenvolvimento, caracterização e avaliação biofarmacêutica in vitro e in vivo**. 2014. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE , 2014.

TANOJO, H. et al. New design of a flow-through permeation cell for studying in vitro permeation studies across biological membranes. **Journal of Controlled Release**, v. 45, p. 41-47, 1997.

TAVASZI, J.; BUDAI, P. The use of HET-CAM test in detecting the ocular irritation: communications. **Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 72, n. 2, p. 137- 141, 2007.

TAZRART, A.; et al. Penetration and decontamination of americium-241 ex vivo using fresh and frozen pig skin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 267, p. 40-47, 2017.

TRÉZ, T. & GREIF, S. **A Verdadeira Face da Experimentação Animal: sua saúde em risco**. 2 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Educacional Fala Bicho, 2000. 200 p.

TOSATO, M.G. **Análise dos constituintes da pele humana sob efeito de cosmecêuticos por espectroscopia ramam**. Dissertação de mestrado em engenharia biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos-SP, 2010.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, v. 56, p. 7-21, 1998.

TWO, A.M.; et al. A Rosacea Part I. Introduction, categorization, histology, pathogenesis, and risk factors. **J Am Acad Dermatol.**, v. 72, n. 5, p. 749- 760, 2015.

UEDA, C.; et al. Topical and transdermal Drug products. **Pharmacopeial Forum.**, 2009.

UPPOOR, V. R. S. Regulatory perspectives on *in vitro* (dissolution) / *in vivo* (bioavailability) correlations. **Journal of Controlled Release**, v. 72, p.127-132, 2001.

U.S.FDA/CDER. Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs – *in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release, and associated studies, 1998.

VERBAAN, F.J.; et al. Improved piercing of microneedle arrays in dermatomed human skin by an impact insertion method. **J. Control. Release**, v.128, p.80-88, 2008.

VERSTRAELEN, S.; JACOBS, A.; DE WEVER, B.; VANPARYS, P. Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Toxicology in Vitro**, 27(4), 1298-1311, 2013.

WHO (World Health Organisation). KIELHORN, J.; MELCHING-KOLLMUB, S.; MANGELSDORF, I. **Dermal Absorption**. WHO / IPCS Environmental Health Criteria, Draft, February 2005, accessible through [http://www.who.int/ipcs/methods/dermal\\_absorption/en/](http://www.who.int/ipcs/methods/dermal_absorption/en/) (acessado em: Janeiro de 2018).

WILHELMUS, K. R. The Draize Eye Test. *Surv. Ophthalmol.* 6, 493-515, 2001.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced. Drug Delivery Reviews**, v.56, n.5, p. 603-618, 2004.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced. Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 128- 137, 2012.

WILSON, S.L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. **Toxicol.**, v. 327, p, 32–46, 2015.

WORTH, A. P.; BALLS, M. The importance of the prediction model in the validation of alternative test. **Alternative Laboratory Animal**, v. 29, p. 135-143, 2001.

WORTH, A. P.; CRONIN, M. T. D. The use of pH measurements to predict the potential of chemicals to cause acute dermal and ocular toxicity. **Toxicology**, v. 169, n. 2, p. 119 - 131, 2001.

WYNGAARDEN, J. B.; SMITH J. R. L. H.; BENNETT, J. C. **Tratado de medicina interna**. 19a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993.

XIE, F.; et al. Transdermal permeation of drugs with differing lipophilicity: Effect of penetration enhancer camphor. **Int J Pharm.**, v. 507, p. 90-101, 2016.

YAMASHITA, M.; et al. Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. **Bioorg Med Chem.**, v. 17, p. 6286–6289, 2009.

ZIP, C. M.; M.D. Innovative Use of Topical Metronidazole. **Dermatol Clin.**, v.28, p. 525–534, 2010.

## ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr.(a) para participar como voluntário(a) da pesquisa: **Bioequivalência de medicamentos para administração tópica: desenvolvimento de correlações *in vitro* – *in vivo***, que está sob a responsabilidade da pesquisadora **Prof<sup>a</sup>. Dra. Leila Bastos Leal**, Rua Arthur de Sá, S/N, Recife – PE, CEP: 50740-520, telefone:(81)94516044, e-mail: leila.leal@nudfac.com.br. Também participam também desta pesquisa: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, telefone: (81)99756222 e Karoline Belém Seixas, telefone: (81)984225887.

Este Termo de Consentimento pode conter informações que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre sua participação na pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o(a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o(a) Senhor(a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

O objetivo desta pesquisa é gerar dados dermatofarmacocinéticos (dados que avaliam o perfil da concentração *versus* tempo do fármaco na pele), em voluntários sadios, com o propósito de demonstrar que experimentos *in vitro* (não invasivos), relacionados à atuação de produtos tópicos são correlacionáveis com resultados *in vivo*. O estudo será realizado utilizando abordagens experimentais simples, mas que podem ser confiáveis e reproduzíveis.

A formulação será aplicada uma única vez na pele do seu antebraço e permanecerá em contato por 6 horas. Após esse período você deverá retornar ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento (CP&D) do Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC), localizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para remoção da formulação residual de todos os locais de tratamento.

Após a remoção, em todas as áreas expostas às formulações, serão aplicadas fitas adesivas, com o objetivo de remover o estrato córneo. O procedimento de extração será realizado pressionando a tira de fita adesiva firmemente à pele e, em seguida, removendo-a rapidamente.

Durante a remoção das formulações, serão feitas medidas da taxa de perda de água a partir da pele, utilizando equipamento que avalia a pele de maneira não invasiva, ou seja, sem causar corte ou dor, pois possuem sondas especiais, que são somente encostadas na pele durante a leitura.

Esta pesquisa pode trazer alguns riscos, eventualmente, as formulações podem causar irritação (leve inflamação), hiperpigmentação local, dermatite, vermelhidão e coceira, o que pode ocorrer com o uso de qualquer formulação tópica. Mas, para sua segurança a pesquisadora arcará com TODAS as despesas que forem necessárias, caso você tenha algum problema.

Os voluntários que aceitarem participar contribuirão com o desenvolvimento de uma abordagem de bioequivalência tópica que irá facilitar o desenvolvimento de medicamentos eficazes e menos dispendiosos.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento - CP&D/NUDFAC, no endereço acima informado por um período mínimo de 5 anos, sob responsabilidade da pesquisadora principal.

Depois de ter recebido a explicação e tirado minhas dúvidas, concordo em participar da pesquisa **BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA: DESENVOLVIMENTO DE CORRELAÇÕES *IN VITRO* – *IN VIVO***. Estou ciente de que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, e deixar de participar do estudo sem que isto me traga alguma penalidade ou prejuízo.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **Avenida da**

Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.:  
(81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.

---

**Profa. Dra. Leila Bastos Leal**  
**Pesquisadora principal**

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)**

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA: DESENVOLVIMENTO DE CORRELAÇÕES *IN VITRO* – *IN VIVO***, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Recife, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

<b>Nome:</b>	<b>Nome:</b>
<b>Assinatura:</b>	<b>Assinatura:</b>

## ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA E APROVAÇÃO DO ESTUDO

<b>Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos</b>		<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-</b>	
--	---	---	---

### COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** BIOEQUIVALÊNCIA DE FORMULAÇÕES PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA CONTENDO LAPACHOL: DESENVOLVIMENTO DE CORRELAÇÕES IN VITRO e IN VIVO.

**Pesquisador:** LEILA BASTOS LEAL

**Versão:** 1

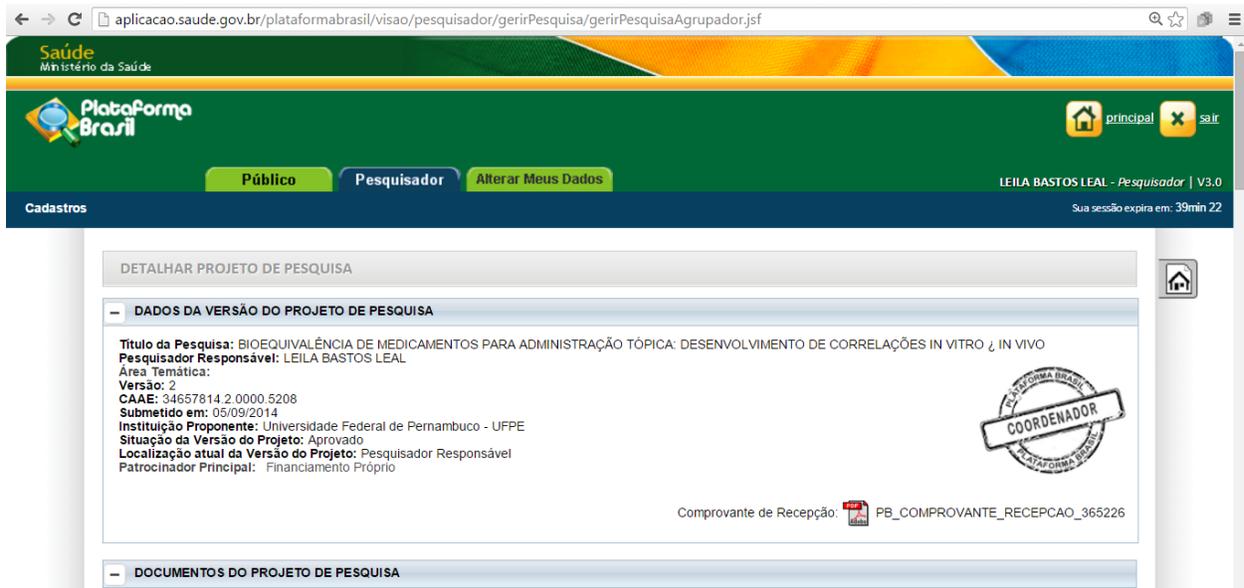
**CAAE:** 36315514.2.0000.5208

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

#### DADOS DO COMPROVANTE

**Número do Comprovante:** 081724/2014

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio



The screenshot shows a web browser window with the URL `aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/visao/pesquisador/gerirPesquisa/gerirPesquisaAgrupador.jsf`. The page header includes the 'Saúde Ministério da Saúde' logo and the 'Plataforma Brasil' logo. A navigation bar contains buttons for 'Público', 'Pesquisador', and 'Alterar Meus Dados'. The user is logged in as 'LEILA BASTOS LEAL - Pesquisador | V3.0' and the session expires in 39 minutes.

The main content area is titled 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA' and contains a section for 'DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA' with the following information:

- Título da Pesquisa:** BIOEQUIVALÊNCIA DE MEDICAMENTOS PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA: DESENVOLVIMENTO DE CORRELAÇÕES IN VITRO e IN VIVO
- Pesquisador Responsável:** LEILA BASTOS LEAL
- Área Temática:**
- Versão:** 2
- CAAE:** 34657814.2.0000.5208
- Submetido em:** 05/09/2014
- Instituição Proponente:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
- Situação da Versão do Projeto:** Aprovado
- Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável
- Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

A circular stamp with the text 'COORDENADOR' is visible on the right side of the details section. Below the details, there is a section for 'DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA' and a link for 'Comprovante de Recepção' with the file name 'PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_365226'.