



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

GUSTAVO AUGUSTO PEREIRA DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS NO DESENVOLVIMENTO E
AVALIAÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS DERMATOLÓGICAS**

Recife – PE
2018

GUSTAVO AUGUSTO PEREIRA DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS NO DESENVOLVIMENTO E
AVALIAÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS DERMATOLÓGICAS**

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

Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Leila Bastos Leal

Co – orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Recife – PE
2018

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

S237u	Santos, Gustavo Augusto Pereira dos. Utilização dos métodos alternativos no desenvolvimento e avaliação de formas farmacêuticas dermatológicas / Gustavo Augusto Pereira dos Santos. – Recife: o autor, 2018. 149 f.; il.; 30 cm. Orientadora: Leila Bastos Leal. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Inclui referências. 1. Alternativas aos testes com animais. 2. Administração tópica. 3. Técnicas <i>in vitro</i>. 4. Membrana corioalantóide. I. Leal, Leila Bastos. (orientadora). II. Título. 615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 012)
-------	---

GUSTAVO AUGUSTO PEREIRA DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS NO DESENVOLVIMENTO E
AVALIAÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS DERMATOLÓGICAS**

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: 31 / 07 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. ^a Dr. ^a Leila Bastos Leal (Orientadora - Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. ^a Dr. ^a Danielle Cristine Almeida Silva de Santana (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. ^a Dr. ^a Ana Amélia Moreira Lira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Sergipe

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosa Pereira e Geraldo Santos, referência de base familiar e seres humanos. Com todo meu amor e gratidão, desejo ter sido motivo de orgulho e merecedor do esforço dedicado por vocês à minha jornada acadêmica e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus (razão de tudo) pelo dom da vida, por ter me proporcionado viver experiências indescritíveis ao longo dessa jornada acadêmica, me guiar, me dar lucidez, sabedoria e me acalantar nos momentos de angústia, por ter colocado pessoas maravilhosas ao longo dessa caminhada e principalmente, pela família em que eu fui concebido, que representam a minha base.

Gostaria de agradecer aos meus pais e ao meu irmão, meus exemplos, por terem me tornado o que sou hoje e por toda a confiança e apoio depositados principalmente nos momentos em que nem mesmo eu acreditava que seria possível. Em especial, á minha mãe Rosa, por ser meu porto seguro, por acordar comigo, por me escutar, me acalmar, por cada gesto de carinho e por estar comigo em todos os momentos dessa jornada sem medir esforços para que o melhor sempre chegasse até mim. Eu amo vocês muito mais do que a mim mesmo não só por tudo que vocês representam a mim, mas a tantos outros que precisam tanto de vocês. Sem vocês a vida não teria sentido.

Á minha prima Eduarda, a quem considero como irmã, por ser a maior credora e compartilhar comigo da mesma jornada, por ser a maior torcedora e se fazer sempre presente na minha vida sempre me trazendo alegria e coragem para alcançar meus objetivos. Ás minhas primas, Ana e Lúcia, pelo companheirismo, conselhos, amizade e por sempre me encorajarem nos momentos em que eu mais precisei.

Ás minhas amigas de longa data Karol e Isabelle por estarem sempre ao meu lado, pela amizade, companheirismo, e fazer meus dias mais leves e divertidos. Por compartilharem do seu tempo comigo e sempre acreditarem na minha capacidade, me ajudando durante minha trajetória e incertezas. Com toda a certeza eu não teria chegado tão longe sem vocês ao meu lado.

Á minha orientadora Prof^a. Dr^a. Leila Bastos Leal, pela confiança depositada em mim, por acreditar no meu potencial e ter feito perdurar essa parceria por tantos anos. Pelo exemplo de determinação ao mesmo tempo em que não mede esforços para que tudo seja resolvido da melhor forma. Sua contribuição foi de extrema importância para a construção da minha formação acadêmica e pessoal. Agradeço pelo suporte, pelo cuidado, pela parceria e por ter me encorajado a correr atrás do que me faz feliz. Á senhora deixo aqui minha sincera admiração e respeito por tudo o que representa e me foi proporcionado. Não esquecerei jamais!

Ao prof. Davi pelas oportunidades proporcionadas e pelos pensamentos, experiências e conselhos compartilhados ao longo dessa trajetória e ao prof. Danilo pelos conhecimentos compartilhados e pela ajuda em toda parte analítica do projeto.

À toda a família NUDFAC, desde os mais antigos integrantes (Ellison, Noely, Danilo Karine, Giovana e Alice) aos mais novos membros com quem tive oportunidade de conhecer melhor com o tempo (Ana Rosa, Wellithom, Irla, Nayara, Maira, Diego, Carol Costa, Carol Chagas, Juliana, Asley, Carol, Camila) por toda ajuda, cada risada e todos os momentos compartilhados.

À Giovana pela disponibilidade, pela ajuda e por todo conhecimento compartilhado ao longo desses anos e principalmente no que se refere aos métodos alternativos.

Agradeço em especial à Juliana por todo o suporte, toda a ajuda, todos os favores prestados, e por estar envolvida e coordenar a grande maioria dos ensaios de métodos alternativos. Você foi peça fundamental nesse projeto.

À Irla e Asley, pelas risadas, amizade e convivência durante os experimentos, por se fazerem sempre presentes e dispostas a ajudar no que for preciso.

Meus sinceros agradecimentos a Thalita e Isabelle, pela paciência e atenção, por terem me ajudado sempre que solicitadas. Vocês foram muito importantes e parte fundamental para a realização dessa etapa. Muito obrigado pela ajuda e por tudo.

À todos os voluntários do estudo clínico. Obrigado pela disponibilidade e confiança.

À Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade por todo o suporte.

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho seja através de ações, disponibilidade ou apenas palavras de conforto e coragem. Esse trabalho carrega um pouco de cada um de vocês e eu serei eternamente grato.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; Tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos.” (BALEKI, 2005).

RESUMO

A avaliação da eficácia e segurança de medicamentos tópicos dermatológicos através de ensaios biológicos deve preceder a inserção de um produto no mercado tendo ainda a experimentação animal como forma de avaliação da mesma. Diante disso, aumentaram-se os esforços para o desenvolvimento de métodos alternativos que pudessem substituir, refinar e/ou reduzir a utilização de animais em pesquisa. Estudos de absorção dérmica desempenham papel essencial na avaliação do comportamento biofarmacotécnico de produtos tópicos. O BCOP é o primeiro método alternativo validado que compõem o ICCVAM para segurança oftálmica. Já o HET-CAM e CAM-TBS avaliam o potencial irritante de substâncias ou produtos na membrana corialantóide. Considerando a importância e a atual necessidade de melhor fundamentação e validação dos métodos alternativos aos estudos em animais no cenário nacional e internacional, a aplicabilidade dos mesmos foi investigada através de diferentes formulações tópicas contendo metronidazol e lapachol. As formulações foram preparadas e caracterizadas através de ensaios pertinentes a cada tipo de formulação (gel, microemulsão e termogel). Foram realizados experimentos de liberação *in vitro* utilizando membrana sintética e estudos de permeação *ex vivo* com pele de porco ambos em sistema de células de Franz automatizado para avaliação da absorção dérmica baseado no guia 428 da OECD. A avaliação de DPK *in vitro* foi incluída para as diferentes formulações e a dermatofarmacocinética *in vivo* foi avaliada para o lapachol. A metodologia empregada no estudo do BCOP foi realizada segundo o protocolo nº 437 da OECD utilizando-se de córneas bovinas excisadas. O método referenciado no guia nº 07-4517I do ICCVAM foi seguido para os ensaios HET-CAM e CAM-TBS na avaliação dos ovos embrionados de galinha. As formulações investigadas e desenvolvida pelo estudo foram obtidas e caracterizadas mostrando compatibilidade na administração por via tópica. Na absorção cutânea *in vitro*, os estudos de liberação e permeação *in vitro* das formulações contendo MTZ e LAP foram de grande importância para um melhor entendimento das características de penetração e difusão cutânea dos fármacos. A análise dos dados de retenção *in vitro* através da dermatofarmacocinética se mostrou de grande valia como ferramenta para melhor avaliação da absorção cutânea e grande aliada dos métodos alternativos visto que boa consistência dos dados experimentais foi encontrada através da pequena variabilidade e reprodutibilidade, utilizando modelos *in vitro* sem participação de animais para finalidade de pesquisa. O estudo *in vivo* do lapachol foi bem tolerado e informações importantes foram extraídas sobre o comportamento do fármaco sendo possível sugerir uma potencial correlação *in vitro/in vivo*,

favorecendo o processo de consolidação da utilização da DPK como técnica para avaliação de produtos tópicos. Todos os métodos alternativos demonstraram reprodutibilidade e eficiência na avaliação da segurança das formulações e podem ser de notória utilidade na avaliação das características de absorção cutânea e potencial irritante de novos sistemas. A aplicabilidade dos métodos alternativos analisados foi constatada, reforçando a viabilidade dessas técnicas na substituição e redução do uso de animais de laboratório em pesquisa. Fatos esses de grande importância no atual cenário nacional e internacional de implementação e principalmente de validação dos métodos alternativos.

Palavras-chave: Alternativas aos testes com animais. Administração tópica. Técnicas *in vitro*. Membrana corioalantóide.

ABSTRACT

The efficacy and safety evaluation of topical dermatological medicinal products through biological tests should precede the insertion of a product on the market, and animal testing it is still the way used to evaluate them. Thus, efforts were made to develop alternative methods that could replace, refine and / or reduce the use of animals in research. Dermal absorption studies play an essential role in the evaluation of the biopharmacotechnical behavior of topical products. BCOP is the first validated alternative method that makes up ICCVAM for ophthalmic safety. HET-CAM and CAM-TBS assess the irritant potential of substances or products in the chorioallantoic membrane. Considering the importance and the current need for a better foundation and validation of alternative methods to animal studies in the national and international scenario, the applicability of these methods was investigated through different topical formulations containing metronidazole and lapachol. The formulations were prepared and characterized by assays pertinent to each type of formulation (gel, microemulsion and thermogel). *In vitro* releasing experiments using synthetic membrane and *ex vivo* permeation studies with pig skin were performed in automated Franz cell system for assessment of dermal absorption based on OECD guide 428. Evaluation of *in vitro* DPK was included for the different formulations and an *in vivo* DPK was evaluated for lapachol. The methodology used in the BCOP study was performed according to protocol n° 437 of the OECD using excised bovine corneas. The method referenced in ICCVAM guideline n° 07-4517I was followed for the HET-CAM and CAM-TBS assays in the evaluation of embryonated chicken eggs. The formulations investigated and developed by the study were obtained and characterized showing compatibility with topical administration. In *in vitro* dermal absorption, the *in vitro* release and permeation studies of formulations containing MTZ and LAP were of great importance for a better understanding of cutaneous penetration and diffusion characteristics of the drugs. The analysis of *in vitro* retention data through DPK proved to be of great value as a tool for better evaluation of skin absorption and great ally of alternative methods since good consistency of the experimental data was found through the small variability and reproducibility using *in vitro* models without participation of animals for research purposes. The *in vivo* study of lapachol was well tolerated and important information was extracted on the behavior of the drug and it was possible to suggest a potential *in vitro* / *in vivo* correlation, favoring the process of consolidation of the use of DPK as a topical product evaluation technique. All alternative methods have demonstrated reproducibility and efficiency in evaluating the safety of formulations and may be of notable utility in assessing

the skin absorption characteristics and irritating potential of new systems. The applicability of the alternative methods analyzed was verified, reinforcing the viability of these techniques in the substitution and reduction of the use of laboratory animals in research. These facts are of great importance in the current national and international scenario of implementation and, mainly, of validation of alternative methods.

Keywords: Animal testing alternatives. Topical administration. *In vitro* techniques. Chorioallantoic membrane.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática da estrutura da pele.....	28
Figura 2 –	Estruturação da epiderme.....	29
Figura 3 –	Componentes envolvidos na formação da função barreira da pele.....	30
Figura 4 –	Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo.....	31
Figura 5 –	Estrutura química do Metronidazol.....	34
Figura 6 –	Representação da molécula do lapachol, forma estrutural	38
Figura 7 –	Células de difusão de Franz automatizadas	52
Figura 8 –	Remoção de uma camada de estrato córneo com uma fita adesiva.....	56
Figura 9 –	Pele de orelha de porco dissecada.....	64
Figura 10 –	Imagem dos braços de um voluntário do estudo, contendo gel de lapachol em um dos antebraços (seta preta) e microemulsão com lapachol no outro (seta vermelha), onde podem ser observados os quatro locais de tratamento em cada antebraço sendo destinadas duas áreas para cada tempo de contato analisado (2 e 6 h).....	71
Figura 11 –	Excisão da córnea bovina	73
Figura 12 –	Montagem da córnea bovina no suporte do opacitômetro	73
Figura 13 –	Posicionamento da córnea bovina no suporte do opacitômetro...	74
Figura 14 –	Leitura de opacidade e incubação em estufa.....	74
Figura 15 –	Incubação dos ovos em chocadeira com rotação automática	76
Figura 16 –	Remoção da membrana da casca.....	77
Figura 17 –	Aplicação da formulação teste sobre a CAM (A) e lavagem da formulação com solução fisiológica a 37 °C (B).....	77

Figura 18 –	Reações irritativas ocorridas após aplicação do controle positivo.....	78
Figura 19 –	Membrana corioalantóide delimitada por um anel de silicone.....	79
Figura 20 –	Aplicação da solução de corante azul de Trypan 0,1% sobre a membrana corioalantóide delimitada com anel de silicone.....	80
Figura 21 –	Fotomicrografias ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação desenvolvida do tipo microemulsão contendo MTZ 0,75% (B), seu respectivo placebo (A) e uma formulação convencional do tipo emulsão (C).....	86
Figura 22 –	Teste de corante realizado para a microemulsão contendo MTZ 0,75% desenvolvida.....	87
Figura 23 –	Variação do parâmetros G' (pontilhado escuro) G'' (pontilhado claro) do termogel com Metronidazol em função do aumento da temperatura.....	89
Figura 24 –	Reograma do termogel contendo MTZ 0,75%.....	89
Figura 25 –	Quantidade percentual do metronidazol liberado das formulações estudadas <i>in vitro</i> em membrana hidrofílica (média $\pm$ DP, n = 14)	90
Figura 26 –	Quantidade do metronidazol encontrada no líquido receptor a partir das formulações estudadas em pele dorsal de porco após 6 h de estudo (média $\pm$ DP, n = 14).....	92
Figura 27 –	Quantidade de MTZ por centímetro quadrado retida no EC após 6 h de absorção após a aplicação das três formulações MTZ (n = 14).....	94
Figura 28 –	Quantidade de MTZ por centímetro quadrado retida no EC por fita ao longo das 30 fitas para três formulações (n = 14)	95
Figura 29 –	Quantidade de MTZ por centímetro quadrado retida na epiderme viável + derme para as três formulações (n = 14) após 6 h de estudo.....	96
Figura 30 –	Quantidade de LAP por centímetro quadrado retida no estrato córneo (EC), epiderme viável + derme (EP+D) e no líquido	

	receptor (LR) após 2 h de absorção após a aplicação das três formulações.....	98
Figura 31 –	Quantidade de LAP por centímetro quadrado retida no estrato córneo (EC), epiderme viável + derme (EP+D) e no líquido receptor (LR) após 6 h de absorção após a aplicação das três formulações.	99
Figura 32 –	Quantidade de LAP por centímetro quadrado retida no estrato córneo (EC) <i>in vivo</i> , após 2 h de absorção após a aplicação das três formulações.....	105
Figura 33 –	Quantidade de LAP por centímetro quadrado retida no estrato córneo <i>in vivo</i> após 6 h de absorção após a aplicação das três formulações.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Comparação dos parâmetros biofísicos das peles suína e humana <i>in vivo</i>	53
Tabela 2 –	Composição das formulações tópicas contendo Metronidazol a 0,75%.....	60
Tabela 3 –	Composição das formulações tópicas contendo Lapachol a 0,5%.....	61
Tabela 4 –	Quantidades de solução padrão de lapachol em metanol adicionadas nas fitas adesivas contendo o EC para estudo de recuperação do fármaco <i>in vivo</i> em humanos.....	69
Tabela 5 –	Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio BCOP	75
Tabela 6 –	Graduação das alterações observadas na membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.....	78
Tabela 7 –	Classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio HET-CAM.....	78
Tabela 8 –	Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio CAM-TBS.....	80
Tabela 9 –	pH das formulações contendo metronidazol avaliadas pelo estudo.....	82
Tabela 10 –	pH das formulações contendo lapachol avaliadas pelo estudo.....	82
Tabela 11 –	Valores de tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta das microemulsões contendo metronidazol e placebo desenvolvidos no estudo.....	84
Tabela 12 –	Média e DP para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC e na epiderme/derme após 6 h de absorção após a aplicação das três formulações MTZ 0,75% (n = 14) em pele de porco.....	95

Tabela 13 –	Média e DP para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC e na epiderme/derme após 2 h de absorção após a aplicação das formulações contendo LAP 0,5% (n = 14) em pele de porco.....	98
Tabela 14 –	Média e DP para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC e na epiderme/derme após 6 h de absorção após a aplicação das formulações contendo LAP 0,5% (n = 14) em pele de porco.....	100
Tabela 15 –	Recuperação do lapachol no EC das fitas adesivas para as concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL por tipo de método de extração para estudo <i>in vivo</i> em humanos.....	103
Tabela 16 –	Média, DP e CV para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC após 2h e 6 h de absorção após a aplicação das formulações contendo LAP 0,5% (n = 14) em humanos.....	105
Tabela 17 –	Média e DP da pontuação obtida no teste de opacidade e permeabilidade córnea (BCOP) utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo MTZ 0,75% ou não (placebo) (n = 6).....	109
Tabela 18 –	Média e DP da pontuação obtida no teste de opacidade e permeabilidade córnea (BCOP) utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo LAP 0,5% ou não (placebo) (n = 6).....	111
Tabela 19 –	Média e DP da pontuação obtida através do teste HET-CAM utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo MTZ 0,75% ou não (placebo) (n = 6).....	112
Tabela 20 –	Média e DP da pontuação obtida através do teste HET-CAM utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo LAP 0,5% ou não (placebo) (n = 6).....	113
Tabela 21 –	Média e DP da pontuação obtida através do teste CAM-TBS utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo MTZ 0,75% ou não (placebo) (n = 6).....	115
Tabela 22 –	Média e DP da pontuação obtida através do teste CAM-TBS	

utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo LAP 0,5% ou não (placebo) (n = 6).....	116
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AUC	Area under the curve (Área sob a curva)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BraCVAM	Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos
BCOP	Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina
BD	Biodisponibilidade
BE	Bioequivalência
BMV	Betametasona valerato
CAM	Membrana cório-alantóide
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLAE-UV	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	Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos
FDA	Food and Drug Administration
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
MCT	Medium Chain Triglycerides (Formulação gelificada)
ME	Microemulsão
MTZ	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
SD	Desvio padrão
TEWL	Perda de água transepidermal
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos
WHO	World Health Organization
3R's	Substituição, refinamento e redução

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
mm	Milímetros
°C	Graus Celsius
rpm	Rotações por minuto
mg	Miligramas
mL	Mililitros
v/v	Volume/ volume
mM	Milimolar
μL	Microlitros
μg	Microgramas
cm ²	Centímetros quadrados
J	Fluxo
%	Porcentagem
μm	Micrômetro
cm	centímetro
g	grama
h	Hora
min	Minuto
K _p	Coeficiente de permeabilidade
nm	Nanômetros
Pa.s	Pascal segundo
p/v	peso/volume
s	Segundo
r ²	Coeficiente de determinação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	28
3.1	ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS TÓPICOS NA PELE.....	28
3.2	FORMULAÇÕES TÓPICAS AVALIADAS.....	32
3.3	FÁRMACOS MODELOS USADOS NESTE ESTUDO.....	34
3.3.1	<i>Metronidazol.....</i>	34
3.3.2	<i>Lapachol.....</i>	37
3.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE ATRAVÉS DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS.....	41
3.4.1	<i>Teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP – OECD TG 437).....</i>	45
3.4.2	<i>Teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) e sua variação CAM-TBS.....</i>	47
3.4.3	<i>Absorção cutânea: metodologia in vitro (OECD TG 428).....</i>	50
3.4.3.1	<i>Estudos in vitro de formulações tópicas.....</i>	51
3.4.3.2	<i>Estudos de permeação e uso de pele animal.....</i>	52
3.5	AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO CUTÂNEA ATRAVÉS DE ESTUDOS DE DERMATOFARMACOCINÉTICA E CORRELAÇÃO IN VITRO/IN VIVO.....	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1	INSUMOS.....	60
4.2	FORMULAÇÕES UTILIZADAS.....	60
4.2.1.	<i>Preparação dos géis.....</i>	61
4.2.2	<i>Preparação das microemulsões.....</i>	61
4.2.3	<i>Preparação do termogel.....</i>	62
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	62

4.3.1	<i>Determinação do pH.....</i>	62
4.3.2	<i>Potencial zeta e tamanho de partícula.....</i>	62
4.3.3	<i>Centrifugação.....</i>	62
4.3.4	<i>Microscopia de luz polarizada.....</i>	63
4.3.5	<i>Teste de solubilidade em corante.....</i>	63
4.3.6	<i>Temperatura de transição sol-gel.....</i>	63
4.4	AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES.....	63
4.4.1	<i>Obtenção e dermatomização da pele de porco.....</i>	63
4.4.2	<i>Avaliação da absorção cutânea (OECD TG 428).....</i>	64
4.4.2.1	<i>Estudo de liberação in vitro das formulações.....</i>	64
4.4.2.2	<i>Experimentos de permeação cutânea in vitro/ex vivo.....</i>	65
4.4.3	<i>Estudo de dermatofarmacocinética (dpk) – tape-stripping in vitro.....</i>	66
4.4.4	<i>Processo de extração.....</i>	67
4.4.5	<i>Doseamento das amostras por CLAE.....</i>	68
4.4.6	<i>Estudo de dermatofarmacocinética in vivo.....</i>	68
4.4.6.1	<i>Recuperação do lapachol no estrato córneo humano e estabilidade das amostras.....</i>	68
4.4.6.2	<i>Protocolo do estudo dermatofarmacocinético do lapachol em humanos.....</i>	70
4.5	MÉTODOS ALTERNATIVOS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE.....	72
4.5.1	<i>Teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP – OECD TG 437).....</i>	72
4.5.2	<i>Teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM).....</i>	75
4.5.3	<i>Teste de membrana corioalantóide associado ao azul de trypan (CAM-TBS).....</i>	79
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	81
5.1.1	<i>pH.....</i>	81

5.1.2	<i>Determinação do tamanho de gotícula e potencial zeta.....</i>	82
5.1.3	<i>Microscopia de luz polarizada.....</i>	85
5.1.4	<i>Teste de solubilidade em corante.....</i>	87
5.1.5	<i>Teste de centrifugação.....</i>	87
5.1.6	<i>Temperatura de transição sol-gel e reograma do termogel.....</i>	88
5.2	AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES.....	89
5.2.1	<i>Absorção cutânea (OECD TG 428).....</i>	90
5.2.1.1	<i>Estudos de liberação in vitro das formulações.....</i>	90
5.2.1.2	<i>Estudos de permeação in vitro/ex vivo das formulações.....</i>	91
5.2.2	<i>Estudo e avaliação dermatofarmacocinética (dpk) – tape-stripping in vitro..</i>	93
5.2.2.1	<i>Metronidazol.....</i>	93
5.2.2.2	<i>Lapachol.....</i>	97
5.2.3	<i>Estudo de dermatofarmacocinética in vivo para as formulações com lapachol.....</i>	102
5.2.3.1	<i>Recuperação do lapachol no estrato córneo humano e estabilidade das amostras.....</i>	103
5.2.3.2	<i>Retenção do lapachol no estrato córneo humano.....</i>	104
5.3	MÉTODOS ALTERNATIVOS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE.....	107
5.3.1	<i>Teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP – OECD TG 437).....</i>	108
5.3.2	<i>Teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM).....</i>	112
5.3.3	<i>Teste de membrana corioalantóide associado ao azul de trypan (CAM-TBS).....</i>	115
6	CONCLUSÃO.....	118
	REFERÊNCIAS.....	120

1 INTRODUÇÃO

A aplicação de fármacos através da via cutânea é usada tanto para terapia tópica local quanto para o tratamento sistêmico, se mostrando bastante promissora por, primariamente, evitar o metabolismo de primeira passagem que pode ocorrer após administração oral e a possibilidade de reduzir os efeitos colaterais (WAGNER et al, 2001). Entretanto, desenvolver sistemas efetivos para essa finalidade ainda é uma tarefa desafiadora, principalmente quando a intenção é promover a penetração e/ ou a retenção do fármaco nas camadas viáveis da pele, já que a pele é uma barreira natural à entrada de qualquer substância estranha ao organismo (FOLDVARI, 2000; SILVA et al., 2010).

Dessa forma, existe uma busca constante por estratégias para vencer tal barreira sem danificá-la, bem como para promover a chegada do fármaco em camadas específicas da pele, visto que para uma terapia bem sucedida, além da farmacologia e do mecanismo de ação do fármaco, a sua concentração e a concentração dos seus metabólitos no local alvo, também são importantes (NAIK; KALIA; GUY, 2000; ALEXANDER et al., 2012).

A avaliação da eficácia e segurança de medicamentos tópicos através de ensaios biológicos deve preceder a inserção de um produto no mercado. Para cumprir este propósito, o modelo animal é o mais utilizado e requerido nos processos investigativos. Entretanto, a utilização de animais na pesquisa tem sido razão de diversas discussões em função do grande número necessário e do sofrimento causado aos mesmos (SCHEEL et al., 2011).

Em virtude dessa racional, aumentaram-se os esforços para o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais que pudessem substituir, refinar e/ou reduzir a utilização de animais para avaliação da eficácia e segurança de medicamentos dermatológicos e fins de pesquisa. Nesse contexto, as metodologias alternativas capazes de atender a esses requisitos na diminuição do sofrimento animal em pesquisa e fomentar o princípio dos 3R's desempenham um papel essencial na seleção dos medicamentos que visem uma ação dérmica ou transdérmica (SCHMOOK; MEINGASSNER; BILLICH, 2001).

O comportamento biofarmacotécnico de uma formulação, em se tratando de liberação e/ou permeação cutânea é observado através do uso de membranas artificiais e/ou naturais (pele humana ou animal). Podem ser utilizadas, como modelo animal, as peles de rato, cobaio, camundongo com e sem pêlo, macaco rhesus, porco, cobra, entre outros, sendo as peles da orelha e o dorso de porco algumas das mais utilizadas em substituição à pele humana em virtude da sua semelhança com a pele humana (SANTIS, 2008).

De acordo com o Food and Drug Administration (FDA), a biodisponibilidade dos medicamentos de aplicação tópica de ação local pode ser feita através de ensaios clínicos, como a dermatofarmacocinética e a microdiálise dérmica, e/ou farmacodinâmicos no caso específico dos produtos corticóides.

A dermatofarmacocinética (DPK) tem sido amplamente investigada para a determinação da biodisponibilidade, pois é uma técnica que permite a determinação dos níveis de fármacos no estrato córneo em função do tempo pós-aplicação e pós-remoção do produto utilizando o tape-stripping como técnica de amostragem (US FDA, 1998). Estudos de DPK e permeação cutânea *in vitro* têm sido bastante relatados na literatura (PERSHING et al., 2002; LEOPOLD, 2003; PERSHING et al., 2003; LODÉN et al., 2004; KIM; ANDERSEN; NYLANDER-FRENCH, 2006; HERKENNE et al., 2006b; BENFELDT et al., 2007; HERKENNE et al., 2007; RUSSELL; WIEDERSBERG; DELGADO-CHARRO, 2008; WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2008; ORTIZ et al., 2008; NICOLI et al., 2009; N'DRI-STEMPFER et al., 2009; WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2009; WIEDERSBERG et al., 2009; AU; SKINNER; KANFER, 2010; BOIX-MONTANES, 2011; RUSSELL; GUY, 2012; MATEUS et al., 2013; MOHAMMED et al., 2013; FRANZEN et al., 2013).

Dentro desse contexto, a avaliação do potencial irritante de um produto farmacêutico é realizada com o objetivo de prever os riscos e possíveis efeitos nocivos que o mesmo poderá desencadear quando da exposição humana por diversas vias, principalmente a via cutânea e a via ocular que geralmente apresenta risco de exposição associado a utilização de produtos tópicos.

O teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP) avalia o potencial irritativo a partir da desnaturação proteica, precipitação celular ou inchaço estromal que gera opacidade, e pela permeabilidade da córnea bovina frente a fluoresceína devido à perda de barreira epitelial da córnea sob agressão de produtos irritantes (SCOTT et al., 2010).

Outros dois métodos, o teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) e sua variação utilizando corante azul de Trypan (CAM-TBS) que têm como objetivo a identificação e avaliação do potencial irritante de uma substância ou produto sobre a membrana corioalantóide do ovo embrionado da galinha em seu décimo dia de incubação também podem ser citados para esse tipo de abordagem (TAVASZI, BUDAI, 2007).

Apesar de muitas dessas metodologias já serem validadas e aceitas internacionalmente por diversos órgãos regulamentadores, o Brasil passa atualmente pelo seu primeiro processo de validação de uma metodologia alternativa, sendo ainda a quantidade de informações a cerca das mesmas, principalmente a nível nacional, bastante reduzida.

Portanto, tendo em vista o que foi discutido acerca dos medicamentos tópicos e considerando a importância dos métodos alternativos aos estudos em animais no cenário atual frente a emergente necessidade de fundamentação das mesmas, o presente projeto baseia-se na utilização dessas metodologias como ferramentas na investigação da aplicabilidade dessas metodologias alternativas empregando diferentes tipos de formas farmacêuticas tópicas e diferentes fármacos como modelos para tal avaliação (Metronidazol e Lapachol).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral consiste na avaliação da aplicabilidade dos métodos alternativos ao uso de animais na avaliação de diferentes tipos de formulações tópicas contendo metronidazol e lapachol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter as diferentes formulações tópicas (microemulsão, gel e termogel) contendo Metronidazol e contendo lapachol (microemulsão e gel);
- Avaliar as características físico-químicas pertinentes a cada tipo de formulação;
- Avaliar a permeação e retenção cutânea *in vitro* de Metronidazol e lapachol a partir de 3 diferentes tipos de formulações tópicas;
- Avaliar os perfis dermatofarmacocinéticos *in vitro* e *in vivo* para formulação contendo lapachol;
- Avaliar o potencial irritante das formulações através de métodos alternativos (HET-CAM, CAM – TBS e BCOP), principalmente no que trata de formulações não convencionais.

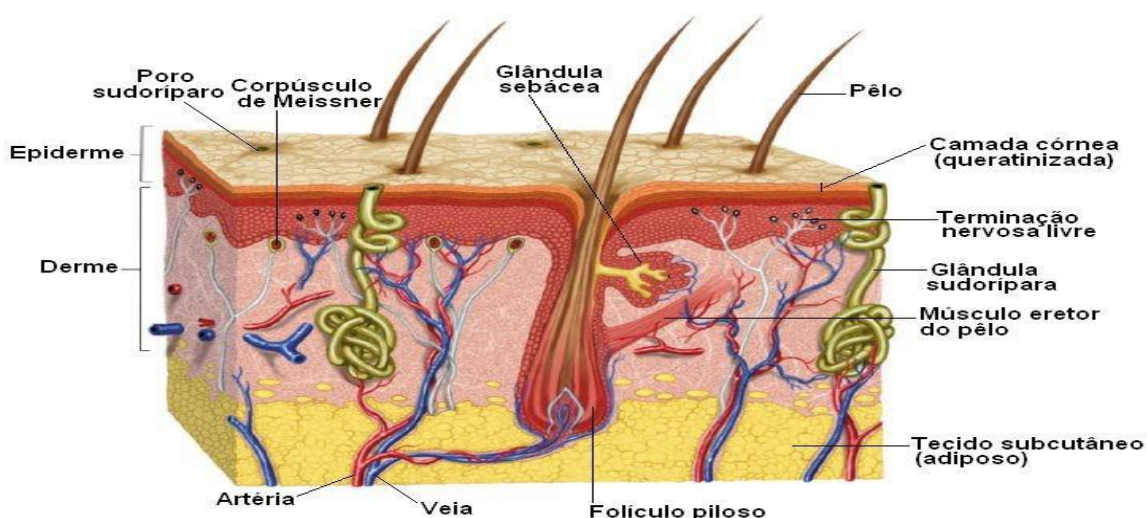
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS TÓPICOS NA PELE

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, com uma área de superfície no indivíduo adulto de aproximadamente 2 m², de espessura variável (1 a 4 mm) conforme a região, que corresponde a aproximadamente 16% da massa corporal (ANTONIO, 2007; KEDE, SABATOVICH, 2003).

É uma barreira protetora, sendo a interface entre o organismo e o meio externo, a pele é resistente, semipermeável, flexível e capaz de impedir a entrada de toxinas, corpos estranhos, agentes externos (como bactérias, fungos, poluição e raios solares), sendo responsável pela defesa do organismo contra esses e outros agentes. É também responsável pelo equilíbrio da nossa temperatura, pela produção de suor, por evitar a perda de água transepidérmica, além de possuir funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato) e de manter o equilíbrio hídrico, de eletrólitos e nutrientes (CHIEN, 2005; TOSATO, 2010; DANGELO; FATTINI, 2005; GUY; HADGRAFT, 2003; STORPIRTIS et al., 2011).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele.

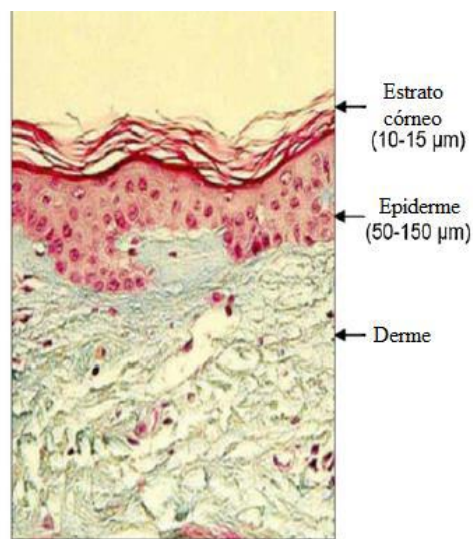


Fonte: <http://www.efdeportes.com/efd192/os-efeitos-do-acido-hialuronico.htm> - acessado em 03/01/2016.

Microscopicamente, a pele é um órgão composto de várias camadas, porém, é geralmente descrita por três camadas, onde em um corte perpendicular visto de fora para dentro, temos: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1) (DANGELO; FATTINI, 2005; TOSATO, 2010).

A epiderme é formada por tecido epitelial, a derme formada por tecido conjuntivo e a hipoderme formada por tecido adiposo, apresentando variações de células entre suas camadas. A epiderme é uma camada estratificada e avascular, onde sua camada mais superficial é o estrato ou camada córnea, mais abaixo se encontram as camadas granulosa, espinhosa e basal. As diferentes camadas mostram as fases pelas quais passam as células, que, produzidas nos estratos mais profundos, sofrem o processo de cornificação à medida que atingem os estratos mais superficiais (Figura 2) (DANGELO; FATTINI, 2005; TOSATO, 2010).

Figura 2 - Estruturação da epiderme.

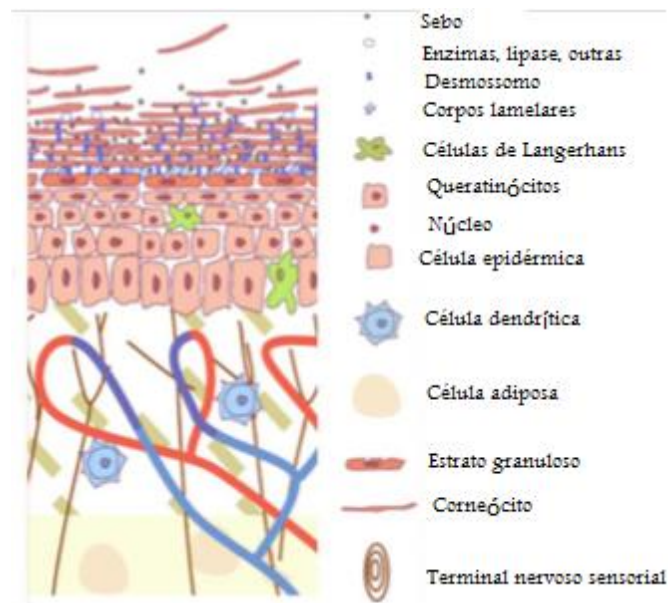


Fonte: MENON; CLEARY; LANE, 2012.

O estrato córneo tem uma organização estrutural bicompartimental, simples ao nível microscópico, constituída basicamente por células mortas preenchidas de queratina (corneócitos) incorporadas em uma matriz lipídica, visualizados a partir de estudos com fragmentos congelados, intumescidos em tampão alcalino e coradas com um corante (CHRISTOPHERS; KLIGMAN, 1964), ou quando corado com o vermelho nilo, um corante lipídico fluorescente (SIMONETTI et al., 1995).

Esta matriz lipídica é constituída principalmente de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres organizados em bicamadas lamelares cristalinas. Essas características foram prontamente comparadas a um “sistema de tijolo e argamassa” originalmente descrito por Michaels e colaboradores (1975). Tal estrutura confere ao estrato córneo uma forte característica hidrofóbica, e é caracterizada como a principal barreira à penetração de substâncias pela pele (MOSER et al., 2001; BOUWSTRA; HONEYWELL-NGUYEN, 2002).

Figura 3 - Componentes envolvidos na formação da função barreira da pele.



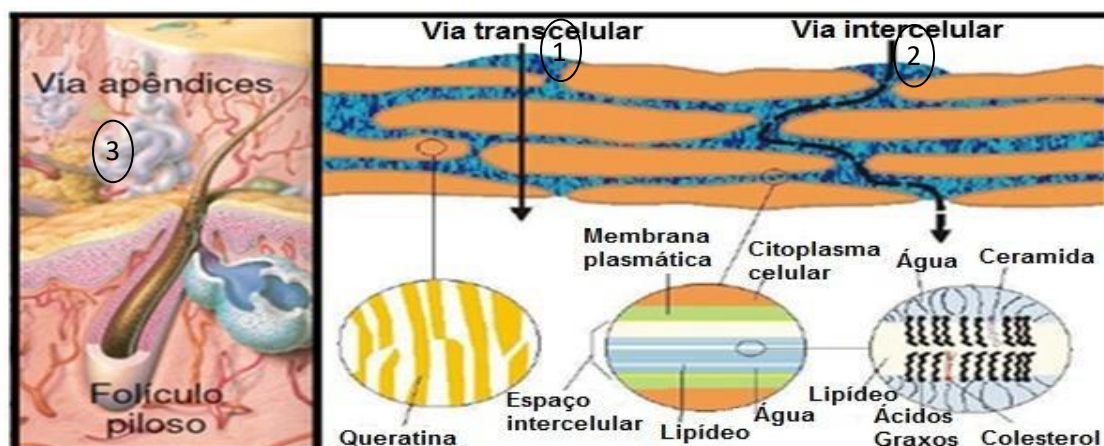
Fonte: MENON; CLEARY; LANE, 2012 (modificada).

Wolf (1939), e Winsor e Burch (1944) confirmaram que o uso de tape-stripping, lixas ou injúrias de natureza química ao estrato córneo (EC) essencialmente removiam a função de barreira da pele e o trabalho posterior de Blank (1953) provou conclusivamente que a função de barreira da pele era atribuída ao EC.

Diversos estudos, revisados por Elias (1991), dissiparam a noção tida do estrato córneo apenas como membrana passiva oclusora e desvendou a verdadeira natureza da organização do SC. A formação da barreira é na verdade um processo dinâmico (Figura 3) e realizado pela secreção de corpos lamelares epidérmicos, enriquecidos em colesterol, esfingolipídios, ácidos graxos e uma bateria de enzimas presentes na interface estrato córneo/estrato granuloso (MENON; CLEARY; LANE, 2012).

Enzimas proteolíticas secretadas pelos corpos lamelares levam a dissolução progressiva dos corneodesmossomos permitindo assim a descamação ordenada dos corneócitos. A degradação desses corneodesmossomos deixa 'lacunas' ou 'espaços' dentro das múltiplas estruturas de barreira lamelar, que desempenham um papel importante na permeabilidade transdérmica. Mais recentemente, peptídeos antimicrobianos como beta defensinas e catelicidinas foram co-localizados nos corpos lamelares e encontrados dentro do matriz extracelular do EC, assim, ligando a formação de uma barreira com permeabilidade associada a uma barreira antimicrobiana (OREN et al., 2003; BRAFF; DI NARDO; GALLO, 2005; MENON; CLEARY; LANE, 2012).

Figura 4 - Vias de permeação de fármacos através do estrato córneo.



1 – Via transcelular, 2 – Via intercelular e 3 – Via apêndices.

Fonte: GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008 (modificada).

Portanto, é muito comum atribuir à permeação através do estrato córneo como o passo determinante da absorção cutânea. Teoricamente, o fármaco pode atravessar o estrato córneo por três diferentes vias: transcelular, intercelular e através dos apêndices cutâneos (Figura 4). Na primeira via, o fármaco se difunde pelas membranas dos corneócitos e pela matriz lipídica. Na segunda, o fármaco se difunde apenas pela matriz lipídica entre os corneócitos. Já na última, os fármacos podem permear a estrutura através dos folículos pilosos. (MOSEER et al., 2001; BARRY, 2002; BOLZINGER et al., 2012).

São vários os fatores que influenciam na eficiência da pele como barreira à penetração de substâncias exógenas. Tais fatores podem ser de ordem biológica (estado da pele, idade, diferenças raciais, fluxo sanguíneo, metabolismo) e de natureza físico-química (hidratação, temperatura e pH da pele). Podem ser ainda citados os fatores relacionados às características dos permeantes (forma e tamanho molecular, coeficientes de difusão e partição ou até mesmo a concentração aplicada). E por fim, os fatores relacionados à própria formulação, que podem afetar a permeação do fármaco na pele de tal maneira, que, na ausência da formulação adequada, o fármaco dificilmente conseguiria penetrar as camadas mais profundas da pele e atingir concentrações adequadas no sítio de ação (AULTON, 2006; NAIK; KALIA; GUY, 2000).

Realizar a extrapolação a partir de vários modelos de pele usados para aplicações humanas (membranas de EC, pele de cadáver, equivalentes de pele), bem como a partir de dados de animais permanece desafiador. Nos primeiros casos podem ter falhas inerentes ou falta da resposta de reparação por completo e no caso das biomembranas obtidas de animais, o

estrato córneo pode diferir significativamente do tecido humano. Mais recentemente, além de dispositivos de pele passivos e ativos como adesivos transdérmicos, lasers, iontoforese e microagulhas, novas e variadas aplicações relacionadas a pele podem ser vistas e que não eram possíveis anteriormente (MENON; CLEARY; LANE, 2012).

3.2 FORMULAÇÕES TÓPICAS AVALIADAS

A administração pela via tópica é uma alternativa à administração oral de medicamentos, sendo caracterizada por ser uma via indolor, de fácil aplicação que não apresenta efeito de primeira passagem hepática (SOARES et al., 2015).

Formulações tópicas de ação transdérmica como, por exemplo, os medicamentos antibacterianos, exercem sua ação terapêutica apenas se presente nos tecidos alvo em concentrações adequadas. O tratamento monitorado baseia-se no pressuposto que a relação entre a concentração sanguínea do fármaco e o resultado do tratamento é mais evidente do que entre a dose e o resultado da terapia. Em alguns casos, a estimativa da concentração sanguínea de fármacos só se torna insuficiente devido ao diferente grau de sua penetração tecidual e, de uma perspectiva dermatológica, a concentração cutânea do fármaco pode ser mais importante. (EICHLER; MÜLLER, 1998; LAUDE; SALVEMINI, 1999; THIBOUTOT, 2000).

As formulações dermatológicas de aplicação tópica e ação local, são aquelas que agem nas camadas mais superficiais da pele, seja estrato córneo, epiderme viável e em alguns casos a derme. Dessa forma, a administração tópica de fármacos visando uma ação local ou sistêmica é significativamente promissora, porém, o desenvolvimento de sistemas que sejam altamente efetivos ainda consiste em uma tarefa desafiadora. Essa premissa se torna bastante verdadeira, especialmente quando o objetivo é a promoção da penetração e/ ou a retenção do fármaco nas camadas pele, uma vez que essa última é conhecidamente uma barreira natural à entrada de substâncias estranhas ao organismo (FOLDVARI, 2000; SILVA et al., 2010).

Sendo assim, para promover que o fármaco alcance as camadas específicas da pele, durante o desenvolvimento das formulações tópicas existe uma busca constante para vencer essa barreira sem danificá-la visando promover concentração adequada do fármaco na camada da pele desejada (NAIK; KALIA; GUY, 2000; ALEXANDER et al., 2012). Dentro desse mesmo cenário, quando formulações tópicas são aplicadas no tratamento de enfermidades dermatológicas, não apenas os fármacos como também os diversos veículos desempenham

um papel importante na segurança e eficácia do tratamento da pele de pacientes (REINHOLZ et al., 2013).

Dentre essas formas farmacêuticas utilizadas convencionalmente para aplicação tópica se pode citar os géis. Em virtude da constante busca por melhorias dos tratamentos existentes visando melhorar a eficácia e a segurança, sistemas de liberação de fármacos como as microemulsões e também géis termorreversíveis tem atraído grande interesse de pesquisadores acadêmicos e industriais.

As microemulsões (MEs) podem ser conceituadas como misturas termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcidas de dois líquidos imiscíveis, água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos (FORMARIZ et al., 2005; DAMASCENO et al., 2011).

O interesse da aplicação das microemulsões como sistemas de liberação de fármacos vem ganhando mais atenção por parte dos laboratórios e dos pesquisadores acadêmicos nos últimos anos (KARASULU, 2008). Devido a grande quantidade de tensoativos encontradas na formulação, na qual ocorre interação com o estrato córneo sendo a bicamada lipídica desestruturada, a permeabilidade dos fármacos pode vir a ser facilitada (FORMARIZ et al., 2006; SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2009).

Em comparação com formulações convencionais, as MEs apresentam vantagens, como a possibilidade de incorporação de fármacos solúveis e insolúveis em água, o aumento na biodisponibilidade transdérmica de fármacos e a facilidade de obtenção. Com isso, são formas promissoras na veiculação tópica de fármacos de ação local e sistêmica (SHAH et al., 2009).

Os géis podem ser definidos como preparações semissólidas que consistem em dispersões de pequenas ou grandes partículas coloidais que não se sedimentam, ou seja, ficam dispersas em um determinado veículo. Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que quando dispersos em meio aquoso assumem determinada conformação que aumentam a viscosidade da formulação (MAIA CAMPOS; BONTEMPO; LEONARDI, 1999; ALLEN, et al., 2013).

As formas farmacêuticas em gel apresentam características como boa biodisponibilidade, economia, e são sistemas seguros e versáteis que apresentam um menor grau de toxicidade com possibilidade de aplicação em diversos locais da pele (ANSEL et al., 2007; JUSTIN-TEMU et al., 2004; LOPES et al., 2006; LOYD; ALLEN, 2007).

Outra forma farmacêutica de uso tópico são os termogéis, sistemas que apresentam geleificação termorreversível, os quais são também chamados de sistemas de formação *in situ* que se comportam como líquidos a baixas temperaturas e como géis acima de uma temperatura específica conhecida como temperatura de transição sol-gel, baseados em diferentes abordagens incluindo, troca de solventes, radiação UV, pH e temperatura (DUMORTIER et al., 2006; ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2006; PEREIRA et al., 2013). Esses sistemas, que não exigem solventes ou agentes de copolimerização orgânica, ganham cada vez mais atenção pelo potencial de aumentar a eficiência, reduzir a toxicidade e melhorar a adesão do tratamento pelo paciente (AULTON, 2005; KUMAR, 2000).

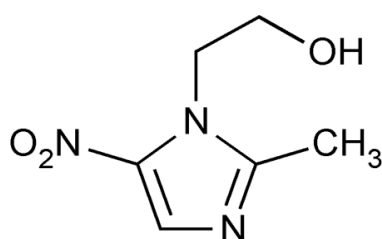
Em sua composição podem ser utilizados copolímeros não-iônicos como o Polaxamer ou Pluronic®, onde soluções concentradas desses copolímeros são capazes de gelificarem por ação da temperatura. Em baixas temperaturas (5° C) o polímero existe como um monômero livre em solução e com o aumento progressivo da temperatura tende-se a estabelecer um equilíbrio entre esses unímeros e micelas formadas *in situ*. Por fim, em temperaturas mais elevadas (37° C), são formados agregados dessas micelas que aumentam a viscosidade final, modificando a formulação de uma solução para um gel de consistência firme (CABANA; AÏT-KADI; JUHÁSZ, 1997; BERRETTA, 2007).

3.3 FÁRMACOS MODELOS USADOS NESTE ESTUDO

3.3.1. Metronidazol

Denominado quimicamente como 2-metil- 5-nitro- 1H-imidazol- 1-etanol e fórmula molecular de C₆H₉N₃O₃, o metronidazol (MTZ) (Figura 5) possui peso molecular de 171,15 g/mol e é caracterizado por ser um pó branco ou levemente amarelado, cristalino com faixa de fusão entre 159°C a 163°C (F. BRAS, 2010).

Figura 5 - Estrutura química do Metronidazol



Fonte: Farmacopeia Brasileira (2010).

O metronidazol é um derivado do 5-nitroimidazol com atividade contra protozoários anaeróbicos e bactérias e foi o primeiro utilizado para a terapêutica humana e ainda continua como o principal representante do grupo. O MTZ foi originalmente introduzido para o tratamento da tricomoniase e, nos dias de hoje, ele é encontrado comercialmente destinado a administração oral (Flagyl® comprimidos, Flagyl® tabletes, Norzol® suspensão, dentre outras) e tópica (Flagyl® supositórios, gel vaginal Zidoval®, etc.) utilizado na terapia de manejo de várias infecções causadas por bactérias, protozoários, além de ter ação antiinflamatória, (F. BRAS, 2010; LAMP et al., 1999; ZIP, 2010; SILVA, 2002). Quando absorvido sistemicamente, o MTZ atravessa a barreira placentária e atinge a circulação do feto rapidamente. Em ratos e camundongos, a administração de metronidazol causou danos ao feto, devido a isso, pertence à categoria B do FDA (administração contraindicada nos três primeiros meses de gravidez). (BANK, 2016).

Quando usado especificamente em uma formulação tópica, seu efeito é exercido na camada média da pele, a derme (ELEWSKI, 2007). O metronidazol é metabolizado em cinco metabolitos, principalmente por oxidação hepática e, em menor grau, pela glucuronidação do composto precursor e seus derivados oxidados. O principal metabólito é o hidroximetronidazol (LAMP et al, 1999). A atividade antibacteriana deste composto é em torno de 30-65% do medicamento original (PENDLAND et al., 1994; HALLER, 1982), contribuindo desse modo substancialmente para a atividade geral do metronidazol através do sinergismo do mesmo e seu principal metabólito.

Formulações tópicas contendo metronidazol são amplamente utilizadas para o tratamento da rosácea desde 1950 (GUPTA; CHAUDHRY, 2005) uma doença crônica comum da pele (POWELL, 2005).

A Rosácea consiste em uma desordem cutânea facial crônica caracterizada por várias dermatoses de caráter inflamatório. Dentro de períodos de exacerbação e remissão de sinais e sintomas, pode apresentar várias combinações de sinais cutâneos como aparecimento de eritema transitório ou persistente, edema, vasos sanguíneos visíveis (telangiectasia), lesões oculares, pápulas, pústulas e rinofima, afetando a região central da face (bochechas, queixo, nariz e testa) dos pacientes acometidos (WILKIN, 1994; WILKIN et al., 2002; CRAWFORD; PELLE; JAMES, 2004; DRESSLER-CARRE, 2005; ROSSI, 2006; NORWOOD; NORWOOD, 2007; BARCO; ALOMAR, 2008; FULLER; MARTIN, 2012; RAGHALLAIGH; POWELL, 2015; FELDMAN; HUANG; HUYNH, 2014).

A Sociedade Americana de Rosácea classificou a doença em quatro subtipos: Rosácea eritemato telangiectásica, rosácea pápulo pustular, rosácea fimatosa e rosácea ocular (TWO et al., 2015). Embora sua etiologia ainda seja desconhecida, até agora, a desregulação do sistema imune inato (queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, células dendríticas) e adaptativo (células T auxiliares (Th) 1, células Th17, células plasmáticas) foram relatados como principais achados. Nessa rede desregulada, quantidades aumentadas dos níveis de peptídeos antimicrobianos, neuropeptídeos, espécies radicais de óxido nítrico, proteases, citocinas, quimiocinas, fator de crescimento vascular (VEGF) juntamente com receptores para citocinas, quimiocinas, neurotransmissores, VEGF ou receptores de canais iônicos transientes foram detectados (BAKAR et al., 2007; SMITH et al., 2007; SCHAUER; GALLO, 2009; STEINHOFF et al., 2011; CASAS et al., 2012; SULK et al., 2012; CODA et al., 2013; JARMUDA et al., 2014; MUTO et al., 2014; BUHL et al., 2015; HELFRICH et al., 2015).

Estudo comparando o MTZ com o placebo demonstrou que as preparações convencionais contendo metronidazol disponíveis no mercado (0,75 e 1% creme, 0,75% gel e 0,75% loção) mostraram ser mais eficaz na redução do eritema, pápulas, e pústulas em múltiplos ensaios com pacientes acometidos por essa doença. Não é de conhecimento o mecanismo pelo qual o metronidazol reduz o componente inflamatório da rosácea. Porém, estudos sugerem que o grupo nitro do MTZ é capaz de servir como aceptor de elétrons, formando compostos citotóxicos que levam a morte celular de protozoários anaeróbicos, no caso de infecções dessa natureza. O fármaco ainda tem ação de inibição dos mediadores inflamatórios que são gerados por neutrófilos, reduzindo assim a lesão oxidativa do tecido (MCCLELLAN; NOBLE, 2000; BARCO; ALOMAR, 2008; LOWE, 2003; PELLE; CRAWFORD; JAMES, 2004; TWO et al., 2015).

Apesar de no mercado está disponível em diversas formas farmacêuticas, o gel de metronidazol se destaca no tratamento tópico da rosácea, sendo massivamente reconhecido no mercado farmacêutico nacional e internacional, encontrando-se sob uma grande diversidade de formas farmacêuticas para tal finalidade (Metrocream®, metrogel®, rozex® gel e creme, rosagel®, rosiced®, anabact® gel, zyomet®) (DAHL et al., 1998). Apesar de alguns estudos *in vitro* citarem que o fármaco é ineficaz contra o *Demodex folliculorum*, bactéria relacionada ao desenvolvimento da rosácea, Dahl e colaboradores (1998) demonstraram em trabalho randomizado, duplo-cego, que o tratamento contínuo, somente com o gel de metronidazol, manteve à remissão da rosácea de moderada a grave, na maioria dos casos (77%), sendo inicialmente tratado com tetraciclina oral e gel de metronidazol tópico (MC EVOY, 2001).

O metronidazol tópico também é utilizado no tratamento da tricomoníase na forma farmacêutica de gel vaginal a 0,75% e a 1,3%. Seu uso ainda vem sendo investigado quanto ao tratamento de infecções bacterianas e feridas provenientes de queimaduras (DUA et al., 2016). Dentro desse contexto, também é relatado o seu emprego *off-label* através da aplicação de géis, soluções e comprimidos macerados no leito de feridas oncológicas para controle de odor das mesmas (FIRMINO, 2005; LIPSKY, HOEY, 2009; SANTOS, PIMENTA, NOBRE, 2010; WOO, SIBBALD, 2010; CHRISMAN, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A veiculação do MTZ em termogéis também foi investigada para essa finalidade (MELO et al., 2017).

Vale ressaltar que o Rozex® é atualmente a única formulação tópica gelificada a base de metronidazol a 0,75% disponível no mercado brasileiro destinado ao tratamento da rosácea. Assim, em virtude do grande volume de estudos envolvendo diferentes formulações convencionais e não convencionais contendo MTZ empregadas no tratamento de diferentes patologias, torna-se um potencial modelo para a investigação através de métodos alternativos.

3.3.2. *Lapachol*

As 1,4-naftoquinonas representam uma grande classe de compostos e são encontrados em uma ampla gama de famílias de plantas, bem como em fungos e bactérias. Derivados da naftoquinona têm atividades farmacológicas valiosas, atuando como citotóxico, antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiprotozoário, inseticida, antiinflamatório, e agente antipirético (GROLIG; WAGNER, 2005; EYONG et al., 2008).

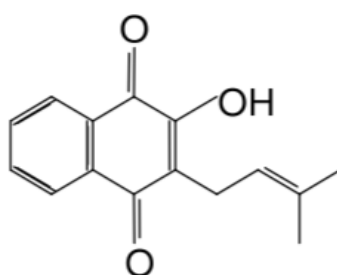
Os mecanismos de ação subjacentes aos efeitos observados dos derivados da naftoquinona são principalmente sua capacidade de interagir com as topoisomerases e gerar radicais semiquinonas e espécies reativas de oxigênio dentro da célula (DA SILVA et al., 2003).

Lapachol [2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenodiona] (Figura 6) é um composto isolado de várias espécies de Bignoniaceae. Entre as muitas naftoquinonas biologicamente ativas, o lapachol é um dos compostos biologicamente ativos mais versáteis e foi encontrado, mais tarde, em várias outras famílias e diferentes espécies (HUSSAIN et al., 2007).

Apresenta-se como pó cristalino amarelo claro a escuro, possui a forma de cristais prismáticos, fracamente ácido, pKa de 6,15, de peso molecular 242,26 e fórmula química

C₁₅H₁₄O₃. Tem um ponto de fusão entre 141–143°C, altamente lipofílico, bastante solúvel em acetona, etanol, metanol, clorofórmio, benzeno e ácido acético; solúvel em éter etílico com solubilidade limitada em água, mas muito solúvel em soluções alcalinas (LUI et al., 1985; ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002; FONSECA, 2001; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; OSSOWSKI et al., 2008; EPIFANO et al., 2013). Sua solubilidade é grandemente afetada pelo pH, variando de 1,5 µg / mL em pH 4,0 a 5 mg / mL em pH 10 (SAWHNEY et al., 1983; FONSECA, 2001).

Figura 6 - Representação da molécula do lapachol, forma estrutural.



Fonte: FONSECA et al., 2003.

O lapachol foi isolado pela primeira vez em 1882 pelo químico italiano Emanuele Paternò da árvore *Tabebuia avellanedae* (PATERNÒ, 1882). Seu nome é derivado do termo "Lapacho", o nome pelo qual esta planta é comumente conhecida no Brasil, onde também é chamado de "pau d'arco" e "taheebo". Extratos da casca interna de *T. avellanedae*, do qual o lapachol foi purificado pela primeira vez, são utilizados por populações locais como agentes analgésicos, anti-inflamatórios, antineoplásico, antimicrobiano e diurético (DE MIRANDA et al., 2001). Além dessas, outras atividades são citadas como: antiedematogênica, antimalárica, antiséptica, antiviral, bactericida, fungicida, pesticida e esquistossomicida (BECKSTROM-STERNBERG; DUKE, 1994).

A atividade antitumoral do lapachol foi descrita no início dos anos 1970 (BLOCK et al., 1974). Maeda e colaboradores (2008) relataram que o lapachol pode atuar como um antagonista da vitamina K com atividade anticancerígena *in vivo*. O Lapachol também demonstrou reduzir o número de tumores causados pela doxorrubicina em *Drosophila melanogaster* heterozigota para o gene supressor de tumor *wts* (COSTA; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2011). O Instituto Nacional do Câncer Norte-americano (NCI) divulgou

que possuía, em estágio de teste clínico, fase-I, pacientes que fizeram uso do Lapachol como tratamento, porém este apresentou expressivos efeitos colaterais e a sua pesquisa como um possível quimioterápico no combate ao câncer foi abandonada (COSTA, 2012; JANUÁRIO; SILVÉRIO-LOPES, 2014).

Além de sua atividade antiproliferativa em células cancerígenas, o lapachol também diminui a invasão de células HeLa e poderia, portanto, representar um interessante esqueleto de partida no processo de gerar novos compostos anti-metastáticos (BALASSIANO et al., 2005). Exibe ainda propriedades anti-angiogênicas, especialmente quando é coordenado com o bismuto (PARRILHA et al., 2012).

Nas décadas de 60 e 70 houve um grande desenvolvimento no estudo das propriedades dos produtos extraídos do Ipê Roxo, principalmente das duas substâncias o Lapachol e a β -Lapachona, que inclusive foram comercializadas para uso em quimioterapia coadjuvante no tratamento de leucemia (HIGA, 2007; JANUÁRIO; SILVÉRIO-LOPES, 2014). Por possuir principalmente o lapachol como componente antitumoral em sua composição, dentre outros compostos, o Ipê Roxo em cápsulas é nacionalmente e internacionalmente comercializado sob a forma de produtos naturais como terapia alternativa ao câncer. Muitas vezes encontrado como cápsulas de pau d'arco, o uso do ipê é também de finalidade antibiótica, estimulador do sistema imunológico, antioxidante, sendo indicadas para casos de bronquite, infecções, dentre outros casos.

O Lapachol na forma de cápsulas de 250 mg, foi fabricado e comercializado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) a partir de 1980, para sua utilização como coadjuvante no tratamento de certos tipos de câncer, sendo que a mesma não está mais disponível no mercado desde 2013 (ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002; COSTA, 2012; JANUÁRIO; SILVÉRIO-LOPES, 2014).

No Brasil, os resultados observados no estudo pioneiro que testou clinicamente a ação antiinflamatória do extrato hidroalcoólico da *Tabebuia avellanedae* em mulheres com cervicite e cervicovaginitis foram satisfatórios, com regressão de estado patológico (WANICK; BANDEIRA; FERNANDES, 1970). Foi comprovada também utilizando pacientes portadores de bursite, otite, tendinite e sinusite (CORREIA; SILVA, 1988a, b, c, d; ARAÚJO et al., 2007; LIRA et al., 2004). Com base em estudos clínicos abordados na literatura, a eficácia tópica anti-inflamatória dessa droga foi comprovada tanto em estudos pré-clínicos quanto clínicos (LUI et al., 1985; WANICK; BANDEIRA; FERNANDES, 1970;

LOPES; SILVA, 1988a, b, c, d; DE ALMEIDA et al., 1990; DUARTE et al., 2000; ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003).

Partindo dessas observações, em alguns estudos preliminares do desenvolvimento galênico, o lapachol foi incorporado em formulações do tipo gel e avaliado por testes de liberação e permeação *in vitro*, demonstrando sua viabilidade em tais formas (SANTOS et al., 1991; LIRA et al., 2004). Sester (1996) constatou que formulações tópicas do lapachol mantém suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, após testes clássicos de indução de edema em ratos. Nesse cenário, Lira e colaboradores (2008) avaliaram a administração tópica de lapachol (15 mg/Kg) em camundongos, incorporado numa forma farmacêutica tipo gel, descrevendo que o mesmo apresentou atividade antiedematogênica significativa. Neste estudo, os autores propõem que a atividade antiedematogênica ocorreu decorrente da ação contra a liberação de histaminas, serotoninas e cininas.

Já em ratos, na dose de 150mg/Kg, por via oral, comparados com a fenilbutazona, foi constatado um efeito inibitório sobre a liberação de histamina das células o que, consequentemente, produz efeitos anti-inflamatórios (ALMEIDA et al., 1988; ALMEIDA et al., 1990).

A importância farmacológica do lapachol é notória, principalmente frente às mais diversas doenças inflamatórias. No que se refere a formulações tópicas, não existe ainda uma formulação comercialmente disponível contendo lapachol, tanto no cenário nacional quanto internacional, principalmente visando sua ação antiinflamatória por essa via. No entanto, em termos de Brasil, o NUDFAC se insere nesse contexto onde diversos estudos avaliaram e demonstram a viabilidade de utilização do lapachol em diferentes tipos de formas farmacêuticas como géis, emulgéis e microemulsões para essa finalidade (LIRA et al., 2004; LIRA et al., 2008; TABOSA et al., 2018).

Desde 2014, o NUDFAC é detentor da patente voltada ao uso de formulação farmacêutica contendo lapachol. Mais recentemente, através da busca de patentes, é possível verificar que esforços estão sendo colocados no desenvolvimento também de composições cosméticas para uso tópico do lapachol na pele e no cabelo, em composições antirrugas e no clareamento da pele.

Todos os achados descritos tornam o lapachol um importante modelo para avaliação de metodologias alternativas visto que apresenta maior perfil transdérmico de permeação cutânea, diferentemente do MTZ que fica mais retido nas camadas superficiais, apresentando

ainda características de solubilidade diferentes dando maior abrangência para uma avaliação mais completa das metodologias alternativas ao uso de animais.

3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE ATRAVÉS DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS

Um dos possíveis efeitos da exposição e contato acidental com novos produtos químicos é irritação dos olhos e da pele. A exposição pode ser incidental, acidental ou intencional, como acontece com cosméticos e certos fármacos. O principal objetivo dos esforços científicos toxicológicos é salvaguardar os seres humanos contra os possíveis efeitos adversos de diversos tipos de produtos químicos, incluindo produtos farmacêuticos, cosméticos, produtos domésticos, produtos químicos industriais e agroquímicos. Em geral, a resposta fisiológica a um estímulo químico é a irritação, que envolve mudanças objetivas (por exemplo, vermelhidão e edema locais) e sensações (por exemplo, prurido e dor). Partindo desse ponto, a avaliação do potencial de irritação dos olhos e da pele é essencial para garantir a segurança de indivíduos que se expõem a uma ampla variedade de substâncias projetadas para uso industrial, farmacêutico ou cosmético (VINARDELL; MITJANS, 2008).

No tocante a classificação de substâncias com referência ao potencial de irritação advinda dos produtos farmacêuticos, e de acordo com o Sistema Harmonizado Globalmente (GHS) das Nações Unidas (UN), no que diz respeito à irritação ocular, existem duas principais categorias. A Categoria 1 compreende as substâncias que causam danos graves e irreversíveis (até 21 dias) como, por exemplo, destruição da córnea. Já as substâncias que causam irritação reversível (até 21 dias), são classificadas na Categoria 2, que apresenta em sua subdivisão 2A os que causam irritação reversível aos olhos dentro de 21 dias e a 2B, que gera irritação leve e reversível em até 7 dias. Os produtos químicos não irritantes são classificados como sem Categoria (UNITED NATIONS, 2009).

Sabe-se também que deve ser levado em consideração a medida do pH das formulações, sendo esta uma informação utilizada como triagem para avaliar a segurança de um produto. Em referência a irritação ocular, por exemplo, a mesma ocorre com o contato de substâncias com pH que variam acentuadamente do pH da secreção lacrimal. Produtos não irritantes aos olhos, geralmente possuem pH que fica entre 4,3 e 8,4, caso esteja fora dessa faixa, não é possível fazer previsão. Por isso, foi proposto um intervalo de conforto de 6,6 a 7,8, porém, mesmo que um produto ou substância apresente pH entre esses valores, não se

pode concluir que o mesmo não seja irritante para os olhos. (CARNEY; FULLARD, 1979; TANG et. al., 1996; WORTH; CRONIN, 2001).

Antes que os seres humanos possam ser expostos a tais substâncias, a tendência de novos produtos químicos para causar a irritação dos olhos e da pele deve ser determinada. Dentro desse cenário, a avaliação do potencial irritante de diversos produtos e substâncias químicas, como agrotóxicos, cosméticos e medicamentos de uso tópico, é realizada, desde a década de 1940, a partir do uso de animais de laboratório. A toxicidade sempre foi analisada utilizando-se modelos animais, considerado o melhor modelo experimental para avaliação dos riscos envolvidos com o uso de produtos e substâncias, seja irritação, alergia ou efeitos sistêmicos. Até hoje, as avaliações de segurança de produtos químicos na etapa final de estudos pré-clínicos são largamente baseadas em experimentos com animais (SANTOS, 2008; VINARDELL; MITJANS, 2008).

Os conhecidos testes de irritação ocular e cutânea em coelhos, usados com o objetivo de determinar o grau de irritabilidade, foram inicialmente descritos por John H. Draize e têm sido usados para tentar prever a irritação ocular e dérmica humana de tais produtos sendo o padrão para avaliações de segurança ocular e dérmica por décadas. No entanto, vários aspectos do teste foram criticados, como a subjetividade do método, a superestimação das respostas humanas e a crueldade do mesmo (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944; DRAIZE, 1959; SANTOS, 2008; VINARDELL; MITJANS, 2008).

A necessidade de usar animais para testar se novos produtos químicos e produtos são ou não irritantes tem sido questionada com crescente frequência e ímpeto nos últimos 20 anos. É certo que as questões são muito complexas e fortes argumentos sociais, políticos, éticos e científicos foram levantados em ambos os lados da questão. As inadequações do teste de Draize, juntamente com a pressão dos grupos de proteção aos animais, atualmente, levaram a esforços de vários laboratórios, empresas e principalmente grupos de pesquisa para desenvolver e adotar ensaios *in vitro* para substituí-los (CURREN; HARBELL, 1998; SANTOS, 2008; VINARDELL; MITJANS, 2008).

Durante este processo, numerosos métodos não animais foram propostos como alternativas confiáveis para os testes tradicionais em animais. No entanto, antes que tais testes entrem em uso comum, eles devem ser cuidadosamente avaliados para determinar se, de fato, esses novos métodos podem substituir ou reduzir totalmente o uso de animais. Tal avaliação envolve investigar os detalhes básicos da irritação ocular e da pele, revisando que tipo de informação é atualmente obtida a partir de testes em animais, entendendo como o

delineamento de sistemas *in vitro* se relaciona com o modelo animal, e somente então determinando que progresso real fosse feito na busca de alternativas para o teste tradicional de irritação ocular. (CURREN; HARBELL, 1998).

Além de questões éticas, a procura por ensaios *in vitro* visa alcançar vantagens como: maior eficácia, menor custo e maior facilidade de difusão e incorporação de tais metodologias por outros laboratórios, sendo, portanto, uma questão de grande relevância para os laboratórios oficiais de controle da qualidade (REINHARDT, 2008; EUN; SUH, 2000).

Métodos alternativos são procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que: não utilizem animais; usem espécies de ordens inferiores; empreguem menor número de animais; utilizem sistemas orgânicos *ex vivos*; ou diminuam ou eliminem o desconforto (BRASIL, 2009).

O desenvolvimento de métodos alternativos para avaliação de produtos tem sido foco de estudos no meio científico, que está se conscientizando sobre a necessidade de utilizar a política dos 3 R's (*replace, reduce, refine*) introduzida por William Russel e Rex Burch (1959). A partir da publicação dos princípios dos 3R's, que inseria o sentido de humanizar a prática da utilização de animais em pesquisa para que fosse tratada sempre considerando as questões éticas e científicas, aumentaram-se os esforços para o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais que pudessem não apenas substituir, mas refinar e/ou reduzir a utilização de animais para fins de pesquisa com a finalidade de minimizar o sofrimento. (RUSSELL; BURCH, 1959; WORTH; BALLS, 2002; ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008).

O que se entende por redução (*reduce*) pode ser alcançado quando obtemos nível equiparável de informação com o uso de um menor número de animais em experimentação. O refinamento (*refine*) dessas metodologias pode ser refletido em condições do estudo que promovam maior alívio, minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal utilizado. Por fim, substituições (*replace*) podem ser realizadas quando as informações são alcançadas sem o uso de animais vertebrados vivos (RUSSELL; BURCH; HUME, 1959).

Em termos de Brasil, a regulamentação específica da pesquisa em animais se deu apenas em 2008, com a aprovação da Lei nº 11.794/08, conhecida como Lei Arouca, que instituiu o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e regulamentou a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica. São

competências desse conselho a monitoração e avaliação da introdução de técnicas alternativas que visem substituir a utilização de animais em ensino e pesquisa, credenciar as instituições que utilizem animais em seus trabalhos, além de conceber as normas brasileiras de criação e utilização de animais de laboratório (BRASIL, 2008).

A Portaria SEPED/MCTIC N° 3586, de 30 de junho de 2017, renovou por mais três anos a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais (RENAMA). Esta iniciativa vem ao encontro do panorama internacional que fomenta e privilegia o princípio dos 3R's sendo composta por duas categorias de laboratórios (Laboratórios Centrais e Laboratórios Associados). A criação da RENAMA permite a existência de uma infraestrutura laboratorial e de recursos humanos especializados capazes de implantar métodos alternativos ao uso de animais e de desenvolver e validar novos métodos no Brasil.

O Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) se faz cada vez mais presente no cenário de promover a implementação, o desenvolvimento, a validação e a adoção de métodos alternativos ao uso de animais nas atividades de ensino e pesquisa no Brasil. Se caracterizando como único laboratório associado localizado no estado de Pernambuco e um dos dois pertencentes a toda região Nordeste, essa contribuição se mostra de grande importância na avaliação da adequabilidade desses métodos tendo em vista que apesar de várias metodologias já serem aprovadas, o Brasil ainda se encontra no processo de validação da sua primeira metodologia alternativa.

Os métodos alternativos já validados são disponibilizados mundialmente pela Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico (OECD). No entanto, a validação de métodos alternativos vem sendo sugerida por diversos órgãos ou instituições como, por exemplo, pelo *European Center for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM; *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* - ICCVAM; *Japanese Society of Alternatives to Animal Experiments* - JSAAE; *Canadian Council on Animal Care* – CCAC; *Korean Center for the Validation of Alternative Methods* – KoCVAM; *International Corporation on Alternative Test Methods* – ICATM (MARTÍNEZ-HIDALGO, 2007). Atualmente faz parte desse grupo de órgãos e instituições, o *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods* – BraCVAM.

Nas últimas décadas, várias metodologias alternativas foram estudadas, porém poucas foram validadas, sendo necessário o aprofundamento de estudos sobre a aplicabilidade de alguns ensaios *in vitro* (MITJANS; INFANTE; VINARDELL, 2008). Entre as limitações descritas na literatura científica com relação à substituição do teste de irritação ocular de

Draize, destaca-se o fato de que as metodologias alternativas, como o modelo HET-CAM, podem tanto subestimar (STEILING et al., 1999; SCHEEL et al., 2011) como superestimar resultados obtidos *in vivo* (NÓBREGA et al., 2012), dependendo de fatores como natureza da substância-teste, seu potencial irritante e a presença de efeitos irreversíveis *in vivo*.

Embora alguns métodos alternativos ao teste de irritação ocular de Draize, como o teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP, bovine corneal opacity and permeability) e o teste do olho enucleado de galinha (ICE, isolated chicken eye), tenham sido formalmente validados (OECD, 2009), estes não se aplicam à avaliação de produtos com baixo potencial irritante, pois possuem boa capacidade de predição apenas para produtos corrosivos ou com potencial irritante severo.

Dentre os métodos formalmente validados por centros internacionais de validação, e para os reconhecidos no Brasil para atividades de pesquisa, foi estabelecido um prazo de até 5 anos para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo de acordo com as resoluções normativas Nº 18/2014 e Nº 31/2016 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), contados a partir da data de publicação no Diário Oficial da União (DOU).

Neste trabalho, serão utilizadas quatro metodologias alternativas, o teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP) e os testes de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) e sua variação que é associado ao corante azul de trypan (CAM- TBS), que se enquadram na categoria de avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular, como também o método OECD TG 428 para avaliação da absorção cutânea *in vitro*. Os ensaios são sugeridos pela ANVISA para fornecer informações a respeito da segurança de produtos principalmente a nível ocular, sendo possível avaliar a opacidade e permeabilidade córnea pelo BCOP, a vascularização pelo HET-CAM e sua variação que agrega valores quantitativos, o CAM-TBS.

3.4.1 Teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP – OECD TG 437)

A medição do potencial de irritação ocular é um passo necessário na avaliação da segurança de produtos industriais e de consumo e, portanto, faz parte dos requisitos do sistema regulatório internacional para o teste de produtos químicos. O principal objetivo do projeto (2015-2016) CON4EI (consortium for *in vitro* eye irritation testing strategy) foi desenvolver estratégias de teste escalonados para avaliação da irritação ocular para os

condutores mais importantes da classificação (ADRIAENS et al., 2014) para finalmente substituir o teste ocular de Draize “in vivo” (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1994).

A exemplo disso, a capacidade de irritação de um conjunto de 80 produtos químicos bem caracterizados foi avaliada utilizando 8 testes de métodos alternativos, além do uso de modelos computacionais. Um dos ensaios *in vitro* selecionados foi o método de teste de Opacidade e Permeabilidade da córnea bovina (BCOP) (GAUTHERON et al., 1992).

É o primeiro método alternativo validado e aceito pelas agências reguladoras dos Estados Unidos que compõem o The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) como um teste para segurança oftálmica e é relatado no guia 437 da organização para a cooperação e desenvolvimento econômico (OECD). Atualmente, é um dos quatro testes aceitos pela OCDE para classificar produtos químicos que induzem danos oculares graves de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado das Nações Unidas de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (SCOTT et al., 2010).

O ensaio BCOP é uma alternativa *in vitro* que é usada rotineiramente em diversos laboratórios de testes industriais e de contrato no contexto da segurança do local de trabalho e aplicações da segurança do produto (VANPARYS et al., 1993). O ensaio pode ser realizado utilizando-se de determinadas circunstâncias e limitações específicas para estabelecer a classificação e rotulagem de produtos químicos relativos aos perigos aos olhos e esse ensaio é descrito na diretriz da OECD TG 437 (OECD, 2013).

As substâncias que tem o poder de danificar o epitélio ocular reduzem a transparência da córnea por coagularem as proteínas no epitélio e/ou interromperem a matriz extracelular do estroma. Em consequência, esse dano causa a ruptura de junções ou a perda de células, aumentando a permeabilidade da córnea à água, íons, outras substâncias químicas e até patógenos (GAUTHERON, 1992).

Diante disso, o BCOP, metodologia baseada no método de Muir (1984), avalia o potencial irritante de um produto a partir da desnaturação proteica, precipitação celular ou inchaço estromal que culminam na opacidade na córnea bovina, assim como avalia a relação que essas alterações provocadas podem ter como influência direta na permeabilidade dessa córnea.

Os dados de opacidade da córnea bovina são obtidos através de leituras de opacidade que são realizadas durante o experimento e de acordo com o protocolo específico usando o opacitômetro OP-KIT, que se trata de um opacitômetro de luz dupla (policromático), capaz de

fornecer resultados pela leitura ponderada da transmissão de luz, medindo as mudanças na tensão quando a transmissão de luz branca altera a medida que passa através da córnea (VERSTRAELEN et al., 2013).

O teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP) recebeu aceitação internacional em 2009 pelo guia 437 da OCDE, que foi revisado e atualizado em 2013. Esse teste é recomendado para identificar produtos e substâncias irritantes graves sem testes adicionais (OCDE, 2013).

Atualmente, o BCOP é um método alternativo reconhecido nacionalmente pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aceito pela ANVISA para avaliação do potencial de irritação ocular.

Em geral, quando usado para classificar a categoria GHS 1 comparando-se ao teste de Draize, o teste tem uma precisão geral de 79% (OECD, 2013). No entanto, fatores como altas taxas de falsos positivos para álcoois, cetonas e substância sólidas podem levar à perda de precisão, já quando essas substâncias não são levadas em consideração, a precisão do BCOP aumenta para 85% (PRINSEN, 2006).

Embora não seja considerado válido como um substituto único para o teste ocular de Draize “in vivo”, o método de teste BCOP é recomendado como uma etapa inicial dentro de uma estratégia de triagem para identificar produtos químicos que causam danos oculares graves até os que não apresentem danos, assim como sugerido por Scott e colaboradores (2010) e pela OCDE (OECD, 2017).

O método de teste BCOP também é recomendado para a identificação de produtos químicos que não exijam classificação para irritação nos olhos ou lesões oculares graves, conforme definido pelo GHS da ONU (No Cat) (UNITED NATIONS, 2009), dentro de uma estratégia de teste do dano menor até os que causam dano maior à córnea (SCOTT et al., 2010). E, portanto juntamente com outros ensaios *in vitro* se torna uma importante ferramenta na avaliação do potencial de irritação ocular de substâncias tóxicas.

3.4.2 Teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET- CAM) e sua variação CAM-TBS

Diversas metodologias alternativas *in vitro* foram e vem sendo propostas ao longo dos anos, utilizando-se de lipossomas (KATO et al., 1988), hemoglobina bovina (HAYASHI et

al., 1995; VINARDELL; GONZALEZ; INFANTE, 1999) e linhagens celulares cultivadas (ITAGAKI et al., 1991). Esses métodos em questão apresentaram uma desvantagem comum no que se diz respeito a não poderem ser utilizados na avaliação de materiais que são insolúveis nos meios utilizados. Dentro desse contexto, o HET-CAM, que usa a membrana corioalantóide (CAM) de ovos fertilizados de galinhas, surge como alternativa no que permite a aplicação dessa metodologia a compostos insolúveis (LUEPKE, 1985; LUEPKE; WALLAT, 1987; VINARDELL; MACIÁN, 1994; VIVES et al., 1997).

A membrana corioalantóide (CAM) é um tecido ricamente vascularizado que é encontrado no interior do ovo fertilizado de galinha. Essa membrana, além de constituir uma membrana respiratória, possui a característica de mimetizar o tecido conjuntival dos olhos de coelho por possuir processo inflamatório semelhante ao mesmo (GILLERON et al., 1996).

O Teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha de Hens (HET-CAM), conhecido também como ensaio vascular da membrana corioalantóide (CAMVA), ou simplesmente CAM, foi proposto pela primeira vez por Luepe e Kemper (LUEPKE, 1985; LUEPKE; KEMPER, 1986).

O HET-CAM é um método validado e utilizado mundialmente e a validação do mesmo está, atualmente, em curso no Brasil e é o primeiro ensaio de validação de um método alternativo em território nacional, e caso tenha êxito, o método alternativo poderá então ser regulamentado, ensinado e empregado rotineiramente, o que permitirá ao país obter experiência no processo de validação e contribuir para a redução dos animais utilizados em experimentação. (TAVASZI; BUDAI, 2007).

O teste em questão tem a capacidade de avaliar e identificar o potencial irritante de uma substância química ou produto quando aplicado sobre a membrana corioalantóide de ovos livre de patógenos específicos (*Specif Pathogen Free* - SPF) fertilizado no décimo dia de incubação. Esse ensaio é fundamentado na avaliação visual, durante 5 minutos, de aparições das alterações vasculares de hiperemia, hemorragia e coagulação na membrana corioalantóide após aplicação do produto em teste. Portanto, se torna capaz de gerar informações qualitativas sobre tais efeitos irritantes que podem ocorrer após a exposição da CAM a uma substância ou produto (GILLERON et al., 1996; TAVASZI; BUDAI, 2007).

Parâmetros associados ao teste podem levar a problemas relacionados com a reprodutibilidade, sendo uma grande preocupação, visto que a avaliação dos efeitos gerados é visual e o teste é de caráter qualitativo. Alguns desses fatores como a seleção (idade/peso),

rotação e tempo de incubação dos ovos, a umidade relativa e a temperatura de incubação, a raça da galinha, o método de abertura da casca do ovo, bem como utilização de controles positivos e negativos podem variar dependendo do protocolo utilizado. O teste apenas é considerado aceitável se os controles negativo e positivo induzem uma resposta que se enquadra na classificação de não irritante e irritante severo, respectivamente. É relatado também que o uso de substâncias teste que possuam cor ou turbidez acentuada ou que aderem à CAM tem sido associado a resultados comprometidos, pois prejudicam a observação dos efeitos irritantes visualizados na membrana. (VINARDELL; MITJANS, 2008)

Estudos realizados por Hagino e colaboradores (1993) examinaram o teste CAM de Luepke (HET-CAM) e foi observada uma boa correlação com teste de irritação ocular *in vivo* relatada por Draize. Esses pesquisadores também abordaram que apesar de ser considerado um teste rápido, barato e eficaz como alternativa ao teste de irritação dos olhos *in vivo*, o sistema de pontuação ainda tem desvantagens em relação ao falta de objetividade e quantitatividade (LUEPKE; WALLAT, 1987; KALWEIT; GERNER; SPIELMANN, 1987; KALWEIT et al., 1990).

Assim sendo, o teste de membrana corioalantóide associado ao corante azul de trypan (CAM-TBS) foi proposto no intuito de desenvolver uma técnica de avaliação objetiva usando a quantidade de azul de trypan adsorvido no local (tratado previamente com o produto em análise) como indicador de lesão ou injúria da CAM. Esta determinação, além da vantagem de oferecer resultado quantitativo, é muito simples e reproduzível (HAGINO et al., 1991).

Os resultados obtidos através de estudo com 12 surfactantes demonstraram uma boa correlação com os dados de irritação ocular *in vivo* em virtude da boa correlação entre a quantidade de corante absorvida pela membrana corioalantóide e a média dos escores máximos (MEM) obtidos *in vivo* no teste de Draize, com coeficiente de correlação de 0,91 segundo os autores que a propuseram (HAGINO et al., 1991; HAGINO et al., 1993).

Tanto o HET-CAM, quanto sua versão modificada, o CAM-TBS (Chorionallantoic membrane – trypan blue staining), que avalia os danos à membrana cório-alantóide pela quantidade do corante azul de Trypan absorvido pela mesma, são métodos válidos e reconhecidos internacionalmente (ICCVAM, 2010; OLIVEIRA et al., 2012; WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015).

Alguns estudos mais recentes demonstraram uma maior sensibilidade e capacidade de predição do ensaio CAM-TBS em relação ao teste do HET-CAM e de ambos em relação aos

testes Fluorescein Leakage Test (FLT), 3T3-Neutral Red Uptake (NRU) cytotoxicity assay, Red Blood Cell (RBC) haemolysis assay. Adicionalmente, a grande especificidade dos testes de CAM, especialmente o HET-CAM, para substâncias ou produtos com baixo ou nenhum potencial irritante também foi relatada (SCHEEL et al., 2011; YANG et al., 2010).

Quando os ensaios *in vivo* não podem ser substituídos por um único método alternativo, como parece ser a situação do teste de irritação ocular de Draize, deve ser levado em consideração o desenvolvimento de uma abordagem cuja análise inclua uma variedade de ensaios, em que os animais sejam usados apenas para comprovar a ausência de irritação, reduzindo, assim, ao máximo o risco de expor animais ao sofrimento em experimentação científica (ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008; COSTA et al., 2011; DONAHUE et al., 2011).

3.4.3 Avaliação da absorção cutânea através de metodologia *in vitro* (OECD TG 428)

A absorção de uma substância pela pele ocorre por difusão passiva através da epiderme ou de forma direta por glândulas sudoríparas e folículos pilosos. Os produtos químicos que penetram na epiderme são eliminados por descamação e, portanto, não atingem a circulação sistêmica. Porém alguns produtos químicos tem capacidade de atingir a derme subjacente à epiderme, e dessa forma entram em contato com a circulação sistêmica. Portanto, a determinação da absorção de uma substância é crucial para avaliar a exposição sistêmica (SELZER et al., 2015).

Geralmente, a absorção cutânea de uma substância teste é obtida experimentalmente através de estudos *in vitro* e/ ou *in vivo* a partir de pele de diferentes espécies, incluindo porcos, macacos e seres humanos (SHEN et al. 2014).

A OECD 428 traz as diretrizes para avaliação da absorção cutânea pelo método “*in vitro*”, que é realizado com pele excisada (humana ou de outros mamíferos) em células de difusão. A célula de difusão mais usada é a célula de Franz, descrita por Thomas J. Franz em 1975 (FRANZ, 1975).

Essa célula é constituída por duas câmaras: uma doadora e outra receptora, as quais são separadas por uma membrana posicionada, seja sintética ou natural (pele excisada). As membranas sintéticas são normalmente utilizadas para os estudos de liberação de fármaco e as biomembranas (humana ou animal) para estudos de absorção cutânea, devido às diferentes propriedades de difusão oferecidas pelos modelos de membranas. Na câmara receptora,

localizada abaixo da pele excisada, há um fluido receptor que representa o fluxo sanguíneo periférico, que é amostrado em intervalos específicos ao longo do experimento e analisado para a substância em teste (OECD, 2004; SIMON et al., 2016).

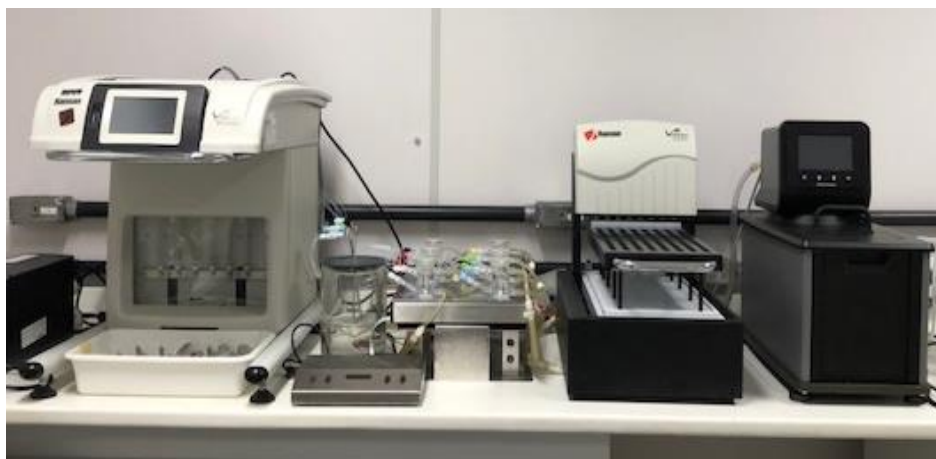
O método *in vivo* para avaliar a absorção cutânea apresenta algumas vantagens sobre o método *in vitro*, como a possibilidade de geração e extração de dados de cinética sistêmica e informações metabólicas. As principais desvantagens são o uso de animais vivos e as diferenças na permeabilidade da pele de animais e humanos. Por exemplo, a pele proveniente de ratos, animal mais utilizado para esse tipo de avaliação, é geralmente, mais permeável, logo pode superestimar absorção cutânea humana (EPA, 1992).

3.4.3.1 Estudos de liberação *in vitro* de formulações tópicas

No que diz respeito às abordagens *in vitro*, as células de difusão tipo Franz (Figura 7) são comumente empregadas para a avaliação da liberação do fármaco do veículo, estimando a quantidade do mesmo que é absorvida pela pele. Esses dispositivos são constituídos por dois compartimentos, um doador e outro receptor, separados por uma membrana sintética ou natural. O compartimento receptor deve ser preenchido com uma solução que favorece as condições sink, isto é, uma condição de não saturação do sistema dinâmico, possibilitando um fluxo contínuo do fármaco (SILVA et al., 2010).

Nos estudos *in vitro*, a velocidade de liberação do fármaco da forma farmacêutica é avaliada utilizando membranas sintéticas. Essas membranas possuem estruturas simples e são isentas de interferentes presentes na pele humana. Assim, a liberação do fármaco irá depender principalmente da atividade termodinâmica e da sua solubilidade no veículo, dentre outros fatores. Além disso, essas membranas são facilmente adquiridas, menos onerosas e podem ser utilizadas nos estudos de delineamento de formulações dermatológicas, prevendo o comportamento do fármaco nas membranas biológicas. As membranas mais utilizadas são as de acetato de celulose, nitrato de celulose, nylon e polidimetilsiloxane (CARVALHO, 2007; SANTIS, 2008).

Figura 7 - Células de difusão de Franz automatizadas.



Fonte: Acervo pessoal.

Durante o desenvolvimento farmacotécnico de formas farmacêuticas, o uso de técnicas *in vitro* de liberação desempenha um papel essencial no estudo e seleção de formulações contendo fármacos para uso tópico e tem sido de grande importância, pois possibilita não só a escolha entre diferentes formulações, bem como, sua otimização (PRAÇA, 2010). A inabilidade deste teste *in vitro* em se correlacionar com os resultados *in vivo* é devida a impossibilidade da obtenção de dados a cerca da interação entre a formulação (incluindo os excipientes) e a pele, em particular, com o estrato córneo (FDA, 1998).

3.4.3.2 Estudos de permeação e uso de pele animal

Estudos de permeação *in vitro* ou "*ex vivo*" em pele animal realizados com células de difusão, desempenham um papel essencial na seleção de formulações contendo fármacos para uso tópico. Portanto, a escolha de modelos *in vitro* preditivos de permeação é altamente importante. O ideal seria o uso de pele humana para avaliar as propriedades de permeação de um fármaco. No entanto, as amostras de pele humana de tamanho e qualidade adequada para experimentos não são suficientes, e geralmente são de difícil acesso, por questões éticas, para a maioria dos pesquisadores e em alguns casos, estão disponíveis apenas em limitados montantes. Assim, em virtude da maior disponibilidade, recomenda-se a utilização de membranas animais na etapa inicial dos estudos (SCHMOOK; MEINGASSNER; BILLICH, 2001; HENNING; SCHAEFER; NEUMANN, 2009).

Uma ampla variedade de modelos animais é sugerida como substitutos adequados à pele humana e estes têm sido utilizados para avaliar a permeação cutânea de moléculas. Em

caso de substituição da pele humana, é sugerida uma escala de modelo animal, que pode ser aplicada para avaliar a permeação cutânea de fármacos, que inclui: macaco rhesus, rato, porco, porco da índia e cobra (GODIN; TOUITOU, 2007).

O principal problema com o uso de pele de roedores como um modelo para a pele humana é a quantidade de animais utilizados e o sofrimento causado aos mesmos nos experimentos, indo de encontro ao princípio éticos fundamentados pela política dos 3R's, além da possibilidade de subestimar a permeação, devido à composição lipídica e a organização do estrato córneo, que são as principais diferenças entre a pele humana e a pele de roedores (GODIN; TOUITOU, 2007; FRIEND, 1992).

Assim, uma vez que a utilização da pele de primatas na investigação é muito restrita, o modelo animal mais relevante tem sido o porco. A pele suína é a mais recomendada devido a sua similaridade com a pele humana e facilidade de obtenção. Esse tipo de pele tem principal valor, pois respeita o princípio dos 3R's visto que é considerado um subsídio da indústria alimentícia, sendo obtida de matadouros e não especificamente para fins de pesquisa, tendo seu uso respaldado pela resolução normativa Nº 30 de 2 de fevereiro de 2016 do CONCEA não havendo necessidade de aprovação do comitê de ética e utilização animal (CEUA). A pele suína ainda possui espessura, composição lipídica, permeabilidade a diversos compostos, bem como propriedades bioquímicas e histológicas repetidamente demonstradas com similaridades significantes que se aproximam à pele humana (GODIN; TOUITOU, 2007; SARTORELLI et al., 2000; SEKKAT; KALIA; GUY, 2002). Alguns estudos têm relatado que a espessura do estrato córneo, e os parâmetros biofísicos tais como a difusividade e o coeficiente de permeabilidade da água através da pele suína *in vitro* e da pele humana *in vivo* são correlacionáveis (Tabela 1) (SEKKAT; KALIA; GUY, 2002).

Tabela 1 - Comparação dos parâmetros biofísicos das peles suína *in vitro* e humana *in vivo*.

Pele	H1 (μm)	D2 ($\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$)	Kp3 ($\text{cm} \times \text{h}^{-1}$)
Orelha de Porco (<i>in vitro</i>)	11,8 $\pm$ 4,0	3,2 $\pm$ 1,5	5,8 $\pm$ 1,1
Humana (<i>in vivo</i>)	10,9 $\pm$ 3,5	3,0 $\pm$ 1,5	6,1 $\pm$ 1,4

H1 (Espessura do estrato córneo), D2 (difusividade da água através da pele), Kp3 (coeficiente de permeabilidade da água através da pele).

Fonte: SEKKAT; KALIA; GUY, 2002, apud TABOSA, 2014.

Outros estudos realizados por esse mesmo grupo de autores examinaram a espessura das camadas da pele suína e demonstraram que a espessura do estrato córneo (EC) está entre

21-26 μm . A epiderme viável suína apresenta espessura na faixa de 66-72 μm o que é muito semelhante a da epiderme humana que mede cerca de 70 μm . A estrutura folicular da pele de porco, também se assemelha a dos seres humanos, com pelos e infundíbulo estendendo-se profundamente na derme. Uma média de 20 pelos estão presentes por 1 cm^2 de pele de porco e na pele humana uma faixa de 14-32 pelos (exceto na região da testa).

Além disso, as alterações anatômicas vasculares e os arranjos das fibras de colágeno na derme, bem como o conteúdo de glicosfingolipídios e ceramidas no EC são semelhantes na pele humana e na suína. A pele de porco apresenta ainda o estrato córneo mais semelhante ao estrato córneo humano, em termos de composição lipídica (CILURZO; MINGHETTI; SINICO, 2007; GODIN; TOUITOU, 2007).

De acordo com Schmook e colaboradores (2001), em estudo de comparação entre a pele humana e animal (porco e rato), testando quatro diferentes fármacos com polaridades distintas, foi concluído que a diferença na penetração entre a pele de porco e a humana, depende do composto, do fluxo e de sua concentração na pele. Este estudo indicou ainda a pele suína como apropriada para estudos de penetração *in vitro* em substituição a pele humana assim como estudo realizado através de uma revisão quantitativa de comparação entre a permeabilidade da pele humana e suína, para diferentes fármacos (BARBERO; FRASCH, 2009).

Vale ressaltar que mesmo sendo a pele animal um bom substituto para a pele humana em estudos de permeação, é necessário levar em consideração que a pele animal é mais permeável que a pele humana, de forma que os resultados devem ser avaliados criteriosamente para que não haja uma superestimação na absorção percutânea dos compostos na pele humana (HENNING; SCHAEFER; NEUMANN, 2009).

Desta forma, embora a pele animal e a pele humana não tenham as propriedades de permeabilidade idênticas, existem semelhanças significativas em relação à espessura da epiderme, à composição lipídica, as características morfológicas e fisiológicas e entre a permeabilidade aos diferentes compostos (SONGKRO et al., 2003). Essas características podem viabilizar a substituição à pele humana em determinados estudos *in vitro* e a utilização de técnicas que permitam a avaliação de produtos tópicos como, por exemplo, estudos de dermatofarmacocinética, através da técnica de tape-stripping. Devido ao que foi discutido em relação as questões éticas e às vantagens acima mencionadas, os experimentos *in vitro* utilizando pele de porco foram empregados nesse estudo.

3.5 AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO CUTÂNEA ATRAVÉS DE ESTUDOS DE DERMATOFARMACOCINÉTICA E CORRELAÇÃO *IN VITRO/IN VIVO*

O termo correlação é frequentemente empregado dentro das ciências farmacêuticas e afins para descrever a relação que existe entre variáveis. Matematicamente, o termo correlação significa interdependência entre dados quantitativos ou qualitativos ou relação entre variáveis mensuráveis (BOLTON; BON, 2009).

A correlação *in vitro / in vivo* (IVIVC) é um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre uma propriedade de uma forma de dosagem *in vitro* e uma resposta *in vivo* relevante. Geralmente, a propriedade *in vitro* é a taxa ou extensão da dissolução ou liberação do fármaco enquanto a resposta *in vivo* é a concentração plasmática do fármaco ou a quantidade de fármaco absorvida (FDA, 1997).

De acordo com a USP, é definida ainda como o estabelecimento de uma relação racional entre uma propriedade biológica ou um parâmetro derivado de uma propriedade biológica produzida por uma forma de dosagem, e uma propriedade físico-química ou característica da mesma forma de dosagem (USP, 2004).

A partir do ponto de vista biofarmacêutico, a correlação pode ser referida como a relação entre características apropriadas de liberação *in vitro* e parâmetros de biodisponibilidade *in vivo* (EMAMI et al., 2006; MOHAMMED et al., 2014).

Franz e colaboradores relataram a correlação de estudos *in vitro* com a absorção *in vivo* para um grande número de moléculas no contexto da avaliação da bioequivalência de produtos tópicos. Dados de permeação cutânea *in vitro* para sete medicamentos genéricos de uso tópico aprovados foram comparados com os produtos de referência. Dados clínicos para os mesmos produtos foram obtidos após a aprovação regulamentar e, para seis dos sete produtos, a relação entre o teste *in vitro* com os de referência foi próxima da unidade, indicando que os produtos eram equivalentes e que estavam de acordo com os dados clínicos (FRANZ; LEHMAN; RANEY, 2009).

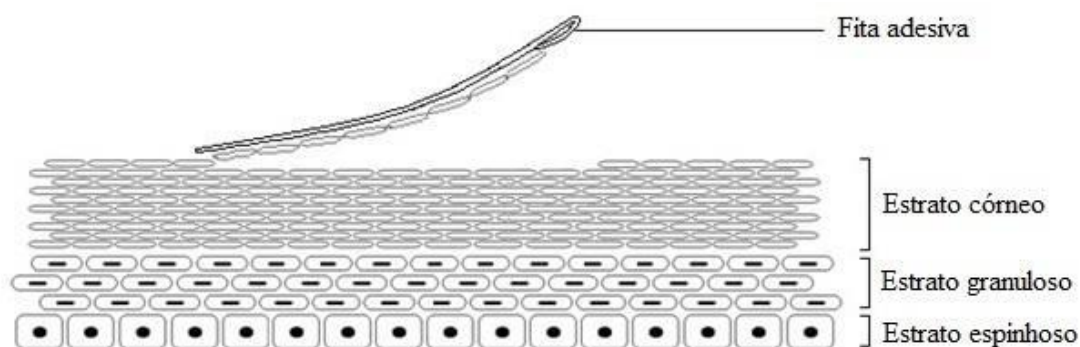
Mais tarde, o mesmo grupo revisou 92 conjuntos de dados de absorção cutânea em 30 estudos publicados e calculou uma correlação *in vitro - in vivo* utilizando a porcentagem de dose aplicada permeada como parâmetro para comparação. Quando os dados foram normalizados, a relação da correlação *in vitro - in vivo* média foi de 0,96, onde a diferença

entre os resultados *in vitro* e *in vivo* para qualquer composto foi menor que o dobro. (LEHMAN; RANEY; FRANZ, 2011).

Alternativamente, ainda em virtude das grandes dificuldades e desafios de realização de estudos *in vivo* para formulações tópicas, os estudos dermatofarmacocinéticos *in vitro/in vivo* surgem como importante ferramenta na avaliação dessas formulações. (GODIN; TOUITOU, 2007; NARKAR, 2010). Alguns estudos são reportados na literatura utilizando a dermatofarmacocinética como técnica de avaliação da bioequivalência tópica de produtos contendo metronidazol após dose única e dose múltipla através de estudos *in vitro* em pele suína e estudos *in vivo* em voluntários saudáveis (ARAÚJO et al., 2018; DUARTE, 2017).

A dermatofarmacocinética (DPK) é uma metodologia onde a quantidade de fármaco presente no estrato córneo é quantificada em função da pós-aplicação e pós-remoção do produto testado, utilizando a metodologia de tape-stripping como mostrado na figura 8 (N'DRI-STEMPFER et al., 2008). Esta técnica consiste na determinação da concentração do fármaco no estrato córneo em função do tempo, avaliada pela remoção sequencial de camadas do estrato córneo com o uso de fitas adesivas (NARKAR, 2010).

Figura 8 - Remoção de uma camada de estrato córneo com uma fita adesiva.



Fonte: KANFER, 2010.

Basicamente, o *tape-stripping* como método de avaliação da penetração cutânea pode ser realizado de duas formas, *in vivo* ou *in vitro*. O método *in vitro* apresenta uma série de vantagens sobre o *in vivo*, pois podem ser utilizadas tanto pele humana quanto pele de outras espécies. Diversas replicatas podem ser avaliadas, diversas formas farmacêuticas podem ser estudadas e o impacto dos danos na pele pode ser ponderado evitando dificuldades de ordem ética. Uma das únicas limitações associadas à abordagem *in vitro* é que as condições *sink* ocasionadas pelo fluxo sanguíneo periférico na derme podem não ser totalmente reproduzidas.

Entretanto, considerando que a permeação de substâncias através da pele é primariamente um processo passivo e que diversos estudos utilizando essa abordagem *in vitro* foram realizados, acredita-se que esse método seja bastante útil e difundido para o estudo de produtos de aplicação tópica (DIEMBECK et al., 1999; OECD, 2004).

Na avaliação de produtos tópicos, esta metodologia pode vir a ser utilizada na substituição dos testes clínicos em estudos de bioequivalência para produtos tópicos. A dermatofarmacocinética é uma metodologia mais barata, mais rápida, necessita de um menor número de voluntários e, na teoria, pode ser aplicada a todos os fármacos de uso tópico. O principal pressuposto é que a quantidade de fármaco recuperado do estrato córneo, principal barreira da absorção percutânea, está diretamente relacionada à quantidade de ativo que alcança as células-alvo uma vez que se tratam de produtos cuja ação é local (BRADDY et al., 2015).

Estudos que utilizam a técnica de *tape-stripping* para avaliação da penetração cutânea de fármacos *in vitro*, utilizando pele humana e pele de porco, bem como a comparação da penetração entre modelos *in vivo* e *in vitro*, têm sido relatados (BETTONI, 2009; LEAL et al., 2017). Dentro desse cenário, Leal e colaboradores (2017) obtiveram resultados semelhantes de correlação *in vitro/in vivo* utilizando formulações tópicas contendo econazol e a valerato de betametasona (LEAL et al., 2017).

Uma vasta quantidade de trabalhos utilizando esta técnica *in vivo*, em humanos, também são reportados na literatura (KIM; ANDERSEN; NYLANDER-FRENCH, 2006; MATEUS et al., 2013; BENFELDT et al., 2007; HERKENNE, 2007; NICOLI, 2009; N'DRISTEMPFER et al., 2009; MOHAMMED et al., 2013; PERSHING et al., 2002; WIEDERSBERG et al., 2009; ORTIZ et al., 2008; PERSHING et al., 2003; RUSSELL; WIEDERSBERG; DELGADO-CHARRO, 2008; AU; SKINNER; KANFER, 2010; WIEDERSBERG; LEOPOLD; GUY, 2009). O local normalmente utilizado para realização do *tape-stripping* em humanos é a região ventral do antebraço por ser mais facilmente manipulada, mais cômoda para o voluntário, bem como devido ao menor número de pelos.

As avaliações de estudos de bioequivalência de produtos tópicos utilizando este procedimento têm demonstrado que 14 voluntários são suficientes para gerar dados com segurança e confiabilidade. Visando extrapolar estes dados e obter uma correlação *in vitro / in vitro*, estudos de dermatofarmacocinética utilizando a pele animal também têm sido reportados na literatura (HERKENNE, 2006a, SHAH, 2005). Para tanto, um modelo comumente utilizado é o *tape-stripping* utilizando orelhas de porco excisadas, por serem

estabelecidos como um modelo confiável para experimentos envolvendo esta técnica. (KLANG et al., 2012).

Estudo realizado por Leal e colaboradores (2017) mostra os perfis de concentração do valerato de betametasona (BMV) no estrato córneo (EC) versus a profundidade relativa, em estudo *in vivo* em humanos e *in vitro* utilizando-se de pele dorsal suína, aplicando a dermatofarmacocinética (DPK) como método na avaliação de formulações geleificadas e microemulsionadas, subsequente a aplicação dessas formas farmacêuticas com duração total de 6 h de estudo. A variabilidade dos dados obtidos *in vitro* foi pequena e uma boa consistência entre os perfis *in vivo* e *in vitro* foram encontradas, indicando que a pele de porco da região dorsal pode de fato ser um modelo útil e proveitoso para o uso dessa técnica na avaliação de diferentes tipos de formulações dermatológicas (LEAL et al., 2017).

O estudo de permeação *in vitro* no estrato córneo e DPK, mostrou que não existiram diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p < 0,05$) entre o valor deduzido dos parâmetros de particionamento (K) e de difusividade para as formulações em gel e microemulsão (ME). Entretanto, a ME claramente e significativamente (two-tailed t-test, $P < 0,05$) aumentou a extensão de fármaco acumulado no estrato córneo, em relação ao que foi conseguido a partir da formulação geleificada, como refletido nos valores de área sobre a curva observados, $3,52 \pm 0,60$ e $0,41 \pm 0,09$ mg/cm² para a ME e gel, respectivamente, correspondendo a um fator de efetividade (EF) de $8,9 \pm 3,0$ (LEAL et al., 2017).

Herkenne e colaboradores (2006b) investigaram a possibilidade de substituir a pele humana na avaliação da BD de produtos tópicos em estudos de bioequivalência por pele de orelha de porco, de modo que experimentos *in vitro* utilizando a pele de porco foram comparados com estudos *in vivo* em voluntários humanos. No estudo foi possível concluir que a pele de porco utilizada *in vitro* é uma ferramenta promissora para avaliação e otimização de formulações de uso tópico.

Ainda dentro desse contexto, após a avaliação de 4 formulações tópicas contendo Ibuprofeno através de estudos de DPK *in vitro*, concluiu-se que os resultados sugerem que este procedimento é promissor como ferramenta na avaliação e otimização de formulações. Ao mesmo tempo, citou diversos benefícios na utilização desta técnica, entre elas a não necessidade de aprovação pelo comitê de ética, o uso de múltiplas replicatas facilmente, além da possibilidade de avaliação de compostos tóxicos como, por exemplo, os pesticidas (HERKENNE, 2006a).

Devido a grande aplicabilidade da dermatofarmacocinética na avaliação da absorção cutânea de fármacos administrados através da via tópica, essa técnica foi empregada nesse estudo como forma de proporcionar mais informações acerca da permeação cutânea dos fármacos usados como modelo. Assim, a DPK surge como ferramenta auxiliar na análise da absorção cutânea *in vitro* que é um dos estudos realizados através dos métodos alternativos ao uso de animais demonstrados nesse projeto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSUMOS

O insumo farmacêutico ativo (IFA) metronidazol (MTZ) foi cedido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) com número de lote: 16754. O IFA lapachol (LAP) foi cedido pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os solventes e reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico e as vidrarias previamente calibradas.

4.2 FORMULAÇÕES UTILIZADAS

As formulações tópicas avaliadas nesse estudo foram preparadas e caracterizadas baseadas em trabalhos anteriores realizados no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco. As formulações consistiram em um gel, um termogel e uma microemulsão, todos contendo Metronidazol a 0,75%, como também um gel e uma microemulsão ambos contendo lapachol a 0,5%. Foram preparados conforme a composição descrita nas tabelas 2 e 3, e posteriormente foram realizadas as aferições de pH para cada formulação, seja na sua forma placebo ou contendo o fármaco, com auxílio do potenciômetro (Hanna[®] pH21).

Tabela 2 - Composição das formulações tópicas contendo Metronidazol a 0,75%.

Composição (%)	Microemulsão	Gel	Termogel
Tween 20®	53,5	-	-
Carbopol®	-	1	-
Span 80®	10,7	-	-
Polaxamer 407	-	-	15
Propilenoglicol	-	5	-
Metilparabeno	-	0,18	0,1
Propilparabeno	-	0,02	0,1
EDTA	-	0,05	0,05
Óleo de catolé	7,3	-	-
NaOH 20%	-	q.s.p pH 5,0	-
Metronidazol	0,75	0,75	0,75
Água	27,85	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL

Tabela 3 - Composição das formulações tópicas contendo Lapachol a 0,5%.

Composição (%)	Microemulsão	Gel
Tween 20®	8,4	-
Carbopol®	-	0,5
Cremophor®	41,6	-
Tween 80®	-	0,025
Glicerina	-	12
Etanol	-	28
Ácido Oléico	24,5	-
NaOH 20%	-	q.s.p pH 8,0
Lapachol	0,5	0,5
Água	25,0	q.s.p. 100mL

4.2.1 Preparação dos géis

A preparação do gel de metronidazol foi realizada segundo Araújo (2016), tendo como insumo ativo o metronidazol 0.75%, EDTA como agente complexante, propilenoglicol como co-solvente, carbopol 940 como agentes de viscosidade e promotores da estabilidade, metilparabeno e propilparabeno como conservantes microbiológicos. O gel foi obtido através da reação de neutralização, após dispersão do polímero carbopol em água purificada com o auxílio de um agitador mecânico (Fisaton® - modelo 752A), seguido da incorporação do ativo previamente solubilizado em propilenoglicol com os demais componentes da formulação. Já o gel contendo lapachol foi preparado conforme descrito por Lira e colaboradores (2008), também obtido através de reação de neutralização após dispersão prévia do polímero em água, seguido da incorporação do ativo lapachol 0,5% previamente solubilizado em uma solução etanol:glicerina (28:12 v/v) e seus demais componentes.

4.2.2 Preparação das microemulsões

A microemulsão contendo o Metronidazol 0.75% foi a única formulação desenvolvida pelo estudo através em diagrama ternário de fases previamente desenvolvido no NUDFAC constituído de tween 20, span 80, óleo de catolé e água por Sousa (2017). As microemulsões tiveram como base, então, a microemulsão ME04 segundo trabalho de Sousa (2017), onde foi testada a incorporação do metronidazol. Foram preparadas por simples solubilização mediante agitação magnética, seguindo a sequência de mistura tensoativo, co-tensoativo, por

consequente adição da fase oleosa seguida da incorporação da fase aquosa contendo o fármaco. Seguindo o mesmo preceito, a escolha da microemulsão contendo lapachol (ME 2), foi realizada com base diagrama ternário de fases desenvolvido por Tabosa (2014). As mesmas foram obtidas mediante simples agitação magnética do lapachol com o ácido oléico por um período de 24h, seguidos da adição do tensoativo e co-tensoativo e posterior agitação, e por fim adiciona-se a fase aquosa, seguido por agitação por mais 24h.

4.2.3 Preparação do termogel

O termogel composto por metronidazol 0.75% como insumo ativo foi preparado conforme tabela 2, Melo (2017) baseado na formulação F12 de seus trabalho. O termogel foi preparado através da dispersão do polaxamer, com ajuste de temperatura do método (SCHMOLKA, 1972). Primeiramente, o metronidazol, metilparabeno, propilparabeno, EDTA foram dissolvidos em água a 75 °C sob agitação magnética. Posteriormente, a agitação foi cessada e o polaxamer foi adicionado à temperatura de 25 °C. A formulação foi armazenada a 4 °C até ficar límpida.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

4.3.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado através de pHmetro modelo PH 21 (Hanna[®]), previamente calibrado com as soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0.

4.3.2 Potencial zeta e tamanho de partícula

Para a microemulsão desenvolvida contendo metronidazol e seu respectivo placebo, as determinações de potencial zeta e tamanho de gotículas da formulação foram realizadas com auxílio do ZetaSizer[®] Nano-ZS90 (Malvern[®]Instruments, UK). As formulações foram diluídas em 1:20 com água destilada.

4.3.3 Centrifugação

As formulações foram centrifugadas, durante 20 min a 1500 g e após a centrifugação observou-se a ocorrência ou não de separação de fases.

4.3.4 Microscopia de luz polarizada

Cada formulação do tipo microemulsão foi avaliada através da Microscopia de Luz Polarizada (DM 750P – Leica®) para avaliar a isotropia ou anisotropia dos sistemas.

4.3.5 Teste de solubilidade em corante

Um corante solúvel em água (FD&C Red 40) foi adicionado às microemulsões e a fase do sistema foi avaliada visualmente (BUTANI; YEWALE; MISRA, 2014).

4.3.6 Temperatura de transição sol-gel

A temperatura de transição para os termogéis foram medidas por um reômetro rotacional de cilindros concêntricos (Anton Paar MCR 500, Graz, Áustria), usando software Rheoplus® (v. 3.40, Anton Paar, Graz, Áustria) para analisar os dados. A temperatura dos termogéis foram aumentadas de 20°C a 45°C a uma velocidade de aquecimento de 1°C/min para obtenção dos dados do módulo de armazenamento (G') e o módulo de perda (G''). Um gráfico de G' e G'' em função da temperatura foi representada graficamente e a temperatura de transição foi definida onde os pontos de G' e G'' se sobrepõem na curva (JIANG et al., 2016).

4.4 AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES

4.4.1 Obtenção e dermatomização da pele de porco

A pele de porco foi obtida a partir de animais recentemente sacrificados no matadouro local em Paulista, Pernambuco/Brasil com subsequente limpeza em água corrente antes da dermatomização. Com o auxílio de bisturis e tesouras, o excesso do tecido adiposo da pele foi removido assim como o excesso de pelos na superfície dérmica (Figura 9), desta forma, obtendo um nivelamento da pele e facilitando o processo de dermatomização. Durante o processo, as áreas onde foram observadas lesões, manchas ou arranhões foram descartadas. Por fim, as peles do dorso e ventre foram dermatomizadas a uma espessura de

aproximadamente 0,7 mm com o auxílio do dermatômetro e armazenadas a -70°C até a sua utilização.

Figura 9 - Pele de orelha de porco dissecada.



Fonte: Acervo pessoal

4.4.2 Avaliação da absorção cutânea (OECD TG 428)

4.4.2.1 Estudo de liberação *in vitro* das formulações

Foram realizados experimentos de liberação *in vitro* apenas para as formulações contendo MTZ a fim de avaliar a microemulsão desenvolvida frente as formulações de perfil já conhecido na literatura contendo esse fármaco. Foi utilizada a membrana sintética de ésteres (acetato) de celulose (Millipore®; lote 02690), com porosidade de 0,45µm, após prévia hidratação em tampão fosfato pH 7,4 por um período de 12 horas e os estudos de permeação foram realizados com pele de porco.

O equipamento utilizado foi o Vision® (Microette), na qual consiste em um sistema automatizado de células de Franz. O compartimento receptor ou câmara dérmica foi preenchido com tampão fosfato (PBS) de pH 7,4 (previamente selecionado mediante a realização de estudos de solubilidade com o metronidazol), e agitado magneticamente a 600 rpm. Todas as células foram montadas nesse aparato de difusão no qual a temperatura foi mantida a $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, 100 mg de cada formulação teste foram aplicados sobre a membrana de acetato. Para análise do conteúdo do compartimento receptor, coletas foram realizadas nos tempos de 15min, 30min, 45min, 1h, 2h, 3h, 4h e 6h para análise sendo armazenado a -20°C.

As amostras foram quantificadas através de cromatografia líquida de alta eficiência CLAE (método que será descrito no item 4.4.5) e utilizadas nos cálculos da quantidade real liberada (Equação 1):

$$Q_{\text{real}} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad \text{Equação (1)}$$

Na qual:

$Q_{\text{real}, t}$ = 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

As análises foram realizadas em sextuplicatas para cada formulação e os resultados foram plotados para a definição do modelo de cinética adequado para cada formulação. Os resultados foram compilados em gráficos de dispersão xy, característicos de três modelos de cinética: Ordem zero, onde são plotados a quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h); Já o modelo de primeira ordem analisa o $\log$ da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h) ou Higuchi na qual a quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) é analisada *versus* raiz quadrada do tempo (h).

Determinando-se os coeficientes de regressão linear (r) obtidos a partir da análise de regressão linear para cada modelo de cinética, o modelo que apresentou valor de r mais próximo a 1 foi selecionado. A taxa de liberação corresponde à inclinação (a) da porção linear do modelo de cinética selecionado (COSTA; LOBO, 2001).

4.4.2.2 Experimentos de permeação cutânea *in vitro/ex vivo*

Antes do experimento, a pele de porco proveniente do dorso, previamente dermatomizada, foi devidamente descongelada à temperatura ambiente e, em seguida, cortada em tamanho suficiente para adequar-se a área do compartimento doador das células de difusão de Franz automatizadas (VISION® MICROETTE™). Diferentemente dos estudos de liberação *in vitro*, foram realizados experimentos de permeação cutânea para as formulações contendo metronidazol a 0,75% e lapachol a 0,5%, desta vez utilizando a pele de porco proveniente do dorso como biomembrana, até obtenção de um número de amostragem de 14 para cada parte formulação analisada.

Para as formulações contendo metronidazol, o compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato pH 7,4, e agitado magneticamente a 600 rpm. Em seguida, a pele foi colocada entre os compartimentos doador e receptor, 100 mg de cada formulação (gel, termogel ou microemulsão) contendo Metronidazol foi depositada sobre a pele suína na área delimitada, com posterior fechamento das células de forma hermética. Já para as formulações contendo lapachol, o compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato pH 7,4 com Brij 98® a 4%, 100 mg de cada formulação (gel e microemulsão) foram aplicadas sob a pele suína provenientes do dorso no compartimento doador. 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 coleta do conteúdo da câmara receptora foi realizada e essas amostras foram, então, armazenadas a -20°C para análise subsequente.

As quantidades dos fármacos, em ambos os estudos (metronidazol e lapachol), retidas nas diferentes camadas da pele do porco ao final do experimento de difusão. Foram examinadas as concentrações retidas no estrato córneo (EC) após limpeza cuidadosa da formulação residual na superfície da pele através da técnica de tape-stripping e após esse procedimento, na epiderme/derme.

4.4.3 Estudo de dermatofarmacocinética (dpk) – tape-stripping in vitro e retenção cutânea

As concentrações dos fármacos retidos na epiderme (estrato córneo e epiderme viável) ao final do experimento de difusão também foram examinadas. Após uma limpeza cuidadosa da formulação residual na superfície da pele com o auxílio de swab embebido com álcool isopropílico (Biosoma®), o estrato córneo (EC) foi removido por meio da técnica de *tape-stripping*.

A metodologia empregada nesse estudo é preconizada pelo *Food and Drug Administration* (FDA – USA), publicada no “*Guidance for Industry: Non-sterile Semisolid Dosage Forms. Scale-Up and Post-approval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In vitro release testing and in vivo Bioequivalence Documentation*”, segundo procedimento modificado realizado por N'Dri-Stempfer et al. (2008) (FDA, 1998). Cada local de aplicação foi tratado com 30 fitas adesivas (Scotch Tape Livro, 3M, St. Paul, MN) para o metronidazol e 20 fitas adesivas para avaliação das formulações contendo lapachol. Em seguida, para obtenção dos dados de retenção cutânea na epiderme/derme para ambos os fármacos, as secções pele foram lavadas com água ultra-pura após o *tape-stripping*, secas com

papel absorvente e a área da pele tratada foi excisada a partir do centro da amostra de pele e reduzidas a tamanhos menores para posterior extração e obtenção da retenção cutânea para os fármacos em questão.

4.4.4 Processo de extração

Ao final da técnica de *tape-stripping*, foram obtidas 30 (metronidazol) e 20 (lapachol) fitas utilizadas na remoção do estrato córneo de cada pele em cada célula de difusão. As fitas, então, foram separadas em tubos do tipo eppendorf da seguinte maneira: Na avaliação do metronidazol, as primeiras 14 fitas foram colocadas individualmente em cada tubo, em seguida, a partir da décima quinta fita até a vigésima sexta, foram colocadas três a três em cada eppendorf, e, portanto as últimas 4 fitas restantes foram postas em um único tubo, com um total final de 19 tubos para cada célula de difusão (ARAÚJO et al., 2018). Já no que se diz respeito ao fármaco lapachol, as duas primeiras fitas foram colocadas em um único tubo do tipo eppendorf e as 18 fitas restantes foram postas em um único tubo Falcon® para posterior extração.

Tanto os tubos contendo as fitas, quanto os tubos provenientes do estudo de retenção cutânea epiderme/derme contendo as peles excisadas foram conduzidas à extração para posterior análise. Para dar-se início ao processo de extração relacionado ao fármaco metronidazol, 1 mL de acetonitrila foi adicionado em cada tubo e posteriormente, os mesmos foram levados ao banho-maria na temperatura de $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sob agitação por um período de 6 horas como descrito por Araujo e colaboradores (2018). Ao final do período de extração, todas as amostras foram imediatamente filtradas e submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Quanto à extração das fitas contendo o fármaco lapachol, à cada tubo, contendo as duas primeiras fitas como também as contendo as peles excisadas, foram adicionados 1 mL de metanol e aos tubos contendo as 18 fitas restantes, foram adicionados 5 mL do mesmo solvente. Em sequência ao processo de extração, cada tubo foi levado a agitação em vortex por 5 minutos e posteriormente ao banho ultrassom por mais 30 minutos, e ao final desse período todas as amostras foram filtradas e submetidas a análise por CLAE de forma imediata baseado no protocolo seguido por Tabosa (2014) modificado de Lira (2007). Um método de extração foi ainda avaliado quanto à recuperação *in vivo* no estrato córneo para o fármaco em questão baseado no protocolo seguido por Tabosa (2014).

4.4.5 Doseamento das amostras por CLAE

As amostras do fármaco metronidazol foram doseadas por um método desenvolvido e validado, de acordo com as normas estabelecidas pelas RE 899 e RDC 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no núcleo de desenvolvimento farmacêutico e cosmético (NUDFAC). A quantificação foi realizada utilizando-se dos seguintes parâmetros cromatográficos: fase móvel de proporção 88: 12 v/v de tampão fosfato 20 mM pH 3,0/acetonitrila, coluna cromatográfica Shim-Pack CLC-ODS (M) do tipo C-18 de fase reversa (150x4.6mm) como fase estacionária, o volume de injeção foi de 20 µL, temperatura do forno de 35°C e a detecção do fármaco foi realizada no comprimento de onda de 320 nm. As concentrações utilizadas na curva de calibração foram de 0,1, 0,5, 1,0, 5, 10, 15 e 20 µg / mL e o tempo de retenção do metronidazol foi observado em 4,5 minutos para um tempo total de corrida de 5,5 minutos (MELO et al., 2016).

A quantificação das amostras contendo o fármaco lapachol foi realizada segundo Fonseca (2004) através de método validado por Tabosa (2018) utilizando-se dos seguintes parâmetros cromatográficos: fase móvel composta por 80% de metanol e 20% de uma solução aquosa de ácido acético glacial a 5%, eluição do tipo isocrática sob um fluxo de 1 mL/min, utilizando-se de uma coluna cromatográfica (Phenomenex Gemini® Nx, 250mm× 4.6mm, 5 µm) do tipo do tipo C-18 de fase reversa como fase estacionária. O volume injetado foi de 20 µL, com avaliação do fármaco no comprimento de onda de 278 nm e utilização de uma curva de calibração com concentrações de 0,1, 0,5, 1, 5 10, 15 e 20 µg / mL com tempo total de corrida cromatográfica de 6 min e tempo de retenção do fármaco observado em 3,7 min.

4.4.6 Estudo de dermatofarmacocinética in vivo

4.4.6.1 Recuperação do lapachol no estrato córneo humano e estabilidade das amostras

Primeiramente, a fim de se estabelecer o método de extração mais adequado e que foi utilizado na quantificação das amostras de lapachol e consequentemente avaliar a recuperação do lapachol nas amostras de fita contendo estrato córneo humano, o estrato córneo (EC) foi retirado de uma área difusional de 1,15 cm² (por meio de um molde) da pele de dois voluntários sadios utilizando-se de 15 fitas adesivas (por voluntário) através da técnica de *tape stripping*.

Tabela 4 - Quantidades de solução padrão de lapachol em metanol adicionadas nas fitas adesivas contendo o EC para estudo de recuperação do fármaco *in vivo* em humanos.

Fármaco	Solução padrão (µg/mL)	Volume adicionado (µL)	Quantidade teórica adicionada (µg)
Lapachol 5 µg/mL	100	50	5
Lapachol 10 µg/mL	100	100	10

As fitas contendo o EC foram contaminadas com volumes conhecidos de solução metanólica padrão de lapachol (100 µg/mL), para obtenção de concentrações diferentes (5 e 10 µg/mL) (Tabela 4). Após tempo necessário para completa evaporação do metanol, as fitas foram colocadas individualmente em tubos do tipo eppendorf onde foram adicionados 1 mL de metanol para se proceder a extração que foi investigada em triplicata para amostras branco (EC sem contaminação), e cada concentração analisada em mesa agitadora e banho sonicator com 30 minutos e 60 minutos de tempos de extração. Em seguida as amostras foram filtradas em membrana (0,45 µm) e quantificadas por CLAE-UV e por fim, os valores de recuperação por método de extração testado foram então determinados pela equação 2:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração real}} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Uma vez estabelecido o método de extração e visto que é reportado e foi posteriormente confirmado na literatura que a beta lapachona é instável sob irradiação de luz (GLEN et al., 1997; CUNHA – FILHO et al., 2011), um breve estudo de estabilidade do lapachol nas fitas contendo EC e no líq extrator após o procedimento de extração também foi realizado. Essa investigação seguiu os mesmo parâmetros de contaminação e doseamento de fitas do estudo de recuperação acima e a estabilidade foi verificada em triplicata para a concentração de 5 µg/mL após 7 e 15 dias nas fitas armazenadas (realizando a extração no dia da análise), como da mesma maneira para as amostras já no líquido extrator (fitas extraídas no mesmo dia, retiradas e acondicionadas em geladeira ao abrigo da luz) até dia da análise nos períodos determinados acima.

4.4.6.2 Protocolo do estudo dermatofarmacocinético do lapachol em humanos

Tendo como objetivo investigar o comportamento dermatofarmacocinético das formulações contendo lapachol na pele humana em função do tempo de contato das mesmas e avaliar uma possível correlação *in vitro/in vivo*, foi realizado um estudo dermatofarmacocinético utilizando-se os antebraços de 14 voluntários sadios a fim de, possivelmente, se explorar esses aspectos característicos de cada tipo de formulação. O estudo *in vivo* não foi feito para o metronidazol já em virtude da presença de estudos de natureza semelhante na literatura.

Os critérios de inclusão dos participantes foram: idade de 18-72 anos; homem ou mulher de qualquer etnia; não fumante; que pudesse fornecer informações de idade, altura, peso, sexo e etnia; possuir antebraços com tamanho suficiente para acomodação das formulações teste e consequente realização do estudo, fornecer o consentimento informado por escrito antes do início de qualquer procedimento do estudo; concordar em não participar de outros ensaios clínicos durante o período de estudo; boa comunicação com o investigador; adesão às orientações do estudo e respeito ao cronograma.

Os critérios de exclusão foram: histórico ou evidências 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 outras condições inflamatórias da pele de acordo com relato do participante da pesquisa ou evidente para o investigador; excesso de pigmentação e pelos, queimaduras solares, manchas ou tatuagens, que possam interferir com a avaliação do fármaco; grávidas ou lactantes; obesos com índice de massa corpórea igual ou superior a 30 kg/m²; fumante e ter ingerido bebidas contendo álcool nas 24 horas anteriores ao estudo baseado em informações cedidas pelos participantes; participação em qualquer outro ensaio clínico de estudo ou cosmético; utilização simultânea de quaisquer medicamentos de uso tópico na área local do ensaio, ter realizado exercício extenuante durante o período do estudo: aeróbica, natação, ciclismo, etc; planejamento em expor os antebraços à luz solar / UV na semana seguinte da participação; incapacidade de atender ao ponto de tempo de coleta de dados; por último, os voluntários foram instruídos a abster-se de utilizar qualquer medicamento uma semana antes e durante o período do estudo.

A fim de se examinar a tolerabilidade dos voluntários frente a investigação analisada nessa pesquisa, foram avaliados os principais eventos relatados pelos voluntários ou observados pelo pesquisador em registros obtidos no decorrer do estudo realizado.

Todo o estudo executado *in vivo* foi conduzido de acordo com as Diretrizes para Boas Práticas Clínicas, em conformidade com a declaração dos princípios de Helsinque e aprovado para o fármaco lapachol pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 36315514.2.0000.5208). Todos os participantes receberam uma descrição detalhada do protocolo do estudo e através de um termo de consentimento livre e esclarecido foi obtida a concessão prévia por escrito dos mesmos.

Figura 10 - Imagem dos braços de um voluntário do estudo, contendo gel de lapachol em um dos antebraços (seta preta) e microemulsão com lapachol no outro (seta vermelha), onde podem ser observados os quatro locais de tratamento em cada antebraço sendo destinadas duas áreas para cada tempo de contato analisado (2 e 6 h).



Fonte: Acervo pessoal.

Com relação ao procedimento de dermatofarmacocinética propriamente dito, no dia do estudo, o antebraço dos voluntários foi higienizado com o auxílio de swab embebido com álcool isopropílico (Biosoma®). Após 1 hora, 100 mg, de cada tipo de formulação contendo lapachol 0,5% foram aplicados em 4 locais de tratamento em cada antebraço (duas áreas para cada tempo de contato da formulação afim de se extrair dados em duplicata), e em seguida deixadas em contato por um tempo de 2h para metade dos locais investigados e a outra metade das áreas deixadas em contato por um tempo total de 6 hrs (Figura 10). Um local não tratado foi utilizado como controle negativo (sem fármaco).

Cada local de aplicação ($1,77 \text{ cm}^2$) foi demarcado com uma moldura em forma circular de adesivo (Book Scotch Tape, 3M, St. Paul, MN, EUA). Uma dose de 100 mg do gel de lapachol foi aplicada em cada local e o sistema foi ocluído. Após as primeiras 2h e

posteriormente 6 horas de contato com a pele do participante, a formulação residual foi removida dos locais de aplicação com o auxílio de swabs contendo álcool isopropílico (Biosoma®).

Posteriormente, os locais de aplicação foram delimitados por um molde de 1,77 cm² e foi realizado o procedimento de *tape-stripping*. O EC dos participantes foi obtido pela remoção sequencial de 30 fitas adesivas (Book Scotch Tape, 3M, St. Paul, MN, EUA).

A função de barreira da pele dos participantes do estudo também foi verificada mediante aferições da perda de água transepidérmica (TEWL) como o auxílio do Tewameter (Courage + Khazaka eletrônico GmbH -CK eletrônico). Tal qual procedimento de *tape stripping - in vitro*, o lapachol presente em cada fita posteriormente foi extraído de acordo com o método descrito no item 4.4.5 e analisado por metodologia CLAE-UV de acordo com Fonseca e colaboradores (2004).

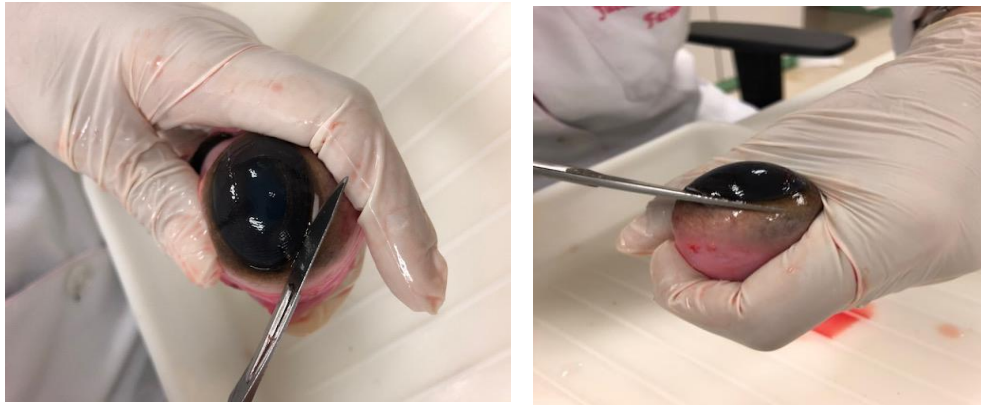
4.5 MÉTODOS ALTERNATIVOS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE

4.5.1 Teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP – OECD TG 437)

A metodologia empregada neste estudo foi realizada segundo o protocolo nº 437 da OECD. Para a realização do BCOP, os olhos de boi foram adquiridos no matadouro do município de Paulista, em seguida, colocados imediatamente em meio de cultura EMEM a fim de manter a viabilidade do estudo por preservar as características das córneas. Como primeira etapa, essas córneas são avaliadas quanto a sua integridade e quanto a presença de quaisquer tipos de alteração nas mesmas, com objetivo de descartar as possíveis córneas que apresentem alguns tipos de imperfeições como cortes, arranhões e áreas opacas.

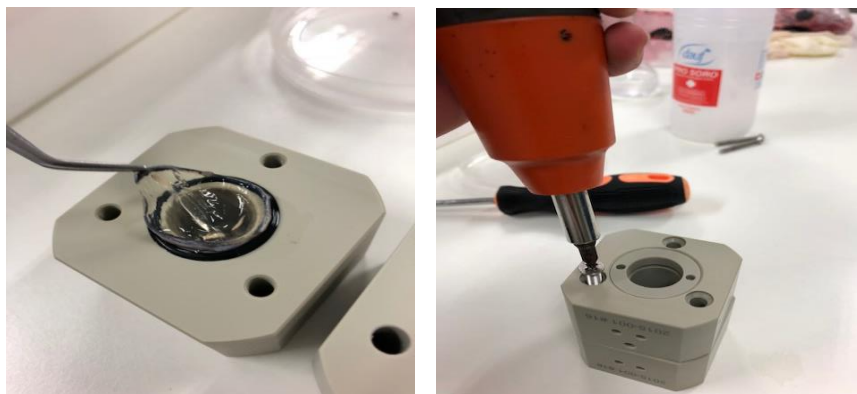
Com o auxílio de bisturi, tesouras e pinças, as córneas foram excisadas a partir dos olhos (Figura 11), imersas em solução salina fisiológica e montadas nos suportes do opacitômetro como mostrado na figura 12. As córneas bovinas foram divididas em dois grupos: grupo teste (contendo quatro córneas para cada formulação) e grupo controle nas quais são utilizadas de solução salina (NaCl 0,9% p/v) e uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N como controles negativo e positivo, respectivamente.

Figura 11 - Excisão da córnea bovina.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 12 - Montagem da córnea bovina no suporte do opacitômetro.



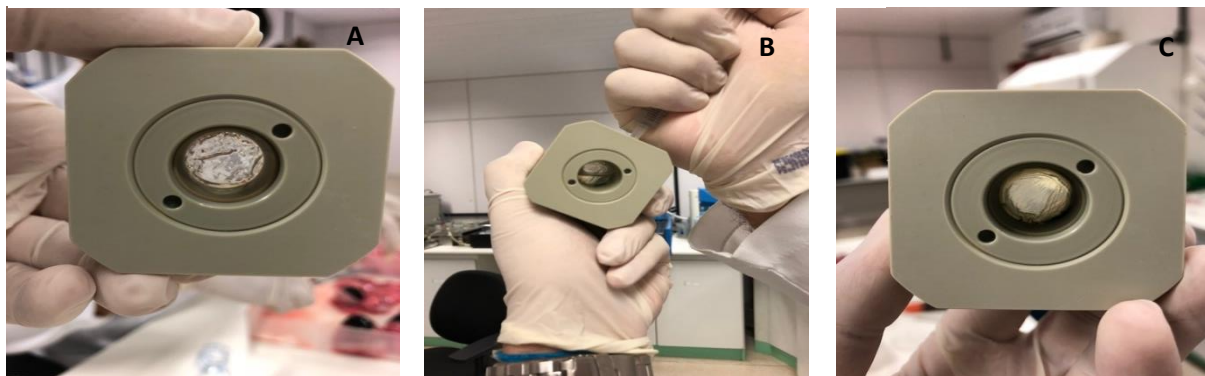
Fonte: Acervo Pessoal.

Em preparação para a primeira incubação no opacitômetro, os suportes contendo as córneas, já fechados, foram então preenchidos com EMEM permitindo que as córneas mantenham ao máximo as suas características originais durante o estudo (Figura 13). Em seguida, os suportes contendo as córneas, devidamente preenchidos com o meio de cultura e livre de bolhas, foram incubados em estufa digital por um período de uma hora na temperatura de 32 °C (Figura 14).

Após esse período determinado, os compartimentos, anterior e posterior, foram esvaziados com o auxílio de uma bomba à vácuo e em seguida foi feita a reposição do meio EMEM em ambos compartimentos para realização da primeira leitura da opacidade no opacitômetro modelo OP-KIT 3.0 (Figura 14), obtendo-se então o valor inicial da opacidade

(pré-teste).

Figura 13 - Posicionamento da córnea bovina no suporte do opacitômetro.

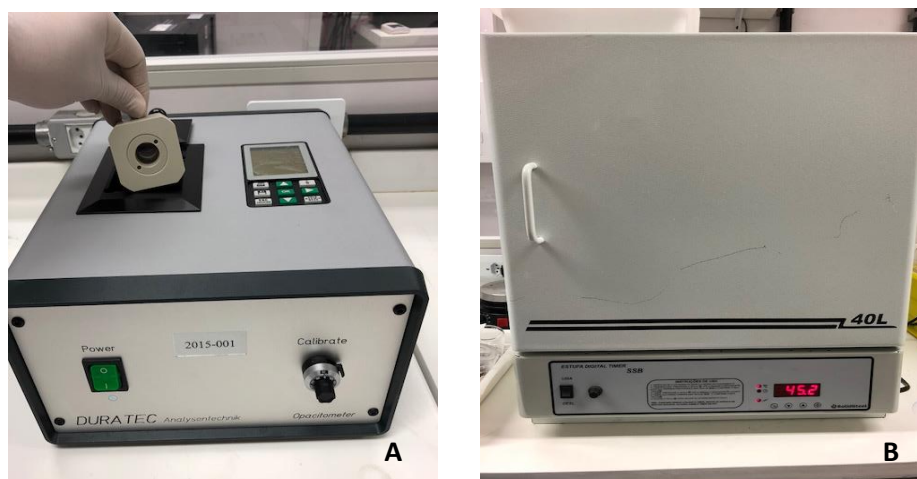


A - Suporte do opacitômetro fechado e contendo a córnea bovina; B – Enchimento do suporte com o meio de cultura EMEM; C – Suporte completamente preenchido e fechado.

Fonte: Acervo Pessoal.

Após a leitura de opacidade, o EMEM foi removido apenas da câmara anterior dos suportes, com subsequente aplicação de 750 μ L de cada formulação, os suportes são então emborcados de modo a garantir o contato com a superfície epitelial das córneas com a formulação teste aplicada e deixada em contato durante dez minutos em incubação a 32°C.

Figura 14 - Leitura de opacidade e incubação em estufa.



A – Opacitômetro; B – Estufa digital.

Fonte: Acervo Pessoal.

Em seguida, utilizando-se de EMEM adicionado de fenol, foi realizada a etapa de lavagem das córneas para remoção das formulações aplicadas no compartimento anterior e

quando finalizado o processo, é realizado o preenchimento com EMEM sem fenol do compartimento anterior e os suportes são novamente incubados por uma duração de duas horas a 32°C. Ao final do período de incubação, é realizada a segunda leitura de opacidade no opacitômetro, sendo esse valor obtido correspondente à opacidade pós-teste, após contato com formulações.

Por fim, para verificar a determinação da permeabilidade das córneas pós-contato, o compartimento anterior é novamente esvaziado e a ele é adicionado 1 mL de solução de fluoresceína sódica a 0,4% para tratamento das córneas para avaliação dos danos provocados às mesmas. Após um período de 90 minutos sobre incubação nas mesmas condições citadas anteriormente, todo o meio contido na câmara posterior dos suportes foi removido e o mesmo foi analisado quanto à densidade óptica através dos valores de absorbância obtidos em 490nm (OD490). Para classificação final das formulações, o cálculo do índice de irritação *in vitro* (IVIS) foi obtido através da seguinte equação:

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

Os valores obtidos foram avaliados em função dos limites estabelecidos no que se diz respeito à classificação dos produtos quanto ao seu potencial irritante (Tabela 5).

Tabela 5 - Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio BCOP.

Índice de irritação <i>in vitro</i> (IVIS)	Classificação	Descrição
≤ 3	Sem categoria	Não irritante
$>3 \leq 55$	Não determinado	Pouco irritante
> 55	Categoria 1	Irritante

Fonte: Modificado de OECD (2013).

4.5.2 Teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM)

O método descrito no The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) referenciado no guia nº 07-4517 foi seguido e utilizado como base para avaliação do potencial irritante das formulações frente à membrana corioalantóide.

Como passo inicial, foram adquiridos ovos de galinha fertilizados *in vitro* do tipo

Specif Pathogen Free (SPF), da raça White Leghorn. Os ovos foram visualmente inspecionados quanto à presença de rachaduras e em seguida incubados, por um período de 10 dias, contados a partir do dia da postura, em chocadeira com rotação automática sob temperatura controlada de $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 70% (Figura 15).

Figura 15 - Incubação dos ovos em chocadeira com rotação automática.

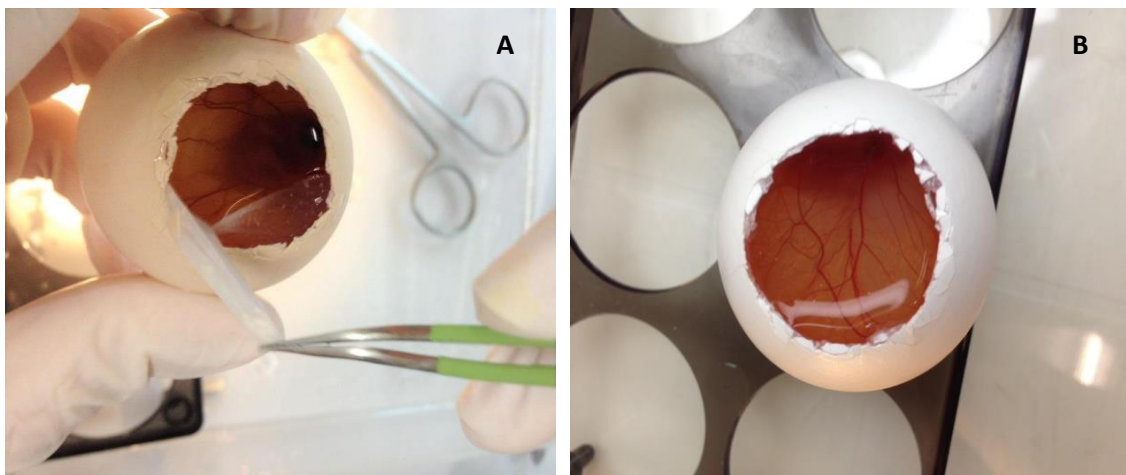


Fonte: Acervo pessoal.

No décimo dia de incubação, para dar início ao experimento, a casca do ovo foi removida com cautela na área delimitada ao redor da câmara de ar a fim de se evidenciar a membrana da casca. Como passo seguinte se dá a hidratação dessa membrana utilizando-se de uma solução salina que é deixada por um período de hidratação de 1 minuto com objetivo de viabilizar e facilitar a remoção cuidadosa da mesma (Figura 16), para expor o local alvo do teste, a membrana corioalantóide (CAM) evitando-se quaisquer tipos de injúrias a ela. O teste foi conduzido em sextuplicata para cada amostra testada, inclusive para os controles positivo e negativo.

Após observação prévia das características inerentes a CAM, foram aplicados 300 μL de cada formulação teste sobre a superfície da membrana corioalantóide e após vinte segundos em contato, o produto foi removido a partir da lavagem com 5 mL de solução salina isotônica a $37,0^{\circ}\text{C}$ (Figura 17). O mesmo procedimento ocorreu para as amostras do grupo controle que teve como controle negativo uma solução salina (NaCl 0,9% p/v) e como controle positivo, solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N.

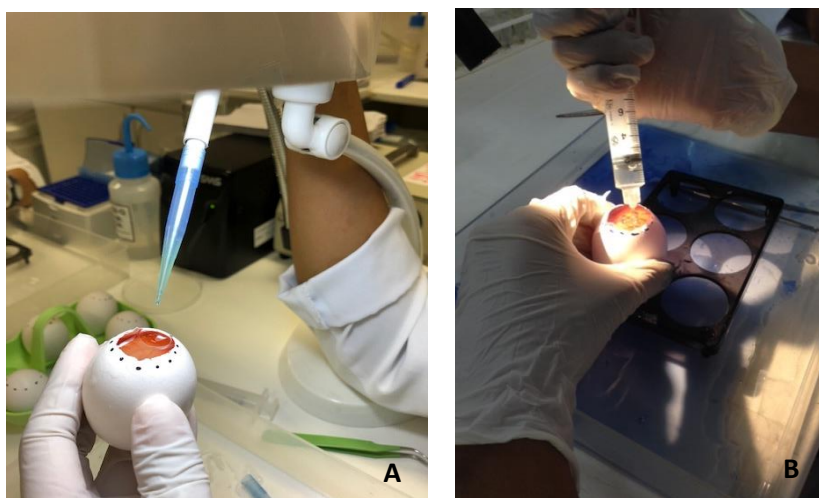
Figura 16 - Remoção da membrana da casca.



A – Remoção da membrana da casca; B – Membrana corioalantóide (CAM).

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 17 - Aplicação da formulação teste sobre a CAM (A) e lavagem da formulação com solução fisiológica a 37 °C (B).

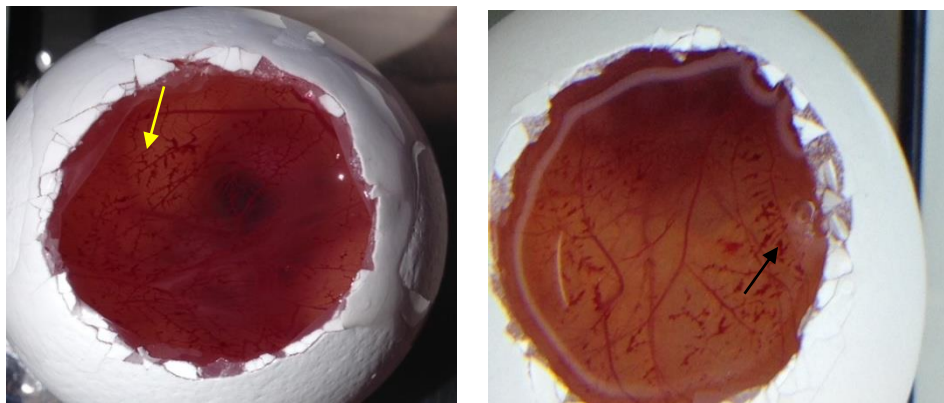


Fonte: Acervo Pessoal.

Uma vez feito a remoção da formulação, a membrana corioalantóide foi então examinada visualmente, por um tempo de 5 minutos, a partir do momento da aplicação do produto, a fim de se avaliar o aparecimento de fenômenos característicos das reações irritativas como, hemorragia, coagulação e congestão (Figura 18). Por fim, de acordo com o tempo em que os fenômenos citados foram observados e com os tipos de fenômenos, uma pontuação foi atribuída com base nesses eventos para cada formulação conforme mostrado na

tabela 6.

Figura 18 - Reações irritativas ocorridas após aplicação do controle positivo.



Seta amarela – observação de congestão (hiperemia); Seta preta – presença de pontos hemorrágicos.

Fonte: Acervo Pessoal.

Tabela 6 - Graduação das alterações observadas na membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha.

TABELA DE GRADUAÇÃO			
EVENTO	MINUTOS		
	0 a 0,5	0,5 a 2	2 a 5
HIPEREMIA	5	3	1
HEMORRAGIA	7	5	3
COAGULAÇÃO	9	7	5

Fonte: JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE (1996).

Tabela 7 – Classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM.

CLASSIFICAÇÃO DO PRODUTO FINAL NO HET-CAM	
FAIXA (GRADUAÇÃO DAS LESÕES)	CLASSIFICAÇÃO
0,0 a 0,9	Não Irritante
1,0 a 4,9	Irritante Leve
5,0 a 8,9	Irritante Moderado
9,0 a 21	Irritante Severo

Fonte: JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE (1996).

A classificação final do potencial irritante de cada produto pelo ensaio de HET-CAM está descrita na tabela 7.

4.5.3 Teste de membrana corioalantóide associado ao azul de trypan (CAM-TBS)

As etapas iniciais deste teste são similares ao teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM), tendo como diferencial a associação do HET-CAM com o emprego do corante azul de trypan como indicador de injúria da membrana corioalantóide. Nesse teste, os ovos utilizados, também do seu décimo dia de incubação, tiveram a membrana cório-alantóide exposta após hidratação e remoção da membrana da casca e delimitada com um anel de silicone (Figura 19).

Após essa etapa, são aplicados 200 μ L da formulação testada e, em seguida, a formulação é deixada em contato por um tempo de 20 segundos. É realizada então a remoção da formulação através de lavagem com água destilada em temperatura ambiente e logo após a lavagem da CAM, 0,5 mL de uma solução salina de tampão fosfato com 0,1% de azul de Trypan foram aplicados sobre a membrana corioalantóide na área delimitada anteriormente por um anel de silicone (Figura 20).

Figura 19 - Membrana corioalantóide delimitada por um anel de silicone.



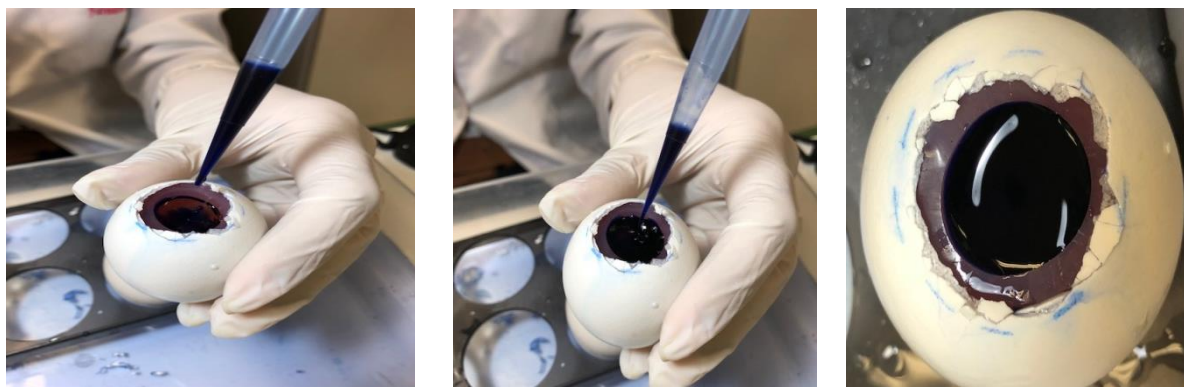
Fonte: Acervo pessoal.

Em seguida, o excesso de azul de Trypan foi removido da membrana com água purificada e a área delimitada pelo anel de silicone agora tratada, é excisada com o auxílio de tesouras e colocada em tubo contendo 5 mL de formamida seguida das etapas de agitação e posterior centrifugação por 10 min para extração do corante. A absorbância do sobrenadante é então mensurada por espectrofotometria no comprimento de onda de 595 nm e a quantidade

de azul de Trypan absorvida pela membrana corioalantóide foi calculada através da equação 4 a seguir:

$$\text{Corante absorvido} = \text{absorbância} \times 5 \text{ nmol}/1.000 \times 10^9 \quad \text{Equação (4)}$$

Figura 20 - Aplicação da solução de corante azul de Trypan 0,1% sobre a membrana corioalantóide delimitada com anel de silicone.



Fonte: Acervo pessoal

Tabela 8 - Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio CAM-TBS.

CLASSIFICAÇÃO FINAL DOS PRODUTOS NO CAM-TBS	
FAIXA (Quantificação do corante)	CLASSIFICAÇÃO
< 7,0	Não Irritante/ Irritante Leve (NI)
7,0 a 14,5	Irritante Moderado (IM)
> 14,5	Irritante Severo (IS)

Fonte: LAGARTO et al., 2006.

A curva de calibração do corante foi feita em soluções de azul de trypan em formamida nas concentrações 10^{-6} , 10^{-5} e 5×10^{-5} mol/L, lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Por fim, após os cálculos com a equação 4, as formulações foram classificadas de acordo a proposta de Lagarto (2006), que apresenta as pontuações 0 a 6,99 correspondendo a formulações não irritantes ou levemente irritantes (NI/LI); 7,00 a 14,5 correspondendo a formulações moderadamente irritantes (MI); e maior que 14,50 correspondendo a formulações severamente irritantes (SI) (Tabela 8).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES

5.1.1 pH

O pH da superfície cutânea é visto como um importante indicador funcional da pele, pois a produção de ácido láctico confere a pele o que se convencionou chamar por “manto ácido cutâneo”. Devido principalmente a esse fator, o pH cutâneo é, em condições normais, levemente ácido, oscilando, em valores de pH entre 4,6 - 5,8. Um fator importante para a manutenção dessa faixa de pH são as secreções cutâneas que apresentam apreciável capacidade tamponante que, juntamente ao sistema tampão de ácido láctico/lactato, ácidos dicarboxílicos do suor, ácidos graxos das glândulas sebáceas e os elementos ácidos da queratina formam o sistema tampão na superfície cutânea (ZLOTOGORSKI, 1987; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; ALI; YOSIPOVITCH, 2013).

Uma vez que o pH da pele é frequentemente alterado em consequência da forte exposição a agentes externos, essas características se mostram bastante importantes no que se diz respeito à manutenção das funções da pele no que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

O pH ideal de uma formulação é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância da pele sendo aceitáveis valores geralmente entre 5,5 e 8,0 (SILVA et al., 2009). No caso das formulações avaliadas no estudo e a microemulsão contendo metronidazol 0,75% desenvolvida nesse projeto, tanto as formulações contendo metronidazol (Tabela 9) quanto as contendo lapachol (Tabela 10) apresentam valores de pH em torno da faixa de compatibilidade da pele e estabilidade das formulações.

Os dados de pH obtidos para as formulações gel e termogel contendo metronidazol e microemulsão placebo corroboraram com os valores encontrados por Araujo (2016), Melo (2017) e Sousa (2017), respectivamente. Do mesmo modo, as formulações contendo lapachol corroboraram com os valores de pH encontrados nos estudos de Lira (2008) para o gel e Tabosa (2018) para a microemulsão. Outra observação que foi evidenciada é que este parâmetro não foi afetado significativamente com a incorporação dos fármacos (metronidazol e/ou do lapachol) nas formulações.

Tabela 9 - pH das formulações contendo metronidazol avaliadas pelo estudo.

FORMULAÇÃO	pH
Gel Placebo	5,14±0,13
Gel MTZ 0,75%	5,19±0,02
Termogel Placebo	6,22±0,02
Termogel MTZ 0,75%	6,18±0,15
Microemulsão Placebo	6,92±0,05
Microemulsão MTZ 0,75%	7,12±0,02

Tabela 10 - pH das formulações contendo lapachol avaliadas pelo estudo.

FORMULAÇÃO	pH
Gel Placebo	8,06±0,4
Gel LAP 0,5%	8,11±0,02
Microemulsão Placebo	4,53±0,19
Microemulsão LAP 0,5%	4,58±0,06

Como já foi dito, o lapachol é um ácido fraco que é muito solúvel em soluções alcalinas. Estudos realizados por Lira (2004) revelaram que as preparações de gel pH 8,0 (forma ionizada) apresentou maior liberação e taxas de permeação que as preparações de gel com pH 7,0 e 5,0. Devido a isso, a preparação do tipo gel utilizada neste estudo tinha pH 8,0, a fim de evitar a interferência deste parâmetro na permeação de fármacos.

5.1.2 Determinação do tamanho de gotícula e potencial zeta

A determinação do tamanho das gotículas e de sua distribuição corresponde a um dos parâmetros mais importantes para se avaliar a estabilidade dos sistemas microemulsionados bem como a avaliação da influência da incorporação de fármacos pouco solúveis que poderiam causar uma instabilidade sobre o sistema (DAMASCENO et al., 2012).

O fenômeno de dispersão da luz pelas microemulsões é avaliado de maneira eficiente através da técnica de “Light Scattering”, pois a mesma fornece informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas da ME e permite o cálculo do tamanho da gotícula através de relações empíricas adequadas (ABOOFAZELI; BARLOW; LAWRENCE, 2000; ROSSETI, 2006).

O estudo das propriedades reológicas e da viscosidade podem fornecer informações sobre a microestrutura das microemulsões. As MEs usualmente comportam-se como fluidos Newtonianos, onde não há nenhuma mudança na tensão de cisalhamento com a variação da taxa de cisalhamento. Como as microemulsões analisadas por esse estudo seguem o modelo newtoniano como relatado por Tabosa (2018) e Sousa (2017), a microemulsão desenvolvida deve seguir o mesmo comportamento. A viscosidade das MEs é muitas vezes comparada à da água, até mesmo em elevadas concentrações de gotículas, muito provavelmente devido à coalescência reversível das mesmas (LANGEVIN, 1988).

No entanto, quando nota-se que a microemulsão está concentrada, ou seja, quando a fase dispersa estiver em elevadas concentrações, a interpolação torna-se dificultada em razão das interações intergotículas, sendo necessário, nesses casos, fazer uma diluição do sistema microemulsionado com a fase dispersante para suprimir a interação entre gotículas e assim facilitar a sua identificação (HOU; KIM; SHAH, 1988; ABOOFAZELI; BARLOW; LAWRENCE, 2000; LAWRENCE; REES, 2012; ORTHABER, GLATTER, 2000; FORMARIZ et al., 2006).

Por esse fato, as aferições das determinações do tamanho de gotícula e do potencial zeta para a microemulsão desenvolvida contendo MTZ a 0,75% e seu respectivo placebo foram realizadas nas suas formas puras (concentradas) e nas diluições de 1:10, 1:20 e 1:30 em água destilada. Após esse processo de otimização, a diluição de escolha foi a de 1:20 por permitir melhor obtenção e visualização dos dados analisados, mesmo que para todas as diluições examinadas, os resultados encontrados tenham sido compatíveis com os intervalos de tamanho e potencial zeta considerados compatíveis com os que são estabelecidos para as microemulsões.

Como pode ser observado na tabela 11, os valores de tamanho de gotícula para o placebo e contendo o fármaco variaram aproximadamente entre 17-20 nm e portanto, corroboram com o intervalo estabelecido para as microemulsões (estabelecido geralmente na faixa de 10-300 nm), bem como corrobora com os dados de tamanho para a formulação placebo encontrados por Sousa (2017).

Também pode ser evidenciado que a incorporação do fármaco não aumenta significativamente ($P > 0,05$) o tamanho da gotícula originada inicialmente com a ME sem o fármaco. Isto se deve, possivelmente, as propriedades físico-químicas intrínsecas da molécula do MTZ, hidrofiliicidade, que nos levariam a crer que o fármaco se localizaria principalmente na fase contínua, ou externamente à gotícula, ou até mesmo, em menor proporção, na sua região interfacial.

Além do tamanho, foram obtidos os valores de índice de polidispersão (IPD) da microemulsão desenvolvida (Tabela 11). O cálculo do IPD considera o tamanho médio da gotícula, índice de refração do solvente, ângulo de medida e a variação da distribuição, portanto oferece informações acerca da homogeneidade da população de gotículas, caracterizando uma distribuição de tamanho (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996; GOVENDER et al., 1999; GAUMET et al., 2008; DAMASCENO et al., 2012).

Embora não exista uma correlação numérica estabelecida entre um valor de IPD e as amostras, em uma escala de 0 a 1, valores de IPD menor que 0,1 têm sido associados a um sistema monodisperso com elevada homogeneidade na população de gotículas, sugerindo uma distribuição de tamanho monomodal. Por outro lado, valores elevados de IPD sugerem uma distribuição de tamanho mais amplo ou polimodal. De modo geral, conforme exposto na Tabela 11, os sistemas preparados apresentaram valores de IPD entre 0,27 e 0,29, indicando que as gotículas das microemulsões eram homogêneas, com distribuição de tamanho uniforme e, por conseguinte, em conformidade com o que foi encontrado por Sousa (2017) (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996; GOVENDER et al., 1999; GAUMET et al., 2008; CONEAC et al., 2015).

Tabela 11 - Valores de tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta das microemulsões contendo metronidazol e placebo desenvolvidos no estudo.

FORMULAÇÃO	Tamanho de gotícula (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial zeta
Microemulsão Placebo	17,9±0,35	0,271±0,01	-27,3±0,48
Microemulsão MTZ 0,75%	19,7±0,39	0,29±0,004	-25,5±0,51

Embora não exista correlação linear direta estabelecida entre certo valor do potencial Zeta e a estabilidade de sistemas, o potencial zeta tem um papel importante na determinação da estabilidade de sistemas dispersos e nas interações entre as gotículas presentes. É medido usando uma combinação das técnicas de eletroforese e o efeito Doppler e, por consequência, essa combinação é também conhecida como eletroforese laser Doppler. Este método mede a velocidade com que as partículas se movem em um líquido quando um campo elétrico é aplicado (PHILLIPS, 1955; KHAN et al., 2013; KITTIPONGPITTAYA et al., 2016).

A origem da carga de interface é dependente dos componentes da formulação desenvolvida como a composição do óleo, do pH e eletrólitos presentes na fase aquosa. A repulsão eletrostática entre as partículas depende do valor do potencial zeta, onde se entende que quanto maior o potencial zeta, mais forte a repulsão, mais estável se torna o sistema (KITTIPONGPITTAYA et al., 2016; SOUSA et al., 2017).

Estudos abordam que a redução da carga resultante (em módulo) da ordem de 40 mV para valores inferiores a 25 mV tende a provocar um aumento na taxa de floculação e coalescência das formulações (ROLAND et al., 2003; BRUXEL et al., 2012). Dentro dessa mesma ideia, é encontrado que sistemas mais estáveis apresentam valores de potencial zeta iguais ou superiores ao módulo de 20 mV, porém esta regra não pode ser aplicada irrestritamente, pois existem algumas formulações com estabilizantes que possuem um potencial zeta menor e nem por isso não são estáveis (KHAN et al., 2013).

Os valores apresentados na tabela 11 mostraram medições de potencial Zeta apresentaram valores superiores ao módulo de 20 mV, indicando, possivelmente, a maior estabilidade das microemulsões. Também indicam que a interface está carregada negativamente, isto se deve, provavelmente, aos ácidos graxos livres do óleo e muitos emulsionantes tais como Tween 20, que podem contribuir com cargas negativas em formulações emulsionadas visto que apenas tensoativos não-iônicos foram utilizados na microemulsão desenvolvida. Esta carga aumentará a estabilidade das formulações provocando uma repulsão de duas camadas entre as gotículas, evitando assim a agregação das gotículas das microemulsões. (BUTANI; YEWALE; MISRA, 2016; KITTIPONGPITTAYA et al., 2016; SOUSA et al., 2017).

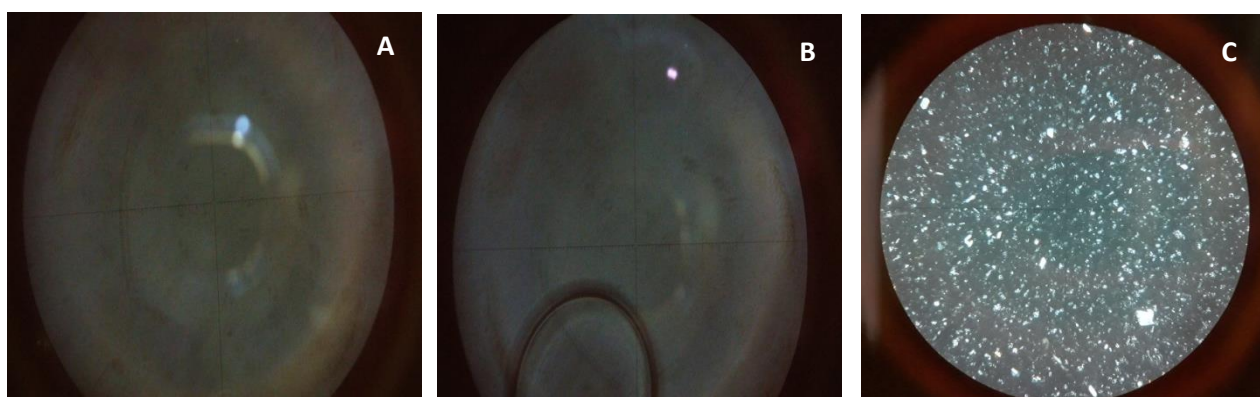
5.1.3 Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada é uma técnica que permite a classificação quanto à isotropia e anisotropia dos sistemas, permitindo a diferenciação entre o tipo de estruturação. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Logo, uma das maneiras de classificar as fases líquido-cristalinas é determinar sua isotropia óptica, através dessa técnica. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas e microemulsões são isotrópicas (NORLING et al., 1992; BRINON et al., 1999; HYDE et al., 2001).

As MEs estudadas (Figura 21) não apresentaram nenhum desvio ou vibração da luz polarizada, as quais se apresentaram com as mesmas propriedades ópticas em todas as direções. Esse comportamento isotrópico (campo escuro) observado nas fotomicrografia da ME desenvolvida contendo MTZ 0,75% sugere a formação de sistema microemulsionado por não desviar a luz sob o plano de luz polarizada.

Nota-se também que a incorporação do metronidazol nesses sistemas não alterou o comportamento isotrópico, confirmando a manutenção do sistema microemulsionado. Já a fotomicrografia obtida de uma formulação convencional do tipo emulsão foi propositalmente avaliada no mesmo dia que as formulações teste, como prova clara da anisotropia desse tipo de sistemas (GABBOUN et al., 2001; HYDE et al., 2001).

Figura 21 - Fotomicrografias ao microscópio óptico com luz polarizada da formulação desenvolvida do tipo microemulsão contendo MTZ 0,75% (B), seu respectivo placebo (A) e uma formulação convencional do tipo emulsão (C).



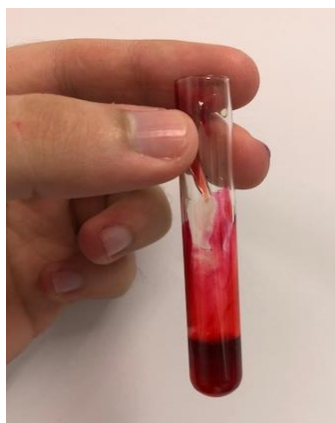
Fonte: Acervo pessoal.

5.1.4 Teste de solubilidade em corante

Esse teste foi realizado a fim de se designar de forma simples, rápida e visualmente o sentido de fase da microemulsão desenvolvida contendo MTZ. O resultado do teste de

Figura 22 - Teste de corante realizado para a microemulsão contendo MTZ 0,75% desenvolvida.

solubilidade do corante mostrou que o corante solúvel em água se espalhou uniformemente na ME desenvolvida (Figura 22) e isto indica que a mesma foi do tipo O/A. Normalmente, o EHL requerido para formar microemulsões do tipo O/A situa-se entre 12 e 18, valores abaixo, indicam a formação de sistemas A/O (KAWAKAMI et al., 2002).



Fonte: Acervo pessoal.

Este resultado já era, portanto, de certa forma esperado já que a formulação placebo, que foi utilizada como base para a microemulsão desenvolvida, é advinda de um diagrama de fases pseudoternário desenvolvido por Sousa (2017) de EHL final de 14,59, se encontrando dentro do intervalo mencionado acima para sentido de fase do tipo O/A e, por consequência, corroborando com os resultados encontrados pelo mesmo autor (SOUSA et al., 2017).

5.1.5 Teste de centrifugação

As formulações analisadas mantiveram-se estáveis após os ensaios de centrifugação, não apresentando precipitação, turvação, ou tão pouco, separação de fase. Como o teste de centrifugação tem a finalidade de produzir estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das gotículas e antecipando possíveis

instabilidades, dessa forma, a velocidade de centrifugação não provocou alterações nos sistemas analisados (BRASIL, 2004; SOUSA, 2016).

5.1.6 Temperatura de transição sol-gel e reograma do termogel

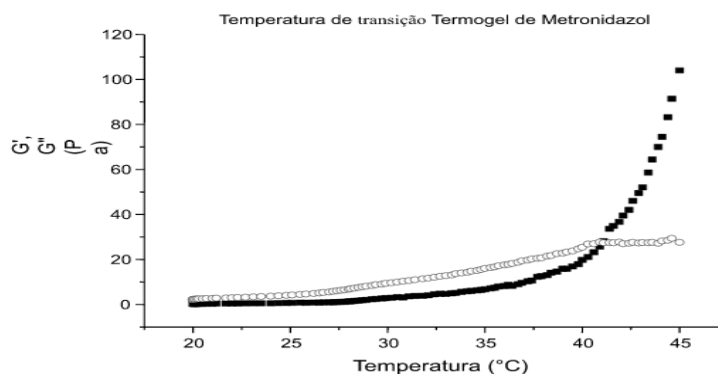
Os termogéis tem o objetivo de facilitar a administração do fármaco na pele já que esse tipo de forma farmacêutica se apresenta em forma líquida à temperatura ambiente e uma vez atingida a temperatura de transição, adquirem a consistência de um gel (CHEN et al., 2013; DUMORTIER et al., 2006).

Conforme descrito, em baixas temperaturas, as moléculas do polímero encontram-se em solução. Quando a temperatura é elevada, as cadeias poliméricas desidratam como resultado da quebra das ligações hidrogênio favorecendo a interação entre as cadeias hidrofóbicas de PPO. Em um primeiro momento durante essa nova interação, ocorre a formação de micelas, estágio precedente a gelificação. Conforme a temperatura aumenta, as micelas tendem a se organizar (empacotar), esse processo leva ao aumento da viscosidade resultando na formação do gel (CABANA; AIT--KADI; JUHASZ, 1997; KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002; DUMORTIER et al., 2006; ESCOBAR--CHÁVEZ et al., 2006).

Tendo em vista que a definição desta temperatura é de extrema importância na caracterização do termogel, a mesma foi determinada para o termogel contendo metronidazol reproduzido segundo Melo (2017) como forma de confirmar as características do termogel obtido para esse estudo.

A figura 23 mostra a variação dos parâmetros G' e G'' (módulo de armazenamento e perda, respectivamente) em função do aumento da temperatura. Os módulos G' e G'' são característicos de materiais sólido e líquido, respectivamente. O módulo G' apresenta valor baixo para os líquidos e aumenta de forma acentuada com a temperatura resultando na formação de gel, comportamento esse que foi observado para a formulação analisada (RICCI et al., 2002). De acordo os dados, a temperatura de transição encontrada foi de 40.5 °C, estando acima da temperatura fisiológica, todavia é observado o aumento pronunciado da viscosidade a partir de 35 °C corroborando com os achados descritos por Melo (2017).

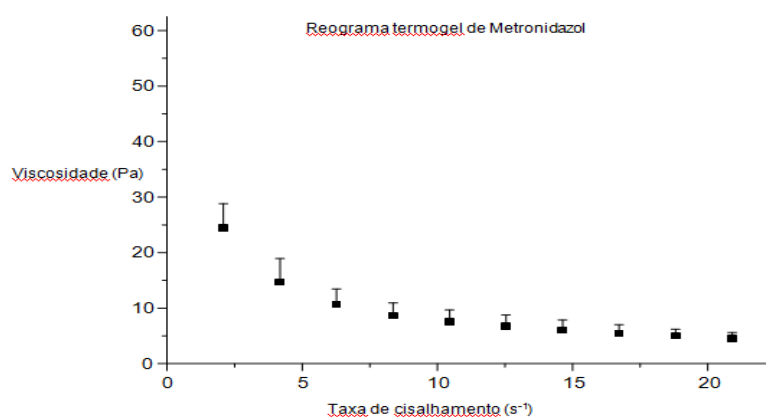
Figura 23 - Variação dos parâmetros G' (pontilhado escuro) G'' (pontilhado claro) do termogel com Metronidazol em função do aumento da temperatura.



Fonte: Acervo pessoal.

Ainda em relação a caracterização do termogel, dados foram obtidos no que se diz respeito a viscosidade. O termogel mostra uma baixa viscosidade à temperatura do corpo ($\sim 37^{\circ}\text{C}$) e através da análise do gráfico (Figura 24), foi possível determinar o comportamento pseudoplástico da formulação estudada, onde a viscosidade diminui à medida que aumenta a taxa de cisalhamento sendo previsível e desejável para géis de poloxamer, principalmente quando se trata de preparações de uso tópico, corroborando com os resultados encontrados por Melo (2017) (PEREIRA et al, 2013; RICCI et al., 2002).

Figura 24 - Reograma do termogel contendo MTZ 0,75%.



Fonte: Acervo pessoal.

5.2 AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES

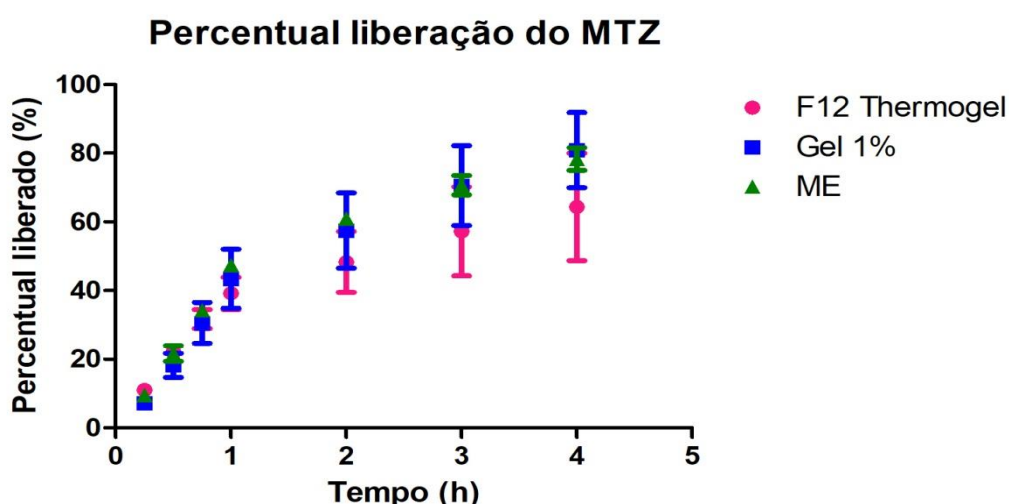
5.2.1 Absorção cutânea (OECD TG 428)

5.2.1.1 Estudos de liberação *in vitro* das formulações

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados em sistema automatizado de células de Franz utilizando membranas sintéticas de acetato de celulose apenas para as formulações contendo MTZ 0,75%. Por não controlar o transporte dos compostos através dela, essa membrana não é considerado fator limitante a difusão do fármaco (HELLEDI; SCHUBERT, 2001; COSTA, 2011).

No gráfico abaixo (Figura 25) é possível observar que os perfis de liberação de cada formulação foram expostos até 4 horas de ensaio visto que após esse tempo foi observado a formação de um platô com quantidade liberada constante. Após tratamento estatístico por ANOVA one-way no intervalo de confiança de 95%, observa-se que não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) nas quantidades liberadas entre as formulações estudadas, demonstrando que os perfis de liberação das mesmas são semelhantes.

Figura 25 - Quantidade percentual do metronidazol liberado das formulações estudadas *in vitro* em membrana hidrofílica (média $\pm$ DP, n = 14).



Para todas as formulações estudadas, observa-se que o metronidazol alcançou a liberação máxima entre 60% - 80% no período de 4h para as três formulações, indicando que o fármaco é eficientemente liberado e que, mais uma vez, sem diferença estatisticamente significativa entre as quantidades liberadas das diferentes formas farmacêuticas.

Avaliando-se as taxas de liberação apresentadas pelas formulações estudadas, os perfis cinéticos foram classificados pelo modelo cinético de Higuchi visto que depois de realizada a regressão linear da concentração liberada em função da raiz quadrada do tempo, os valores dos coeficientes de correlação apresentam-se próximos de 1 quando comparado aos outros modelos. Portanto, seguem o modelo de Higuchi ou também chamado de pseudo-primeira ordem, ou seja, a difusão é controlada pelo sistema.

No que se diz respeito às formulações contendo lapachol, não foi feito estudo de liberação *in vitro* em virtude de estudos já existentes na literatura. De acordo com Tabosa (2014) foi possível observar que o perfil de liberação da formulação gelificada contendo lapachol também segue o modelo de Higuchi. No entanto, a formulação do tipo microemulsão obteve valor do coeficiente de correlação próximo de 1 após a realização da regressão linear da concentração liberada em função do tempo, demonstrando que a mesma segue o modelo de ordem zero, na qual a velocidade de liberação é constante, independente da concentração da droga (TABOSA, 2014).

5.2.1.2 Estudos de permeação *in vitro* / *ex vivo* das formulações

Os experimentos de permeação foram realizados utilizando a região dorsal da pele de porco como membrana animal por 6 horas e os resultados foram obtidos mediante utilização das equações da reta obtidas nas avaliações dos métodos de determinação do conteúdo do metronidazol e do lapachol por CLAE-UV e diferentes padrões foram observados. Para as formulações deste estudo, os diferentes resultados podem ter sido influenciados por diferentes fatores, como parâmetros reológicos do veículo, o pH da formulação, a solubilidade do fármaco na forma farmacêutica estabelecida, dentre outros (SMITH; SURBE; MAIBACH, 1999).

Para as formulações contendo lapachol, após coleta no final do experimento, não foi possível quantificar o fármaco nas amostras de líquido receptor para as duas diferentes formulações, pois as mesmas não atingiram o limite inferior de quantificação (LIQ) do método, padrão corroborado pelo estudo realizado por Tabosa (2014).

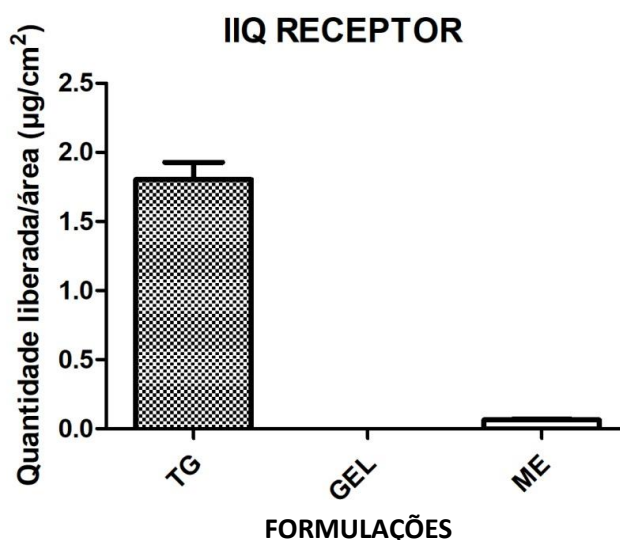
De acordo com a análise dos dados do metronidazol, as quantidades do fármaco obtidas no líquido receptor para o gel e a microemulsão ficaram abaixo do LIQ, dados esses que corroboram com estudos reportados na literatura. De acordo com pesquisa realizada por

Araújo (2016), metronidazol veiculado em geis de diferentes concentrações de carbopol, demonstraram que o fármaco não alcançou a solução receptora (limite de quantificação do método de doseamento foi de $0,1074\mu\text{g/mL}$), o que pode ser observado na figura 26.

Para as microemulsões, a literatura relata que fármacos parcialmente hidrofílicos quando solubilizados nesses sistemas, podem particionar-se entre a fase contínua, no interior da ME e na região interfacial. Sendo assim, o aumento da solubilidade do fármaco nas gotículas dispersas de óleo pode estar relacionado com a partição desfavorável do mesmo desta fase para a pele e o sistema terá característica de reservatório, apresentando uma difusão lenta e contínua do fármaco das gotículas de óleo para a fase contínua (GARTI; ASERIN, 1996). Esse comportamento explicaria as baixas concentrações encontradas (Figura 26).

Como pode ser observado na figura abaixo, para as formulações de termogel, a permeação do metronidazol foi maior e estatisticamente significativa, quando comparada com as formulações citadas anteriormente. Esse gel de formação *in situ*, mediante uma menor resistência mecânica, como a fricção na pele, resulta em uma dissolução ou fluxo prematuro no local de ação, liberando desta forma o ativo da forma farmacêutica (WEN-DI et al, 2008; SIRISH; SADHNA; NALINI, 2010).

Figura 26 - Quantidade do metronidazol encontrada no líquido receptor a partir das formulações estudadas em pele dorsal de porco após 6 h de estudo (média $\pm$ DP, n = 14).



Estudos realizados por Melo (2017), com formulações distintas de termogel contendo metronidazol, apresentaram resultados semelhantes aos disposto nesse estudo. Outros estudos

realizados *in vivo* encontrados na literatura, sugerem que a formulações com concentração de 20% p/p de poloxamer sejam alternativa mais viável para administração tópica do fármaco na forma de termogel (PATTON; ROBINSON, 1975). No entanto, mais estudos serão necessários para compreender exatamente qual a explicação para este resultado encontrado.

5.2.2 Estudo e avaliação dermatofarmacocinética (dpk) – *tape-stripping in vitro*

Nos estudos *in vitro* de produtos para uso tópico, é importante considerar que não apenas as concentrações de fármacos presentes na solução receptora refletem a influência da formulação na atividade do produto (SATO et al., 2007).

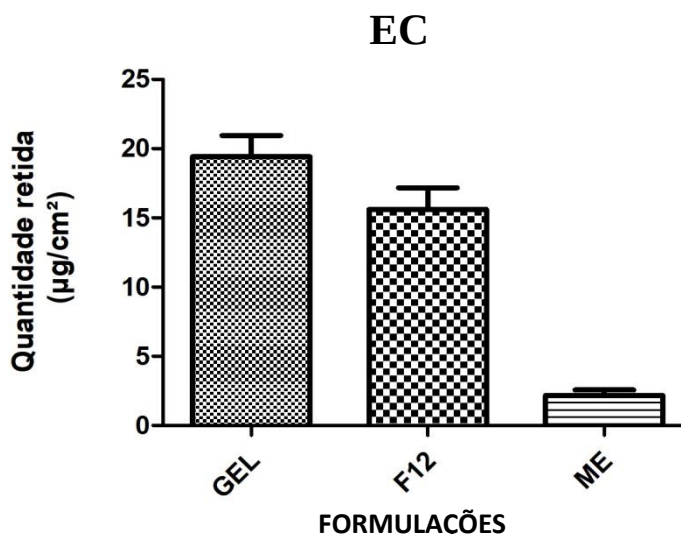
Desse modo, a determinação da quantidade de fármaco retido na membrana leva a dados mais concretos sobre a atividade tópica da formulação (MASINI et al., 1993). Isto pode ser realizados através dos estudos da dermatofarmacocinética, na qual é possível determinar a concentração do fármaco no estrato córneo pós aplicação e pós remoção da formulação ao longo de um determinado período de tempo, como previamente mencionado.

Sabe-se que fármacos de uso tópico se distribuem primeiramente pelo EC e a partir dele, alcançam a epiderme e a derme. Por conseguinte, a concentração de fármaco presente no EC está diretamente relacionada com a concentração que se difunde para as demais camadas, de modo que a BD na pele pode ser estimada ao se medir a quantidade de fármaco presente no EC pela técnica de *tape-stripping* (SHAH et al., 1998).

5.2.2.1 Metronidazol

Em relação aos resultados dos experimentos de dermatofarmacocinética das formulações contendo metronidazol, a figura 27 apresenta a quantidade total do fármaco acumulada no estrato córneo (EC) na pele do dorso do porco, ao final de 6 horas de permeação, de todas as formulações analisadas (gel, termogel e microemulsão).

Figura 27 - Quantidade de MTZ por centímetro quadrado retida no EC após 6 h de absorção após a aplicação das três formulações MTZ (n = 14).



(EC)- estrato córneo, (F12)- termogel, (ME)- microemulsão

Como observado na figura acima, todas as formulações apresentaram quantidades significantes do metronidazol no estrato córneo. Como discutido anteriormente, considerando que a microemulsão apresenta um caráter de reservatório para o metronidazol com difusão lenta e contínua, os valores mais baixos de quantidade de fármaco retido no EC observados são equivalentes ao tipo de perfil observado uma vez que o ativo é liberado aos poucos da forma farmacêutica (GARTI; ASERIN, 1996).

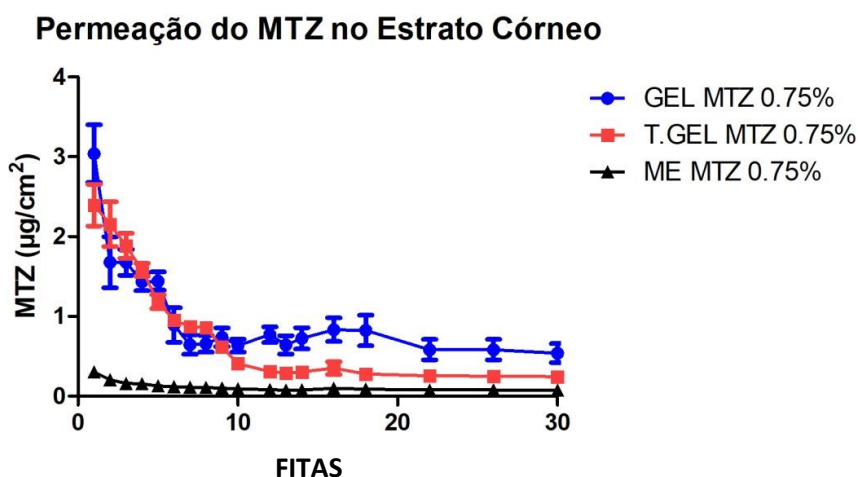
É possível perceber que os perfis de quantidades retidas do fármaco no EC para as formulações gel e termogel possuem os valores mais expressivos e corroboram com estudos encontrados na literatura (ARAUJO, 2016; MELO et al., 2017). Desse modo, observa-se uma menor quantidade de MTZ acumulada no EC nas microemulsões quando comparado à formulação gelificada e ao termogel. Aparentemente, a quantidade acumulada seguiu a seguinte ordem: Gel > termogel > microemulsão (Tabela 12). Entretanto, após tratamento estatístico (ANOVA), foi observado que a quantidade de metronidazol retida no estrato córneo foi estatisticamente semelhante ($P > 0,05$) para o gel e para o termogel, e estas diferiram estatisticamente da formulação microemulsionada contendo o fármaco ($P < 0,05$).

Tabela 12 – Média e DP para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC e na epiderme/derme após 6 h de absorção após a aplicação das três formulações MTZ 0,75% (n = 14) em pele de porco.

	Quantidade retida de fármaco por camada da pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			
	Estrato córneo (EC)		Epiderme/derme (EP +D)	
	Média ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DP	Média ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DP
GEL	20,50	5,4	7,24	4,1
TERMOGEL	14,55	5,6	3,63	1,27
MICROEMULSÃO	1,85	1,24	1,43	0,28

Como já se sabe, as fitas resultantes do procedimento de *tape-stripping* contêm quantidades de EC e quantidades da(s) substância(s) aplicada(s) topicamente que pode(m) ser quantificada(s) com um método analítico apropriado (por exemplo, CLAE, espectroscopia, etc.). As propriedades das formulações aplicadas topicamente têm uma forte influência na quantidade de EC removido em cada fita. As primeiras fitas possuem quase uma camada completa de corneócitos que se refletem em elevadas quantidades do fármaco no estrato córneo. Por consequência, com o aumento do número de fitas removidas, a presença dos corneócitos e seus agregados torna-se cada vez menor e assim menor quantidade do fármaco quantificada (PELLANDA, 2006; LADEMANN et al., 2009).

Figura 28 - Quantidade de MTZ por centímetro quadrado retida no EC por fita ao longo das 30 fitas para três formulações (n = 14).



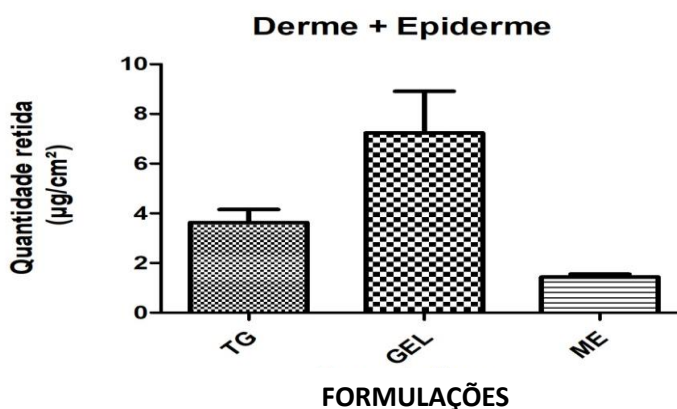
Esse comportamento pode ser claramente evidenciado na figura 28 para o MTZ cuja quantidade encontrada é maior nas primeiras fitas e decai a medida que as fitas são removidas. Ainda pode ser novamente notado perfis de distribuição semelhantes para as formulações do tipo gel e termogel quando comparados a do tipo microemulsão como já discutido.

Conforme os resultados mostrados na figura 29, o estudo de retenção (quantidade de MTZ na epiderme e derme viável) demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre a quantidade de MTZ para as formulações do tipo gel e termogel assim como verificou que ambos os tipos de formulações diferem estatisticamente da quantidade encontrada na retenção a partir da microemulsão (Tabela 12).

Esse padrão de retenção na epiderme e derme reflete o que foi discutido acerca dos valores encontrados no estrato córneo e corrobora com o foi proposto por Shah (1998) onde a concentração de fármaco presente no EC está diretamente relacionada com a concentração que se difunde para as demais camadas já que se distribuem primeiramente pelo EC e a partir dele, alcançam a epiderme e a derme. Adicionalmente, os valores de retenção encontrados para o MTZ através do gel e do termogel também corroboram com os dados encontrados nos trabalhos de Araujo (2016) e Melo (2017), respectivamente, demonstrando mais uma vez a reprodutibilidade dessa técnica.

Observou-se também que os dados de quantidade de MTZ retida no EC e na epiderme mais a epiderme viável (retenção) embora que não diferem estatisticamente para o gel (formulado com carbopol) e o termogel (a base de poloxamer), visualmente e aparentemente parecem ser maiores para a formulação do tipo gel.

Figura 29 - Quantidade de MTZ por centímetro quadrado retida na epiderme viável + derme para as três formulações (n = 14) após 6 h de estudo.



Esse fato pode, possivelmente ser atrelado, como já descrito, ao sistema de Poloxamer que promove a liberação controlada do fármaco devido a sua estrutura micelar.

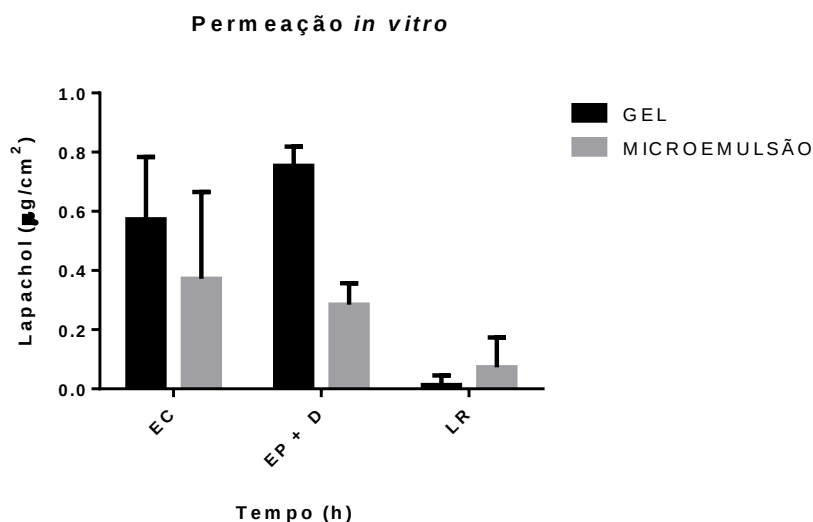
A eficácia clínica de um fármaco aplicado por via tópica depende, não só das suas propriedades farmacológicas, mas também da sua disponibilidade no local de ação (LOFTSSON; OLAFSSON,1998). Diante disto, as formulações desenvolvidas para aplicação tópica contendo o metronidazol foram capazes de liberar o fármaco tornando-o disponível nas camadas mais superficiais da pele. De acordo com a literatura, os componentes adicionados ao veículo, além de outros fatores, como a forma do fármaco, podem afetar os resultados dos perfis estudados e ainda modificar a ação do fármaco. Esta relação pode ser explicada pelo fato de que os veículos utilizados tem o potencial de aumentar ou diminuir a quantidade de água no estrato córneo, afetando a hidratação e, conseqüentemente, aumentar ou diminuir a penetração do fármaco (ROUGIER et al., 1999; OLIVEIRA, 2007; MIRON et al., 2014).

5.2.2.2 *Lapachol*

A retenção do lapachol no estrato córneo e na epiderme viável mais derme também foi avaliada através da dermatofarmacocinética *in vitro* em pele dorsal de porco para as formulações analisadas nesse estudo (gel e microemulsão) contendo esse fármaco. Tentando-se obter mais informações a respeito do comportamento do fármaco em questão nos produtos, essa avaliação foi realizada após 2 h e 6 h de contato com a formulação teste.

A figura 30 apresenta a quantidade total de lapachol acumulada no estrato córneo (EC) da pele suína proveniente do dorso, ao final de 2 h horas de permeação em contato, de todas as preparações testadas. Para o gel, observou-se uma tendência de maior acúmulo de lapachol na epiderme/derme seguido do estrato córneo e quantidades insignificantes foram encontradas no líquido receptor. Já para a microemulsão, as maiores quantidades de fármaco são encontrados no estrato córneo, seguido da derme/epiderme e quantidades muito baixas no líquido receptor.

Figura 30 - Quantidade de LAP por centímetro quadrado retida no estrato córneo (EC), epiderme viável + derme (EP+D) e no líquido receptor (LR) após 2 h de absorção após a aplicação das três formulações.



Observa-se também que, aparentemente, uma menor quantidade de lapachol está acumulada no EC na microemulsão quando comparado à formulação gelificada (Tabela 13). Entretanto, após tratamento estatístico (ANOVA), foi observado que a quantidade de lapachol retida no estrato córneo foi estatisticamente semelhante ($P > 0,05$) para o gel e para a microemulsão, resultados similares também foram encontrados no líquido receptor.

Tabela 13 – Média e DP para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC e na epiderme/derme após 2 h de absorção após a aplicação das formulações contendo LAP 0,5% ($n = 14$) em pele de porco.

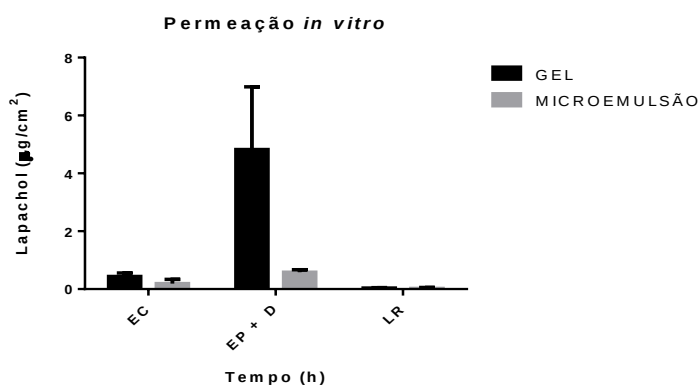
	Quantidade retida de fármaco por camada da pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			
	Estrato córneo (EC)		Epiderme/derme (EP +D)	
	Média ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DP	Média ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DP
GEL	0,57	0,21	0,75	0,06
MICROEMULSÃO	0,37	0,26	0,28	0,07

O mesmo não ocorre quando se avalia a retenção na derme e epiderme que após as 2 h, onde foi verificado que a quantidade retida nessa camada foi maior e estatisticamente

significativa ($P < 0,05$) para o gel quando comparado à microemulsão, após análise de variância (ANOVA) em um intervalo de confiança de 5%.

A Figura 31 ilustra a quantidade total de lapachol acumulada nas diferentes camadas da pele suína proveniente do dorso, ao final da permeação com 6 h horas de contato de todos os produtos testados. Observou-se que, tanto para o gel quanto para a microemulsão, uma maior tendência de acúmulo do fármaco foi encontrada na derme/epiderme e essa característica pode ser sugestiva da capacidade do fármaco de se particionar, possivelmente, nas membranas em virtude da sua lipofilia.

Figura 31 - Quantidade de LAP por centímetro quadrado retida no estrato córneo (EC), epiderme viável + derme (EP+D) e no líquido receptor (LR) após 6 h de absorção após a aplicação das três formulações.



Sugestivamente, esse comportamento de maior acúmulo do fármaco na epiderme/derme não tenha sido observado para a microemulsão ao final das 2 h de absorção (Figura 30) devido ao caráter de reservatório que muitas vezes pode ser assumido por esse tipo de sistema e em virtude da maior afinidade do lapachol pelo veículo, resultando em uma menor quantidade permeada e consequentemente, é sugerido que uma menor quantidade atingiria e ficaria retida nas camadas mais internas da pele suína já que, geralmente, as quantidades do EC estão diretamente relacionadas com a concentração que se difunde para as demais camadas (GARTI; ASERIN, 1996; SHAH, 1998; TABOSA, 2014).

Houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) após análise de variância (ANOVA), entre as quantidades acumuladas tanto no EC quanto na epiderme/derme que foi maior para o gel e menor para a microemulsão após o tempo de 6h de absorção (Tabela 14).

Tabela 14 – Média e DP para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC e na epiderme/derme após 6 h de absorção após a aplicação das formulações contendo LAP 0,5% (n = 14) em pele de porco.

	Quantidade retida de fármaco por camada da pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			
	Estrato córneo (EC)		Epiderme/derme (EP +D)	
	Média ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DP	Média ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DP
GEL	0,44	0,12	4,8	0,12
MICROEMULSÃO	0,18	0,10	0,58	0,10

Ainda dentro desse raciocínio, ao se analisar os dois gráficos (2h e 6 h), para a retenção na epiderme/derme é verificada diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) das quantidades entre 2h e 6h de absorção tanto para o gel quanto para a microemulsão provavelmente atribuída a maior difusão do fármaco para esta camada a partir do EC ao longo do tempo de difusão. O mesmo não ocorre ao analisarmos a retenção no EC onde não é verificada diferença significativa ($P > 0,05$) entre 2h e 6h de absorção para ambas as formulações com intervalo de confiança de 5%, visto que possivelmente a quantidade de fármaco se mantém semelhante em virtude do balanço entre as quantidades de fármaco que continua sendo liberado das formulações para o EC e a quantidade que sai dessa camada e se difunde para a epiderme/derme ao passar do tempo de contato e difusão.

É uma característica conhecida reportada do estrato córneo de constituir a principal barreira à penetração de fármacos na pele, enquanto, a epiderme e a derme não apresentam função significante de barreira e se comportam como uma espécie de gel aquoso, sendo marcantes seus efeitos reservatórios (LE HIR, 1997; BONNABRY, 1999).

É reportado na literatura que o acúmulo de fármacos anti-inflamatórios no tecido está diretamente relacionado com o fluxo e com a absorção percutânea, já que o tecido serviria como reservatório para posterior passagem do fármaco para a circulação sistêmica (GARCIA; MARCHETTI; BENTLEY, 2001). Como foi discutido, o lapachol possuiu uma maior retenção na epiderme/derme em relação ao EC, o que torna as formulações estudadas de particular importância para o tratamento da dor e da inflamação que acomete, normalmente, sítios como músculo, líquido sinovial além de tecidos superficiais (TABOSA, 2014).

Outra informação extraída da Figura 31 é a de que uma quantidade menor e estatisticamente significativa ($P > 0,05$) de lapachol acumulada no EC e na epiderme/derme nas microemulsões foi observada quando comparado à formulação gelificada. O fluxo de liberação do lapachol, em cinéticas de permeação, depende significativamente da interação fármaco/veículo e da fração aquosa do sistema (KANTARCI et al., 2007; DJORDJEVIC; PRIMORAC; STUPAR, 2005).

Desse modo, observa-se que sugestivamente a formulação gelificada apresentou uma maior quantidade retida através da pele suína visto que maior quantidade é encontrada no estrato córneo e na epiderme/derme ao final das 6 h (Figura 31). Esse achado pode ser explicado pelo seu maior percentual aquoso, quando comparada à microemulsão estudada, o que torna o ambiente favorável à partição do lapachol para fora da formulação, já que é lipossolúvel. Tabosa (2014) observou uma menor permeação das formulações microemulsionadas quando comparadas ao gel e ao emulgel em seu trabalho, que possuem uma grande quantidade aquosa na sua formulação (aproximadamente 40 e 59%, respectivamente).

Este resultado poderia ser ainda atribuído a reduzida atividade termodinâmica das formulações microemulsionadas, cujo alto teor de tensoativos e ácido oleico permitiu uma maior solubilidade do lapachol, desfavorecendo a sua partição (liberação) da formulação em virtude da maior afinidade pelo veículo. Fato comprovado por Tabosa (2014) já que as formulações gelificada e emulsionada utilizadas em seu estudo possibilitam aproximadamente 5 e 3 vezes, respectivamente, maior permeabilidade do lapachol para o meio receptor utilizado, quando comparado às microemulsões (TABOSA, 2014).

Além desse fator, o aumento da difusão do lapachol através da pele para a formulação gel, pode refletir da presença de promotores de absorção na formulação como estratégia para aumentar a permeabilidade (BARRY, 1983; MOSER et al., 2001; LIRA et al., 2004). Nesse caso, pode ser proveniente da habilidade do Tween 80, da glicerina e principalmente do etanol em modificar reversivelmente a função de barreira da pele por uma série de mecanismos, que podem incluir: a fluidização, o desordenamento e a extração da camada lipídica do estrato córneo (SANTUS; BAKER, 1993; YAMANE; WILLIAMS; BARRY, 1995; WATKINSON et al., 2009). Apesar de garantir maior solubilidade do fármaco na formulação, é possível ainda que o etanol tenha evaporado, por se tratar de um solvente volátil, e dessa forma, a solubilidade do lapachol tenha sido reduzida, conduzindo à “supersaturação”, que resulta no

aumento da atividade termodinâmica do fármaco na formulação e, conseqüentemente, aumento no fluxo transdérmico (TABOSA, 2014).

Apesar das formulações analisadas possuírem a mesma quantidade de fármaco, ambas diferem consideravelmente em relação aos valores de pH. Essa diferença pode interferir no grau de ionização do fármaco, no equilíbrio de espécies ionizadas e não ionizadas e conseqüentemente na capacidade de penetração das mesmas. Na microemulsão em virtude do pH da formulação e do pka do fármaco, o equilíbrio estaria mais deslocado no sentido das moléculas não ionizadas.

Ao mesmo passo que essas espécies possuem melhor permeabilidade, são moléculas de menor polaridade, o que pode ter aumentado mais ainda a solubilidade no conteúdo oleoso das microemulsões, explicando a menor permeabilidade quando comparados ao gel. Estudos têm demonstrado que o aumento na solubilização do fármaco através da sua ionização pode proporcionar aumento da penetração e do fluxo do fármaco, o que é verificado na relação pka do lapachol e pH da formulação geleificada, deslocando o equilíbrio para a formação de espécies ionizadas (SWARBRICK et al., 1984; GWAK; CHUN, 2002; LIRA et al., 2004).

Como já descrito, componentes adicionados ao veículo, como também outros fatores, como a forma do fármaco, afetam não só a liberação e a permeação por determinar a solubilidade e o gradiente de concentração para a difusão passiva, mas também a sua ação. Esta relação pode ainda estar fundamentada no fato dos veículos aplicados terem o potencial de aumentar ou diminuir a quantidade de água no estrato córneo e, portanto aumentar ou diminuir a penetração (ROUGIER et al., 1999; OLIVEIRA, 2007).

O veículo ainda pode exercer mais efeitos quando aplicados na pele, podendo interagir com o estrato córneo, desestabilizando a função barreira e provocar mudanças na solubilidade e na difusão da substância ativa pelo estrato córneo. Em geral, admite-se que a permeação de um composto pode ser favorecida pela seleção de veículos que tenham baixa afinidade pelo composto ou naquele que ele seja pouco solúvel (SMITH; SURBE; MAIBACH, 1999).

A literatura relata que as microemulsões têm grande capacidade de promover a penetração de drogas através da pele (KREILGAARD, 2002; OZGUNEY et al., 2006). No entanto, neste estudo, foram encontrados resultados contraditórios, pois as microemulsões mostraram uma menor quantidade retida que o gel após 6 horas de ensaio.

5.2.3 Estudo de dermatofarmacocinética in vivo para as formulações contendo lapachol

5.2.3.1 Recuperação do lapachol no estrato córneo humano e estabilidade das amostras

A Tabela 15 apresenta valores médios de recuperação no estrato córneo (fármaco adicionado às fitas) e os resultados da recuperação foram expressos em percentual de lapachol recuperado. Como pode ser observado, em virtude de uma maior recuperação do fármaco obtida, já que segundo a OECD (2004) a recuperação deve ser $100 \pm 10\%$, e de um tempo de extração mais curto, visando-se otimizar o processo de extração o método escolhido foi o de extração em sonificador em 30 min que se mostrou o mais adequado quanto aos parâmetros de recuperação e simplicidade do método.

Tabela 25 - Recuperação do lapachol no EC das fitas adesivas para as concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL por tipo de método de extração para estudo *in vivo* em humanos.

	Concentração (µg/mL)					
	5 µg/mL (n =3)			10 µg/mL (n =3)		
	Média±DP (µg/mL)	CV (%)	Recuperação (%)	Média±DP (µg/mL)	CV (%)	Recuperação (%)
Mesa agitadora (30 min)	4,40±0,07	1,75	88,17	9,64±0,57	5,59	96,44
Mesa agitadora (60 min)	4,70±0,15	3,21	94,05	9,43±0,86	9,17	94,34
Sonicador (30 min)	4,89±0,21	4,29	97,92	9,71±0,25	4,35	97,1
Sonicador (60 min)	4,37±0,19	4,47	87,57	7,28±0,68	9,39	72,85

Assim como demonstrado por Tabosa (2014) para a recuperação em pele suína em seu estudo, estes resultados comprovam a não ocorrência de perda significativa nem degradação da substância analisada, durante os procedimentos de retenção em fita, uma vez que a substância consegue ser recuperada em quantidade significativa. Portanto, os valores obtidos para o estudo *in vivo* de retenção no EC em humanos utilizados neste trabalho, não sofrem influência do processo de recuperação da substância analisada e sim apenas das características da formulação e da biomembrana utilizada.

Os resultados obtidos para a estabilidade das fitas após a extração (no líquido extraído) demonstraram que até o período de tempo máximo analisado pelo estudo (15 dias) não foi evidenciada degradação do fármaco estatisticamente significativa ($P > 0,05$). Já ao se analisar a estabilidade do lapachol em fitas contendo o EC e extraídas no dia da análise, foi encontrado uma degradação percentual de $14,13 \pm 0,14$ para os primeiros 7 dias e de $20,45 \pm 0,20$ no período de 15 dias analisado pelo estudo. Como forma de evitar possíveis problemas de degradação do lapachol, as amostras foram extraídas e analisadas no mesmo dia tanto para o estudo *in vitro* quando para o estudo *in vivo* do lapachol.

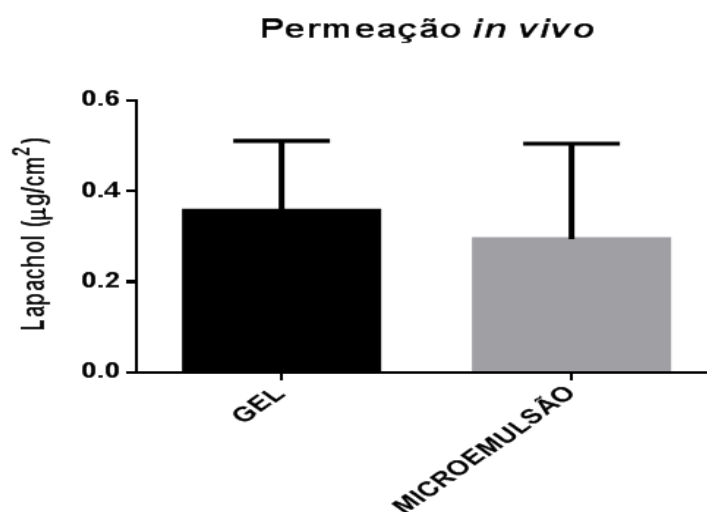
5.2.3.2 Retenção do lapachol no estrato córneo humano

Com relação ao estudo de DPK *in vivo*, a avaliação da retenção do lapachol no estrato córneo foi avaliada através do tape-stripping *in vivo* no antebraço de voluntários sadios para as formulações analisadas nesse estudo contendo esse fármaco. Assim como realizado no estudo *in vitro* já discutido, essa avaliação foi realizada após 2 h e 6 h de contato com a formulação teste.

Após testes feitos com voluntários, foi verificado que a quantificação das amostras era na maioria das vezes inviabilizada possivelmente em virtude das baixas concentrações no EC (com exceção das primeiras fitas) quando as fitas eram analisadas individualmente. Devido a isso as fitas foram agrupadas assim como no estudo *in vitro*, sendo as duas primeiras fitas agrupadas e analisadas separadamente das 18 restantes que também foram agrupadas assim como descrito na metodologia desse estudo e foram extraídas de acordo com Tabosa (2014).

Observou-se que, aparentemente, uma menor quantidade de lapachol ficou acumulada no EC na microemulsão quando comparado à formulação gelificada (Figura 32) e as quantidades são mostradas na tabela 16. Entretanto, após tratamento estatístico (ANOVA), foi observado que a quantidade de lapachol retida no estrato córneo foi estatisticamente semelhante ($P > 0,05$) para o gel e para a microemulsão.

Figura 32 - Quantidade de LAP por centímetro quadrado retida no estrato córneo (EC) *in vivo*, após 2 h de absorção após a aplicação das três formulações.



Esse comportamento pode ser atribuído, como já discutido, ao caráter de reservatório algumas vezes adotado pelas microemulsões se caracterizando por uma difusão mais lenta (GARTI; ASERIN, 1996; TABOSA, 2014). Esses resultados corroboram ainda para a retenção no estrato córneo no estudo *in vitro* após 2h de absorção, obtendo o mesmo padrão observado.

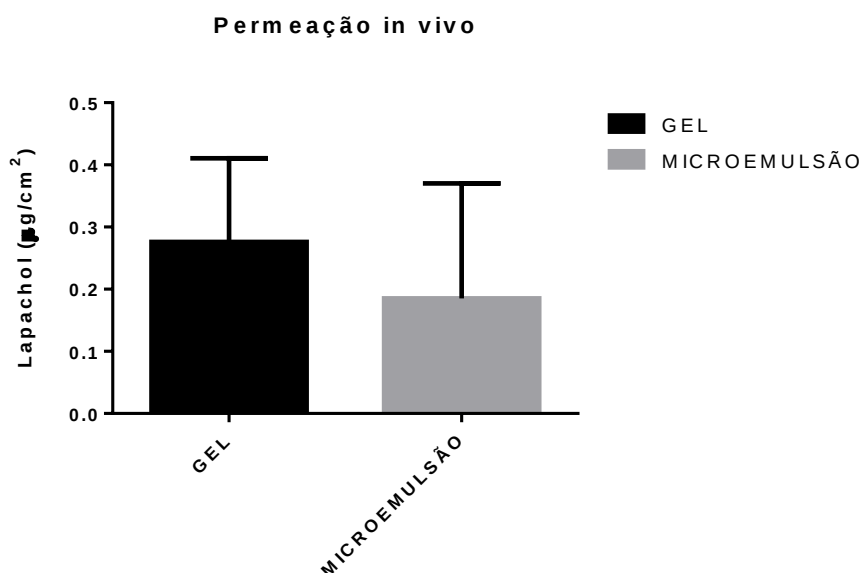
Tabela 16 – Média, DP e CV% para a quantidade de fármaco por centímetro quadrado no EC após 2h e 6 h de absorção após a aplicação das formulações contendo LAP 0,5% (n = 14) em humanos.

	Quantidade retida de fármaco (µg/cm ²) no estrato córneo (EC)					
	2H			6H		
	Média (µg/cm ²)	DP	CV (%)	Média (µg/cm ²)	DP	CV (%)
GEL	0,36	0,15	41,6	0,27	0,13	48,1
MICROEMULSÃO	0,29	0,21	72,4	0,18	0,13	72,2

Quando passamos a avaliar a retenção no EC após 6h de absorção (Figura 33), o mesmo comportamento tido em 2h de absorção é verificado. Novamente, uma menor quantidade de lapachol ficou, visualmente, acumulada no EC na microemulsão quando comparado à formulação gelificada (Tabela 16). Entretanto, após tratamento estatístico

(ANOVA), foi observado que a quantidade de lapachol retida no estrato córneo foi estatisticamente semelhante ($P>0,05$) para o gel e para a microemulsão.

Figura 33 - Quantidade de LAP por centímetro quadrado retida no estrato córneo *in vivo* após 6 h de absorção após a aplicação das três formulações.



Esse comportamento difere do que foi encontrado para a retenção no EC no estudo *in vitro* realizado em 6h de absorção onde foi verificado maior acúmulo para o gel quando comparado à microemulsão refletindo em uma diferença significativa estatisticamente ($P<0,05$) que não foi observada no estudo *in vivo*.

Essa diferença pode ter se tornado inexpressiva no estudo *in vivo* como resultado das interações dos veículos, do fármaco ou das formulações com a pele humana visto que agora se trata de um sistema vivo com fluxo periférico, vascularização, fator de hidratação, processos de metabolização envolvidos, dentre outros e sem contar na diferença interindividual atrelada a esse tipo de estudo.

Quando as quantidades retidas no EC para ambas as formulações *in vivo* são comparadas entre 2h e 6h, é visto através dos gráficos que a quantidade retida no EC após 6 h é aparentemente menor do que a encontrada em 2h de absorção (Tabela 16). Embora comparando-as não haja diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) para ambas as formulações, essa diminuição aparente da quantidade retida no EC de 2h para 6h pode ser explicada pela difusão, ao longo do tempo, do fármaco presente no EC para a

epiderme/derme. Esse fato corrobora com os achados do estudo *in vitro* quando se avaliou a quantidade retida no EC em 2h e 6h e a mesma diminuição, não significativa, foi vista.

Através da análise dos dados de retenção no EC dos estudos *in vitro* e *in vivo*, visualmente, pode se verificar que menores quantidades do fármaco são encontradas na avaliação em humanos quando comparados à pele suína proveniente do dorso. A discussão acima sobre a pele como sistema vivo também poderia vir a fundamentar esses achados, assim como também se sabe da maior permeabilidade da pele animal quando comparada a pele humana (HENNING; SCHAEFER; NEUMANN, 2009).

Trazendo novamente a discussão para as comparações entre os estudos de absorção realizados na pele humana e suína e tentando-se estabelecer algum tipo de correlação *in vitro/in vivo*, foi feita a análise estatística através da análise de variância (ANOVA) e o teste t-student como forma de comparar e avaliar as quantidades do fármaco retidas no EC para as formulações nos tempos de absorção de 2h e 6h nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Observou-se a mesma tendência nos dados encontrados entre os estudos no que se diz respeito ao comportamento das formulações e comparando-se as quantidades retidas no EC das formulações entre os dois estudos, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os estudos *in vitro* e os estudos *in vivo* para cada formulação em ambos tempos de absorção avaliados sugerindo uma grande possibilidade de correlação dos dados.

No que se diz respeito à tolerabilidade do estudo, observou-se ao final do estudo que todos os voluntários apresentaram vermelhidão nos locais do tempo de absorção após o procedimento de tape stripping e em todos esses locais ocorreu o aparecimento de uma área levemente escurecida que levou cerca de 10 dias para retornar à sua pigmentação normal.

Exceto a questão discutida acima, não foi verificado nenhuma alteração ou intercorrência importante durante e após o estudo que pudesse levar qualquer tipo de desconforto ou prejuízo ao bem estar dos voluntários utilizados nessa pesquisa.

5.3 MÉTODOS ALTERNATIVOS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE

Como já foi discutido, desde a década de 40 os medicamentos e produtos de uso dermatológico vem sendo avaliados quanto ao seu potencial irritante através de estudos em animais. Tendo como base o princípio dos 3R's, vários esforços foram postos na busca por metodologias alternativas que viessem a substituir, reduzir ou refinar o uso desses testes, que tem os testes de Draize como principal representante, e dessa forma reduzir o sofrimento dos

animais para fins de pesquisa. Diante disso várias metodologias vem sendo propostas, avaliadas e por fim validadas por várias órgãos reguladores de caráter nacional e principalmente internacional. Como ainda não foi proposto um único método alternativo capaz de substituir unicamente os testes de irritação atualmente empregados, metodologias alternativas são associadas a fim de garantir a elucidação do potencial irritante de forma mais ampla possível. Os ensaios de HET-CAM, CAM-TBS e o BCOP têm sido utilizados durante muitos anos pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas para avaliar o potencial de irritação ocular, porque são testes rápidos, confiáveis, baratos e não requerem o uso de animais vivos (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944; DRAIZE, 1959; RUSSELL; BURCH, 1959; DONAHUE et al., 2011; SCHEEL et al., 2011; SOUSA, 2017).

De acordo com as metodologias descritas para o teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP), em membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) e sua variação (CAM-TBS), foram usadas diferentes tipos de formas farmacêuticas: microemulsão, gel e termogel, contendo o Metronidazol, bem como as formulações não contendo o fármaco, para avaliação do potencial irritante. As formulações contendo lapachol analisadas pelo estudo, bem como seus respectivos placebos, também foram avaliadas quanto ao potencial irritante através das metodologias do BCOP e do HET-CAM. Como controles negativo e positivo, para ambos os testes, foram utilizadas solução fisiológica de NaCl a 0,9% e solução de NaOH 0,1N respectivamente.

5.3.1 Teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP – OECD TG 437)

Tem-se o BCOP como um método alternativo *in vitro* validado para o teste de irritação ocular de Draize usualmente utilizado para detectar irritantes oculares corrosivos e graves. Nesse teste, a opacidade é determinada pela quantidade de transmissão de luz através da córnea e a permeabilidade é determinada pela quantidade do corante fluoresceína de sódio que passa através de todas as camadas de células da córnea. Através do cálculo do índice de irritação *in vitro* (IVIS) torna-se possível a predição do potencial de irritação ocular *in vivo* de uma substância teste (DONAHUE et al., 2011; VERSTRAELEN et al., 2013; SOUSA, 2017).

Neste estudo foram avaliadas formulações contendo o fármaco, bem como formulações placebo. Além de também serem utilizados os controles positivo e negativo já mencionados. De acordo com a metodologia utilizada, De acordo com a metodologia utilizada, foi possível pontuar e classificar as formulações como “categoria 1”, no caso de

causarem danos graves; como “sem categoria”, sendo aqueles que não causam irritação e as formulações “não determinadas”, visto que o BCOP é mais preditivo para substâncias com forte potencial irritante. Portanto, as substâncias classificadas como não determinadas, devem ser avaliadas por metodologias mais adequadas. A Tabela 17 a seguir apresenta os resultados obtidos do teste BCOP (média $\pm$ D.P.) para as formulações contendo metronidazol.

Tabela 17 - Média e DP da pontuação obtida no teste de opacidade e permeabilidade córnea (BCOP) utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo MTZ 0,75% ou não (placebo) (n = 6).

FORMULAÇÃO	PONTUAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO FINAL
Termogel Placebo	13,5$\pm$7,5	Não determinado
Termogel Metronidazol	16,5$\pm$5,5	Não determinado
Microemulsão Placebo	18,1$\pm$8	Não determinado
Microemulsão Metronidazol	17,9$\pm$7,2	Não determinado
Gel Placebo	16,3$\pm$4,2	Não determinado
Gel Metronidazol	18,25$\pm$5,6	Não determinado
NaOH 0,1 N	209,7$\pm$23,5	Categoria 1
NaCl 0,9%	0	Sem categoria

As soluções controle analisadas apresentaram resultado esperado, já que a solução de NaOH 0,1N é utilizada como controle positivo, a mesma apresentou o valor mais elevado de pontuação e foi classificada como categoria 1, ou seja, capaz de causar danos graves e irreversíveis à córnea. Da mesma forma o contrário já era esperado, tendo em vista que a solução fisiológica de NaCl a 0,9% é utilizada como controle negativo, não pontuando, e portanto, incapaz de causar irritação.

O termogel foi classificado como “não determinado” nas formulações com e sem o metronidazol. Mesmo com ligeiro aumento da pontuação após adição do fármaco, não houve mudança na classificação final, mostrando que esse produto, classificado como não determinado, pode ser enquadrado na categoria 2 do Sistema Harmonizado Globalmente das

Nações Unidas, devendo ser realizado outros testes capazes de avaliar substâncias com baixo potencial irritante.

O mesmo ocorreu com as formulações microemulsionadas e gelificadas, que foram classificadas como não determinadas por esta metodologia, e a presença do fármaco não alterou o potencial irritante. Analisando-se apenas as pontuações das formulações placebo, o que basicamente avaliaria o potencial irritante baseado na composição das formulações é possível observar que a maior pontuação foi alcançada pela microemulsão o que é de certa forma esperado visto que possivelmente seria atribuído ao elevado teor de tensoativos e conteúdo oleoso presentes nesse tipo de formulação.

No entanto, Segundo Sousa (2017), o óleo de catolé utilizado no desenvolvimento da microemulsão desse estudo foi analisado separadamente e classificado como não determinado o que corrobora os resultados encontrados para a microemulsão.

É possível verificar então que, nesse caso, independente do tipo de formulação, todas as formulações apresentaram pontuações próximas e foram classificadas como não determinadas, mostrando que não apresentam potencial de causar graves danos à córnea. Para todas as formas farmacêuticas a classificação como não determinada se manteve para as formulações com e sem o fármaco, evidenciando que a presença do fármaco não alterou o potencial irritante das formulações (Tabela 17).

As formulações do tipo gel e do tipo microemulsão foram classificadas como “não determinado” nas formulações com e sem o lapachol. Mesmo com ligeiro aumento da pontuação após adição do fármaco, que pode ser devido aos valores de pH das formulações contendo o fármaco que se encontram levemente mais alcalinos em relação aos respectivos placebos entretanto não havendo mudança na classificação final, mostrando que esses produtos também podem ser enquadrados na categoria 2 do Sistema Harmonizado Globalmente das Nações Unidas, devendo ser realizado outros testes capazes de avaliar substâncias que não apresentem potencial irritante grave.

Analisando-se as pontuações das formulações e visto que o fármaco por si só não confere aumento do potencial irritante das formulações testadas, a composição das mesmas emerge como ponto chave na discussão das pontuações das formulações. É possível observar que as pontuações obtidas foram maiores que as obtidas para as formulações de MTZ e isso se deve provavelmente à presença de determinados componentes nesses produtos. Além do conteúdo de tensoativos e oleoso na ME de LAP ser maior do que na ME de MTZ, a mesma utiliza ácido oleico na sua composição que confere maior caráter ácido à formulação

refletidos nos valores de pH mais baixos. No que se diz respeito ao gel, o mesmo contém elevada quantidade de etanol que apresenta potencial irritante conhecido.

Assim como para as formulações contendo MTZ, observa-se que independente do tipo de formulação (gel ou microemulsão) contendo LAP, todas as formulações apresentaram pontuações próximas e foram classificadas como não determinadas. Novamente isso nos mostra que as mesmas não apresentam potencial de causar graves danos à córnea e como a classificação como não determinada se manteve para as formulações com e sem o fármaco, evidencia-se que a presença do fármaco não alterou o potencial irritante das formulações (Tabela 18).

Tabela 18 - Média e DP da pontuação obtida no teste de opacidade e permeabilidade córnea (BCOP) utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo LAP 0,5% ou não (placebo) (n = 6).

FORMULAÇÃO	PONTUAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO FINAL
Gel Placebo	36,70 ± 7,2	Não determinado
Gel Lapachol	41,20 ± 6,8	Não determinado
Microemulsão Placebo	49,3±7,5	Não determinado
Microemulsão Lapachol	51,5±6,9	Não determinado
NaOH 0,1 N	309,5±21,6	Categoria 1
NaCl 0,9%	0	Sem categoria

Considerando a informação de que os produtos não irritantes aos olhos geralmente possuem valores de pH no intervalo de 4,3 a 8,4, foi possível verificar que o pH dos géis, termogéis e das microemulsões apresentaram-se dentro da faixa mencionada, corroborando com o que é citado na literatura (WORTH; CRONIN, 2001).

Este ensaio possui caráter quantitativo, diferentemente do HET-CAM, onde são obtidos valores objetivos de opacidade e de permeabilidade. Não houve limitação técnica com as formulações testadas, o método mostrou poder de distinção dos diferentes tipos de classificação quanto ao potencial irritante como também se mostrou reprodutível e de fácil execução.

5.3.2 Teste de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM)

O teste HET-CAM é utilizado para fornecer informações qualitativas sobre os efeitos potenciais que ocorrem na conjuntiva após exposição a uma determinada substância ou produto e através da observação dos fenômenos de hiperemia, hemorragia e coagulação na em seus tempos de aparição CAM, pode refletir o potencial dano na córnea. O ensaio foi realizado para cada uma das formulações descritas seja contendo metronidazol ou lapachol e novamente para os controles negativo e positivo a fim de investigar melhor as formulações já que a todas foram classificadas como não determinado pelo BCOP. De acordo com a metodologia do experimento as formulações poderiam ser classificadas em não irritante; irritante leve; irritante moderado e irritante severo.

Pelos resultados obtidos das médias das sextuplicatas no ensaio HET-CAM, foi possível classificar cada amostra de acordo com a metodologia especificada. Os resultados dessa classificação, assim como os valores médios e os desvios padrões obtidos, estão demonstrados nas tabelas 19 e 20 para as formulações contendo MTZ 0,75% e LAP 0,5%, respectivamente.

Tabela 19 - Média e DP da pontuação obtida através do teste HET-CAM utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo MTZ 0,75% ou não (placebo) (n = 6).

FORMULAÇÃO	MÉDIA	CLASSIFICAÇÃO
Gel Placebo	0,5±0,57	Não irritante
Gel MTZ 0,75%	0,4±0,54	Não irritante
Termogel Placebo	0,5±0,57	Não irritante
Termogel MTZ 0,75%	0,66±1,21	Não irritante
Microemulsão Placebo	1,0±0,0	Irritante Leve
Microemulsão MTZ 0,75%	3,0±0,0	Irritante Leve
Solução NaOH 0,1M	11,0±1,41	Irritante Severo

Em todas as formulações testadas no ensaio é possível observar que a classificação de irritabilidade não é modificada quando comparamos a mesma formulação na presença ou

ausência do fármaco. Mediante esse resultado, observamos que as presenças dos fármacos metronidazol e do lapachol por si só não gera potencial de irritabilidade nas formulações testadas.

Para o metronidazol (Tabela 19), as formulações de gel e termogel e seus respectivos placebos foram classificadas como não irritante. Apenas a microemulsão obteve resultado de classificação como irritante leve, com e sem o fármaco, logo, esse resultado não pode ser atribuído à presença do Metronidazol excluindo a possibilidade de potencial irritante atrelado ao fármaco, mas sim aos constituintes da própria formulação da microemulsão ressaltando novamente o fato de que essas formulações apresentam alto percentual de tensoativos como já discutido para o BCOP. Os resultados encontrados no teste HET-CAM para as formulações contendo MTZ corroboram ainda com os achados encontrados no teste de opacidade e permeabilidade da córnea bovina (BCOP).

Para o lapachol (Tabela 20), tanto as formulações do tipo gel quanto as do tipo microemulsão foram classificadas como irritante moderado com e sem o fármaco, logo, esse resultado também não se aplica a presença do fármaco e não pode ser atribuído ao lapachol.

Tabela 20 - Média e DP da pontuação obtida através do teste HET-CAM utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo LAP 0,5% ou não (placebo) (n = 6).

FORMULAÇÃO	MÉDIA	CLASSIFICAÇÃO
Gel Placebo	5,0±0,0	Irritante Moderado
Gel LAP 0,5%	7,3±4,04	Irritante Moderado
Microemulsão Placebo	5,0±0,0	Irritante Moderado
Microemulsão LAP 0,5%	7,3±4,04	Irritante Moderado
Solução NaOH 0,1M	15,0±3,15	Irritante Severo

As microemulsões, como já discutido, apresentam elevado teor de tensoativos, que tem a função de desorganizar a função barreira do estrato córneo, e essa capacidade quando em contato com a conjuntiva possivelmente poderia gerar desconforto e esse potencial irritante encontrado.

Avaliando-se mais a fundo, o que difere as microemulsões contendo MTZ quando comparada as contendo LAP, com exceção do fármaco, é basicamente o menor percentual

relativo de Tween 20® e a presença de elevado conteúdo de Cremophor® e maior conteúdo oleoso (ácido oleico) nas MEs contendo LAP. Sugestivamente, a diferença no resultado de potencial irritante obtido entre as MEs (contendo MTZ e LAP) poderia ser atribuída a presença desses componentes, seja o tensoativo utilizado ou o uso de um óleo de caráter mais ácido. Em adição, muito provavelmente o menor pH no caso do ácido oleico quando comparado ao óleo de catolé o que é comprovadamente refletido nos valores de pH encontrados nesse estudo sendo muito mais baixos para as MEs contendo lapachol.

Ainda no que se diz respeito ao lapachol, o potencial irritante moderado encontrado também para a formulação do tipo gel contendo o fármaco e seu placebo se inclina à composição dos componentes utilizados. Mais sugestivamente a presença de elevado teor de etanol na formulação que conhecidamente apresenta potencial de irritação ocular moderado na maioria dos estudos de opacidade e permeabilidade córnea (BCOP) encontrados na literatura, corroborando com os resultados encontrados pelo estudo (MUIR, 1985; GRANT, 1986; GAUTHERON et al., 1992; COOPER et al., 2001).

Todas as formulações (contendo MTZ e LAP) apresentaram pH compatível com o intervalo ligado aos produtos não irritantes aos olhos (4,3 e 8,4). Algumas formulações classificadas como não irritantes apresentaram valores de pH abaixo ou acima dos limiares inferior e superior, respectivamente, dos limites de pH lacrimal (6,6 - 7,8), o que nos leva a crer que embora o pH seja um fator importante, nesse caso o principal fator envolvido e determinante nas variações entre as formulações quanto ao potencial irritante são atribuídos a composição das mesmas.

Os controles apresentaram resultados esperados, corroborando com a eficiência e reprodutibilidade do método mostrando-se aceitável na avaliação da irritabilidade, onde a aplicação de solução salina a 0,9% de NaCl como controle negativo nas membranas saudáveis não produziu resposta visual ao longo dos cinco minutos sendo classificado como não irritante. Em contraste, a solução de NaOH 1N utilizada como controle positivo produziu pontos hemorrágicos, além da hiperemia dos vasos sanguíneos, que aumentou ao longo do tempo de análise, sendo classificada como um irritante grave todas as vezes em que foram testados.

Ambos os testes estão relacionados à irritação ocular, que pode estar associada à aplicação de substâncias na face próximo à mucosa ocular. Sabendo-se que se uma formulação não apresentar potencial irritante ao nível ocular muito dificilmente o fará na pele, sugere-se que as formulações investigadas sejam seguras para aplicação dérmica, já que

nenhuma apresentou risco ocular grave. Mesmo que haja possibilidade ou risco de exposição ocular, as formulações contendo MTZ são consideradas seguras por não apresentarem potencial irritante significativo. Entretanto, se esse risco existir relacionado às formulações contendo lapachol é necessário se ter cautela visto que as mesmas apresentaram potencial irritante moderado.

5.3.3 Teste de membrana corioalantóide associado ao azul de trypan (CAM-TBS)

Estudos anteriores mostram grande especificidade dos testes de membrana corioalantóide, especialmente o HET-CAM, para substâncias ou produtos com baixo ou nenhum potencial irritante. O HET-CAM apresenta uma predição correta de mais de 95% para substâncias não irritantes ou ligeiramente irritantes, e menor previsibilidade para irritantes ou irritantes graves *in vivo* (SCHEEL et al., 2011).

Tabela 21 - Média e DP da pontuação obtida através do teste CAM-TBS utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo MTZ 0,75% ou não (placebo) (n = 6).

FORMULAÇÃO	MÉDIA	CLASSIFICAÇÃO
Gel Placebo	3,65±2,79	Não Irritante/ Irritante Leve (NI)
Gel MTZ 0,75%	2,08±1,59	Não Irritante/ Irritante Leve (NI)
Termogel Placebo	2,99±2,99	Não Irritante/ Irritante Leve (NI)
Termogel MTZ 0,75%	1,53±1,66	Não Irritante/ Irritante Leve (NI)
Microemulsão Placebo	1,48±0,31	Não Irritante/ Irritante Leve (NI)
Microemulsão MTZ 0,75%	0,94±0,65	Não Irritante/ Irritante Leve (NI)
Solução NaOH 0,1M	11,76±3,29	Irritante Moderado (IM)

O teste CAM-TBS adiciona valor ao teste HET-CAM clássico, incorporando uma leitura quantitativa, obtida pela medição da quantidade de azul de trypan absorvida pelas células da CAM expostas ao produto teste (LAGARTO et al., 2006). A fim de se avaliar a

relação entre os dois métodos as formulações contendo MTZ (Tabela 21) e LAP (Tabela 22) também foram investigadas através do CAM-TBS.

É possível avaliar através da tabela acima que as todas as formulações, como já esperado, foram classificadas como não irritantes/irritante leve, não sendo observadas discrepâncias entre os valores encontrados. A adição do fármaco não acrescentou potencial irritante às formulações já que todas mantiveram a mesma classificação sendo a de mais baixa graduação de irritação de acordo com Lagarto (2006).

Seguindo o mesmo critério de classificação, através da tabela 22 visualiza-se que as formulações contendo lapachol analisadas pelo estudo também foram classificadas como não irritantes/irritante leve assim como as formulações de metronidazol. A adição do fármaco novamente não acrescentou potencial irritante às formulações e ao contrário do que foi observado no HET-CAM, essas formulações se enquadraram no menor nível de graduação de irritação estabelecida pelo autor.

Tabela 22 - Média e DP da pontuação obtida através do teste CAM-TBS utilizada na classificação das diferentes formulações analisadas contendo LAP 0,5% ou não (placebo) (n = 6).

FORMULAÇÃO	MÉDIA	CLASSIFICAÇÃO
Gel Placebo	5,0±0,77	Não Irritante/ Irritante Leve (NI)
Gel LAP 0,5%	5,9±1,93	Não Irritante/ Irritante Leve (NI)
Microemulsão Placebo	4,21±0,76	Não Irritante/ Irritante Leve (NI)
Microemulsão LAP 0,5%	3,90±1,31	Não Irritante/ Irritante Leve (NI)
Solução NaOH 0,1M	11,76±3,29	Irritante Moderado (IM)

A coesão entre os resultados obtidos pelo HET-CAM e pelo CAM-TBS foi de modo geral observada visto que ambas as metodologias investigam a membrana corioalantóide. Essa correlação reflete que a metodologia quantitativa corrobora, na maioria das vezes, com a metodologia de avaliação qualitativa, comprovando ainda que houve reprodutibilidade da técnica, acuidade visual na observação dos fenômenos na CAM e, consequentemente a veracidade dos dados encontrados para as formulações testadas no que consiste ao seu potencial irritante.

No entanto, pode se dizer que essa técnica apresentou maior capacidade de predição e aparentou ser mais sensível que o HET-CAM visto que os produtos com LAP foram graduados com menor grau de irritação através da mesma. E por se tratar então de uma metodologia quantitativa, traz maior confiança aos resultados e essa característica se reflete também nos dados encontrados na literatura (HAGINO et al., 1991; SCHEEL et al., 2011; YANG et al., 2010).

Do mesmo modo, estudos ainda demonstram boa correlação com os dados de irritação ocular *in vivo* (HAGINO et al., 1991; HAGINO et al., 1993; LAGARTO et al., 2006) o que reflete a importância da possibilidade de utilização dessas técnicas na avaliação do potencial irritante ocular de diferentes produtos dermatológicos inserindo-se no atual cenário nacional e internacional de implementação, desenvolvimento e validação dos métodos alternativos ao uso de animais em experimentação.

6 CONCLUSÃO

Foi possível desenvolver uma microemulsão contendo MTZ 0,75% a partir de estudo de regiões de microemulsão em diagrama de fases pseudoternário já desenvolvido e obtido da literatura, assim como o restante das formulações investigadas pelo estudo que foram provenientes de trabalhos promissores realizados pelo NUDFAC.

Os estudos envolvidos na caracterização das formulações permitiram a obtenção de formulações com qualidade aceitável e dentro dos parâmetros de compatibilidade entre os componentes atestando sua viabilidade para administração por via tópica para os diferentes tipos de formulação e diferentes fármacos.

Com relação ao estudo de absorção cutânea *in vitro*, os estudos de liberação e permeação *in vitro* das três formulações contendo MTZ e das duas formulações contendo lapachol foram de grande importância para um melhor entendimento das características de penetração e difusão cutânea de fármacos com características diferentes e pertinentes a cada tipo das diferentes formas farmacêuticas testadas.

A análise dos dados de retenção *in vitro* através da dermatofarmacocinética foi possibilitada pela técnica tape-stripping para os dois fármacos e para os diferentes tipos de formulações. Se mostrou portanto, de grande valia como ferramenta para melhor avaliação da absorção cutânea e melhor entendimento do perfil de permeação e biodisponibilidade de fármacos de uso tópico com características diferentes e sob pontos de vista diferentes em termos de formulação. Diante disso, essa metodologia se torna grande aliada dos métodos alternativos visto que boa consistência dos dados experimentais foi encontrada através da pequena variabilidade e reprodutibilidade, utilizando modelos *in vitro* sem participação de animais para finalidade de pesquisa. Demonstrando assim a capacidade das formulações em liberar o fármaco tornando-o disponível nas camadas mais superficiais da pele, fato esse de grande importância, visto que estes produtos desempenham função local.

O estudo *in vivo* do lapachol foi bem tolerado e segue, de maneira geral, a mesma tendência observada nos estudos *in vitro*. Informações importantes foram extraídas sobre o comportamento do fármaco sendo possível sugerir uma boa correlação *in vitro/in vivo*, favorecendo o processo de consolidação da utilização da DPK como técnica para avaliação de produtos tópicos.

A investigação da aplicabilidade dos métodos alternativos no que se diz respeito ao potencial irritante dérmico foi conseguida através da classificação das formulações avaliadas

quanto ao grau de irritabilidade ocular visto que a sensibilidade da conjuntiva ocular é muito superior que ao nível dérmico. As formulações não apresentaram alteração do resultado na presença do metronidazol e do lapachol e são seguras para aplicação dérmica devendo-se ter cautela se houver risco de exposição a nível ocular.

O método de BCOP se mostra como importante estratégia de triagem para eliminação de substâncias ou formulações com potencial de causar danos graves a mucosa ocular. Já as técnicas de HET-CAM e CAM-TBS se mostram como importantes alternativas na obtenção de maior riqueza de detalhes principalmente para as formulações que não apresentam irritabilidade considerável. Esse último também se mostrou de extrema aplicabilidade nesse na predição da irritabilidade, pois além de reprodutibilidade e simplicidade, os resultados possuem natureza objetiva e quantitativa sendo observado correlação entre os resultados obtidos com o HET-CAM e ambos com relação aos estudos *in vivo* de acordo com a literatura, evitando quaisquer suspeitas relacionada a subjetividade do HET-CAM.

As diferentes técnicas associadas trazem benefícios importantes na avaliação da segurança das formulações tópicas para aplicação dérmica, já que são técnicas simples e de fácil execução, reprodutíveis, apresentam resultados rápidos e permitem a diferenciação do grau de irritabilidade de formulações não convencionais contendo fármacos com características diferentes. Sendo aplicáveis nas discussões acerca dos constituintes das formulações como ponto chave na discussão dos resultados obtidos.

Todos os métodos alternativos demonstraram, portanto, reprodutibilidade e eficiência na avaliação da segurança das formulações e podem ser de notória utilidade na avaliação das características de absorção cutânea e potencial irritante de novos sistemas. Todos os dados apresentados pelo estudo reforçam ainda o papel do NUDFAC, como um dos laboratórios associados a RENAMA, na consolidação dos métodos alternativos como técnicas viáveis e aplicáveis na substituição e redução do uso de animais de laboratório em pesquisa. Fatos esses de grande importância no atual cenário nacional e internacional de implementação e principalmente de validação dos métodos alternativos.

Dado a maior importância ao cunho ético das metodologias alternativas, essas técnicas representam uma ferramenta útil para alcançar os objetivos do princípio dos 3Rs (Refinar, Reduzir, substituir) na avaliação de produtos tópicos. Por fim, foi possível obter grande variedade de dados sobre a segurança de diferentes tipos de formulações dermatológicas a base de metronidazol e lapachol sem a utilização de animais de laboratório.

REFERÊNCIAS

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D. J.; LAWRENCE, M. J. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions: II. Photon correlation spectroscopy. **Aaps Pharmsci**, v. 2, n. 3, p. 1-10, 2000.

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**. 2008.

ADRIAENS, E. et al. Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods. **Archives of toxicology**, v. 88, n. 3, p. 701-723, 2014.

ALEXANDER, A. et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **Journal of Controlled 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.

ALLEN, J. R. et al. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos-9**. Artmed Editora, 2013.

ALMEIDA, E. R. et al. Antiinflammatory action of Lapachol. **Journal of Ethnopharmacology**, n.29, p. 239-241, 1990.

ALMEIDA, E. R. et al. The action of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)1,4-napthoquinone (Lapachol) in pregnant rats. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 38, n. 3, p. 21-23, 1988.

ANSEL, H. C. et al. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8a ed. São Paulo: Premier, 775p., 2007.

ANTONIO, M. E. C. O. **Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas**. 2007, 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2017.

ARAÚJO, E. C. et al. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública de saúde em João Pessoa (PB). **Espaço. saúde (Online)**, v. 8, n. 2, p. 44-52, 2007.

ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 57-59, 2002.

ARAUJO, T. P. **Bioequivalência tópica de produtos contendo metronidazol através da dermatofarmacocinética (DPK)**. 2016. 96 f. Dissertação (mestrado em ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016.

ARAUJO, T. P. et al. Topical bio (in) equivalence of metronidazole formulations in vivo. **International journal of pharmaceutics**, v. 541, n. 1-2, p. 167-172, 2018.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed, 2 ed., 2006.

AULTON, M. E. **Pré-formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 677 p., 2005.

AU, W. L.; SKINNER, M. F.; KANFER, I. Comparison of tape stripping with the human skin blanching assay for the bioequivalence assessment of topical clobetasol propionate formulations. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 11-20, 2010.

BAKAR, Ö. et al. The effect of azithromycin on reactive oxygen species in rosacea. **Clinical and experimental dermatology**, v. 32, n. 2, p. 197-200, 2007.

BALASSIANO, I. T. et al. Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. **Oncology reports**, v. 13, n. 2, p. 329-333, 2005.

BANK, Hazardous Substances Data. TOXNET: Toxicological Data Network. Disponível em: <<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~7Qh7hk:1>> Acesso em: 20/10/2016.

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. **Actas dermo-sifiliográficas**, v. 99, n. 4, p. 244-256, 2008.

BARRY, B. W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supplement, n. 0, p. S31-S40, 2002.

BARRY, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **J. Controlled Release**, v.6, p. 85-97, 1987.

BECKSTROM-STERMBERG, S. M.; DUKE, J. A. "The Phytochemical Database." ACEDB version 4.3: National Germplasm Resources Laboratory (NGRL), Agricultural Research Service (ARS), U.S. Department of Agriculture. 1994.

BENFELDT, E. et al. Bioequivalence of topical formulations in humans: evaluation by dermal microdialysis sampling and the dermatopharmacokinetic method. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 1, p. 170-178, 2007.

BERRETTA, A. A. **Pesquisa pré-clínica e clínica de um gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF) para a redução do tempo de cicatrização de lesões em pacientes queimados**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2007.

BETTONI, C. C. **Avaliação da penetração cutânea de nanocápsulas de isotretinoína por tape stripping in vitro em pele humana e suína**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre. 2009.

BLANK, I. H. Further observations on factors which influence the water content of the stratum corneum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 21, n. 4, p. 259-271, 1953.

BLOCK, J. B. et al. Early clinical studies with lapachol (NSC-11905). **Cancer chemotherapy reports**. Part 2, v. 4, n. 4, p. 27, 1974.

BOIX-MONTANES, A. 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.

BOLTON, S.; BON, C. **Pharmaceutical statistics: practical and clinical applications**. CRC Press, 2009.

BOLZINGER, M. A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BONNABRY, C. **Mise au point et validation de modeles d'étude in vitro du passage percutané** – Université d'auvergne – UFR de pharmacie, 1999.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supplement, n. 0, p. S41-S55, 2002.

BRADDY, A. C. et al. Survey of international regulatory bioequivalence recommendations for approval of generic topical dermatological drug products. **AAPS J.**17,121–133, 2015.

BRAFF, M. H.; DI NARDO, A.; GALLO, R. L. Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. **Journal of investigative dermatology**, v. 124, n. 2, p. 394-400, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1. ed. Brasília: Anvisa; 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003**.

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. **Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009**. Diário Oficial da União. 16 de Julho de 2009.

BRASIL. **Lei No 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Diário Oficial da União, 9 outubro de 2008.

BRINON, L. et al. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **Journal of controlled release**, v. 60, n. 1, p. 67-76, 1999.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química nova**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 35, n. 9 (2012), p. 1827-1840, 2012.

BUHL, T. et al. Molecular and morphological characterization of inflammatory infiltrate in rosacea reveals activation of Th1/Th17 pathways. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 9, p. 2198-2208, 2015.

BUTANI, D.; YEWALE, C.; MISRA, A. Amphotericin B topical microemulsion: Formulation, characterization and evaluation. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 116: 351– 358, 2014.

BUTANI, D.; YEWALE, C.; MISRA, A. Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 139: 17–24, 2016.

CABANA, A.; AÏT-KADI, A.; JUHÁSZ, J. Study of the gelation process of polyethylene oxide a–polypropylene oxide b–polyethylene oxide a copolymer (Poloxamer 407) aqueous solutions. **Journal of colloid and interface science**, v. 190, n. 2, p. 307-312, 1997.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.

CARNEY, L. G.; FULLARD, R. J. Ocular irritation and environmental pH. **The Australian Journal of Optometry**, v. 62, n. 8, p. 335-336, 1979.

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

CASAS, C. et al. Quantification of Demodex folliculorum by PCR in rosacea and its relationship to skin innate immune activation. **Experimental dermatology**, v. 21, n. 12, p. 906-910, 2012.

CHEN, J. et al. Mechanical, rheological and release behaviors of a poloxamer 407/poloxamer 188/carbopol 940 thermosensitive composite hydrogel. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12415–12425, 2013.

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2005.

CHRISMAN, C. A. Care of chronic wounds in palliative care and end--of--life patients. **International Wound Journal**, v. 7, n. 4, p. 214–235, 2010.

CHRISTOPHERS, E.; KLIGMAN, A. M. Visualization of the cell layers of the stratum corneum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 42, n. 6, p. 407-409, 1964.

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, n. 4, 2007.

CODA, A. B. et al. Cathelicidin, kallikrein 5, and serine protease activity is inhibited during treatment of rosacea with azelaic acid 15% gel. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 4, p. 570-577, 2013.

CONEAC, G. et al. Development and evaluation of new microemulsion-based hydrogel formulations for topical delivery of fluconazole. **Aaps Pharmscitech**, v. 16, n. 4, p. 889-904, 2015.

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.

CORREIA, LCA; SILVA, AAF. Primeiros ensaios utilizando o Lapachol em pacientes portadores de bursite na fase aguda. **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, v. 10, 1988a.

CORREIA, LCA; SILVA, AAF. Primeiros informes na utilização do Lapachol em pacientes portadores de Tendinite. **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, v. 10, 1988b.

CORREIA, LCA; SILVA, AAF. Primeiras observações com o emprego do lapachol em gotas, em pacientes portadoras de otites agudas e crônicas. **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, v. 10, 1988c.

CORREIA, LCA; SILVA, AAF. Primeiras observações utilizando o lapachol em gotas em pacientes portadores de sinusites agudas e crônicas. **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, v. 10, 1988d.

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.

COSTA, R. N. et al. A reassessment of the in vitro total protein content determination (TPC) with SIRC and 3T3 cells for the evaluation of the ocular irritation potential of shampoos: comparison with the in vivo Draize rabbit test. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1135-1146, 2011.

COSTA, W. F. **Avaliação da Atividade Genotóxica do Lapachol e β -lapachona e Anticarcinogênese do Lapachol em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster***. Tese de Doutorado em Genética e Bioquímica, Departamento de Genética, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2012.

COSTA, W. F.; OLIVEIRA, A. B.; NEPOMUCENO, J. C. Lapachol as an epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor gene wts. **Genet Mol Res**, v. 10, n. 4, p. 3236-45, 2011.

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.

CUNHA-FILHO, M. S. S. et al. Light effect on the stability of β -lapachone in solution: pathways and kinetics of degradation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 9, p. 1156-1160, 2011.

CURREN, R. D.; HARBELL, J. W. In vitro alternatives for ocular irritation. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. Suppl 2, p. 485, 1998.

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

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Amphotericin B microemulsion reduces toxicity and maintains the efficacy as an antifungal product. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.8, n.2, p.290-300, 2012.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DA SILVA, M. N. et al. Synthesis of new aldehyde derivatives from β -lapachone and nor- β -lapachone. **Arkivoc**, v. 10, p. 156-168, 2003.

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

DE ALMEIDA, E. R. et al. Antiinflammatory action of lapachol. **Journal of ethnopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 239-241, 1990.

DE MIRANDA, F. G. G. et al. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. **BMC pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 6, 2001.

DIEMBECK, W. et al. Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 191-205, 1999.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M. *In vitro* release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macroglycerides based microemulsions. **Int. J. Pharm.**, v.296, n.1-2, p.73-79, 2005.

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. Appraisal of the safety chemicals in foods, drugs and cosmetics. In: Drugs and cosmetics: dermal toxicity. **Austin: Association of Food and Drug Officials of the United States**, p. 46-59, 1959.

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. **Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 377-390, 1944.

DRESSLER-CARRE, M. Acne vulgaris and rosacea. **Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

DUA, K. et al. Norfloxacin and metronidazole topical formulations for effective treatment of bacterial infections and burn wounds. **Interventional Medicine and Applied Science**, v. 8, n. 2, p. 68-76, 2016.

DUARTE, D. S. et al. Chemical Characterization and Biological Activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 347-352, 2000.

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.

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709- 2728, 2006.

EICHLER, H. G.; MÜLLER, M. Drug distribution. **Clinical pharmacokinetics**, v. 34, n. 2, p. 95-99, 1998.

ELEWSKI, B. E. Percutaneous absorption kinetics of topical metronidazole formulations in vitro in the human cadaver skin model. **Advances in therapy**, v. 24, n. 2, p. 239-246, 2007.

ELIAS, P. M. Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. **Journal of Controlled Release**, v. 15, n. 3, p. 199-208, 1991.

EMAMI, J. et al. In vitro-in vivo correlation: from theory to applications. **J Pharm Pharm Sci**, v. 9, n. 2, p. 169-189, 2006.

EPA, U. S. Code of federal regulations. **Title**, v. 40, p. 319, 1992.

EPIFANO, F. et al. Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review. **Phytochem Rev.**, 2013.

ESCOBAR--CHÁVEZ, J. J. et al. Applications of thermo--reversible pluronic F--127 gels in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 339--358, 2006.

EUN, H. C.; SUH, D. H. Comprehensive outlook of in vitro tests for assessing skin irritancy as alternatives to Draize tests. **Journal of dermatological science**, v. 24, n. 2, p. 77-91, 2000.

EYONG, K. O. et al. Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, n. 20, p. 5387-5390, 2008.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Parte I. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

FELDMAN, S. R.; HUANG, W. W.; HUYNH, T. T. Current Drug Therapies for Rosacea: A Chronic Vascular and Inflammatory Skin Disease. **Journal of Managed Care Pharmacy**, Vol. 20, No. 6 June 2014.

FIRMINO, F. Pacientes Portadores de Feridas Neoplásicas em Serviços de Cuidados Paliativos: contribuições para a elaboração de protocolos de enfermagem de intervenções de enfermagem. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 347--359, 2005.

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.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P. Lapachol-Chemistry, pharmacology and assay methods. **Rev Bras Farm**, v. 84, n. 1, p. 9-16, 2003.

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.

FORMARIZ, T. P. et al. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 51, n. 1, p. 54-61, 2006.

FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

FRANZ, T. J.; LEHMAN, P. A.; RANEY, S. G. Use of excised human skin to assess the bioequivalence of topical products. **Skin pharmacology and physiology**, v. 22, n. 5, p. 276-286, 2009.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **J Invest Dermatology**. v. 64, p. 190-195, 1975.

FRANZEN, L. et al. Towards drug quantification in human skin with confocal Raman microscopy. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 84, n. 2, p. 437-444, 2013.

FRIEND, D. R.; In vitro sink permeation techniques. **Journal of Controlled Release**, 235-248, 1992.

FULLER, D.; MARTIN, S. Rosacea. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 57, n. 04, 2012.

GABBOUN, N. H. et al. Release of salicylic acid, diclofenac acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **International journal of pharmaceutics**, v. 212, n. 1, p. 73-80, 2001.

GARCIA, M. T. J.; MARCHETTI, J. M.; BENTLEY, M. V. L. B. Ketoprofen transdermal delivery from lipid/propylene glycol system: in vitro permeation studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.14, p. S129, 2001.

GARTI, N.; ASERIN, A. Pharmaceutical emulsions, double emulsion and microemulsion. **Drug and the pharmaceutical science**. New York: Marcel Dekker. v.73, cap.15, p.412-519, 1996.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GAUTHERON, P. et al. Bovine corneal opacity and permeability test: an in vitro assay of ocular irritancy. **Toxicological Sciences**, v. 18, n. 3, p. 442-449, 1992.

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.

GLEN, V. L. et al. Quantitation of β -lapachone and 3-hydroxy- β -lapachone in human plasma samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 692, n. 1, p. 181-186, 1997.

GODIN, B., TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 59 1152–1161, 2007.

GOVENDER, T. et al. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n. 2, p. 171-185, 1999.

GRANT, W. M. Toxicology of the eye, **Charles C.Thomas, Springfield, IL**, 1986.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios Básicos e Aplicação da Iontoforese na Penetração Cutânea de Fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

GROLIG, J.; WAGNER, R. Naphthoquinones. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2005.

GUPTA, A. K.; CHAUDHRY, M. M. Rosacea and its management: an overview. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. 3, p. 273-285, 2005.

GUY, R. H., HADGRAFT, J. **Transdermal drug delivery**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2003.

GWAK, H. S.; CHUN, I. K. Effects of vehicles and penetration enhancers on the in vitro percutaneous absorption of tenoxicam through hairless mouse skin. **Int. J. Pharm.**, v.236, p. 57-64, 2002.

HAGINO, S. et al. Further evaluation of the quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of chemicals. **Toxicology in vitro**, v. 7, n. 1, p. 35-39, 1993.

HAGINO, S. et al. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: Modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue. **Toxicology in vitro**, v. 5, n. 4, p. 301-304, 1991.

HALLER, I. In vitro activity of the two principal oxidative metabolites of metronidazole against *Bacteroides fragilis* and related species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 22, n. 1, p. 165-166, 1982.

HAYASHI, T. et al. Hemoglobin denaturation caused by surfactants. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 4, p. 540-543, 1995.

HEILMANN, S. et al. A thermosensitive morphine--containing hydrogel for the treatment of large--scale skin wounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 444, n. 1-2, p. 96-102, 2013.

HELFRICH, Y. R. et al. Clinical, histologic, and molecular analysis of differences between erythematotelangiectatic rosacea and telangiectatic photoaging. **JAMA dermatology**, v. 151, n. 8, p. 825-836, 2015.

HELLEDI, L. S.; SCHUBERT, L. Release kinetics of acyclovir from a suspension of acyclovir incorporated in a cubic phase delivery system. **Drug Devevelopment 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. Dermatopharmacokinetic prediction of topical drug bioavailability in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 4, p. 887-894, 2007.

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.

HIGA, R. A. **Estudo da Ação Antineoplásica do Ipê Roxo na Carcinogênese Induzida pelo Azoximetano em Camundongos**. Dissertação de Mestrado, Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciência da Saúde, UNB-UFG-UFMS, Campo Grande, MS, 2007.

HOU, M. J.; KIM, M.; SHAH, D. O. A light scattering study on the droplet size and interdroplet interaction in microemulsions of AOT—oil—water system. **Journal of colloid and interface science**, v. 123, n. 2, p. 398-412, 1988.

HUSSAIN, H. et al. Lapachol: an overview. **ARKIVOC**, v.1, n.2, p.145-171, 2007.

HYDE, S. T. et al. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. **Handbook of applied surface and colloid chemistry**, v. 2, p. 299-332, 2001.

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:NationalInstituteof 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.

ITAGAKI, H. et al. An in vitro alternative to the draize eye-irritation test: Evaluation of the crystal violet staining method. **Toxicology in vitro**, v. 5, n. 2, p. 139-143, 1991.

JANUÁRIO, S. R.; SILVÉRIO-LOPES, S. O Poder Terapêutico do Ipê Roxo e seu Uso na Terapia Complementar ao Tratamento de Neoplasias. **Revista Brasileira de Terapia e Saúde**, v. 5, n. 1, p. 9-14, 2014.

JARMUDA, S. et al. Correlation between serum reactivity to Demodex-associated Bacillus oleronius proteins, and altered sebum levels and Demodex populations in erythematotelangiectatic rosacea patients. **Journal of medical microbiology**, v. 63, n. 2, p. 258-262, 2014.

JIANG, Y. et al. Modified chitosan thermosensitive hydrogel enables sustained and efficient anti-tumor therapy via intratumoral injection. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 245–253, 2016.

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

JUSTIN-TEMU, M. et al. Intravaginal gels as drug delivery systems. **Journal of Women's Health**, v. 13, n. 7, p. 834-844, 2004.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic?? Block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 2–3, p. 189–212, 2002.

KALWEIT, S. et al. A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test. **Toxicology in Vitro**, v. 4, n. 4-5, p. 702-706, 1990.

KALWEIT, S.; GERNER, I.; SPIELMANN, H. Validation project of alternatives for the Draize eye test. **Molecular toxicology**, v. 1, n. 4, p. 597-603, 1987.

KANFER, I. Strategies for the Bioequivalence Assessment of Topical Dermatological Dosage Forms. **J Bioequiv Availab** 2: 102-110, 2010.

KANTARCI, G. et al. Comparison of different water/oil microemulsion containing diclofenac sodium: preparation, characterization, release rate and skin irritation studies. **AAPS PharmSciTech**. v. 8, n.4. E1-E7, 2007.

KARASULU, H. Y. Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity. **Expert Opin Drug Delivery**, v 5(1), p. 119-135, 2008.

KATO, S. et al. Liposomes as an in vitro model for predicting the eye irritancy of chemicals. **Toxicology in vitro**, v. 2, n. 2, p. 125-130, 1988.

KAWAKAMI, K. et al. Microemulsion formulation forenhanced absorption of poorly soluble drugs.I. Prescription design, **Journal of ControlledRelease**, v.81, n.1/2, p.65-74, 2002.

KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu, 771p., 2003.

KHAN, J. et al. Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. **Journal of Controlled Release**, v.168, n.1, p.50-60, 2013.

KIM, D.; ANDERSEN, M. E.; NYLANDER-FRENCH, L. A. Dermal absorption and penetration of jet fuel components in humans. **Toxicology letters**, v. 165, n. 1, p. 11-21, 2006.

KITTIPONGPITTAYA, K. et al. Effects of environmental pH on antioxidant interactions between rosmarinic acid and α -tocopherol in oil-in-water (O/W) emulsions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 34, p. 6575-6583, 2016.

KLANG, V. et al. In vitro vs. in vivo tape stripping: Validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**; 80: 604–614, 2012.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsion on cutaneous drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v.54, n.1, p.S77-S98, 2002.

KUMAR, M. N. V. R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **J Pharm Pharmaceut Sci**, v. 3, p. 234-258, 2000.

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.

LAGARTO, A. et al. In vitro quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 5, p. 699-702, 2006.

LANDEVIN, D. Microemulsions. **Accounts of Chemical Research**, v. 21, n. 7, p. 255-260, 1988.

LAMP, K. C. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. **Clinical pharmacokinetics**, v. 36, n. 5, p. 353-373, 1999.

LAUDE, T. A.; SALVEMINI, J. N. Perioral dermatitis in children. In: **Seminars in cutaneous medicine and surgery**. No longer published by Elsevier, p. 206-209, 1999.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 175-193, 2012.

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. **Pharmaceutical research**, v. 34, n. 4, p. 730-737, 2017.

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

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

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **An Bras Dermatol**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

LEOPOLD, C. S. Pharmacokinetic analysis of the FDA guidance for industry—‘Topical dermatologic corticosteroids: in vivo bioequivalence’. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 56, n. 1, p. 53-58, 2003.

LIPSKY, B. A.; HOEY, C. **Topical Antimicrobial Therapy for Treating Chronic Wounds**. v. 49, p. 1541–1549, 2009.

LIRA, A. A. M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele**. 2007, 142f. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

LIRA, A. A. M. et al. Development of lapachol topical formulation: anti-inflammatory study of a selected formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 163-168, 2008.

LIRA, A. A. M. et al. Preliminary development of lapachol gel: in vitro permeation study. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p. 35-41, 2004.

LODÉN, M. et al. Bioequivalence determination of topical ketoprofen using a dermatopharmacokinetic approach and excised skin penetration. **International journal of pharmaceutics**, v. 284, n. 1, p. 23-30, 2004.

LOFTSSON, T., ÓLAFSSON, J. H. Cyclodextrins: new drug delivery systems in dermatology, **Int. J. Dermatol.**, Philadelphia, v.37, p.241-246, 1998.

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.

LOPES, C. A. C.; SILVA, A. A. F. **Primeiras observações com o emprego do Lapachol em gotas, em pacientes portadores de otites agudas e crônicas.** Anais do X Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil - São Paulo - Brasil - setembro 1988d.

LOPES, C. A. C.; SILVA, A. A. F. **Primeiras observações utilizando o Lapachol em gotas, em pacientes portadores de sinusite agudas e crônicas.** Anais do X Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil- São Paulo - Brasil - setembro 1988a.

LOPES, C. A. C.; SILVA, A. A. F. **Primeiros ensaios utilizando o Lapachol em pacientes portadores de bursite na fase aguda.** Anais do X Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil - São Paulo - Brasil - setembro 1988b.

LOPES, C. A. C.; SILVA, A. A. F. **Primeiros ensaios utilizando o Lapachol em pacientes portadores de tendinite.** Anais do X Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil - São Paulo - Brasil - setembro 1988c.

LOWE, N. J. Use of topical metronidazole in moderate to severe rosacea. **Advances in therapy**, v. 20, n. 4, p. 177-190, 2003.

LOYD, V.; ALLEN, J. R. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** Editora: ARTMED, Edição, v. 8, 2007.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 495-496, 1986.

LUEPKE, N. P.; WALLAT, S. HET-CAM reproducibility studies. AM Goldberg (Ed.): **Alternative methods in toxicology**. Mary Ann Liebert, Inc., New York, v. 5, p. 353-363, 1987.

LUI, C. Y. et al. Some formulation properties of Lapachol, a potential oncolytic agent of natural origin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 11, n. 9-10, p. 1763-1779, 1985.

MAEDA, M. et al. Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 229, n. 2, p. 232-238, 2008.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; BONTEMPO, E. M. B. G.; LEONARDI, G. R. Formulário dermocosmético. **São Paulo: Tecnopress Editora e Publicidade**, v. 2, p. 37-38, 1999.

MARTÍNEZ-HIDALGO, M. P. Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual. **Acta bioethica**, v. 13, n. 1, p. 41-52, 2007.

MASINI, V. et al. Cutaneous bioavailability on hairless rats of tretinoin in liposomes or gel. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 82, n. 1, p. 17-21, 1993.

MATEUS, R. et al. A new paradigm in dermatopharmacokinetics—confocal Raman spectroscopy. **International journal of pharmaceutics**, v. 444, n. 1, p. 106-108, 2013.

MC EVOY, G. K. Metronidazole. AHFS Drug Information 2001®. **Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, Inc.**, p. 3389- 3395, 2001.

MC CLELLAN, K. J.; NOBLE, S. Topical Metronidazole - A review of its use in rosacea. **Am J Clin Dermatol**, v. 01, n. 03, 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.

MELO, E. K.S. **Desenvolvimento de termogéis de metronidazol e avaliação da permeação cutânea in vitro (Dermatofarmacocinética) e in vivo (Microdiálise)**. 2016. 130p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

MELO, E. K. S. et al. Metronidazole thermogel improves retention and decreases permeation through the skin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 2, 2017.

MENDONÇA, C. R. B.; BICA, C. I. D.; PIATNICKI, C. Water in soybean oil microemulsions as medium for electrochemical measurements. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 4, p. 628-636, 2003.

MENON, G. K; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **International journal of pharmaceutics**, v. 435, n. 1, p. 3-9, 2012.

MICHAELS, A. S.; CHANDRASEKARAN, S. K.; SHAW, J. E. Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. **AIChE Journal**, v. 21, n. 5, p. 985-996, 1975.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tratamento E Controle De Feridas tumorais e úlceras por pressão no câncer avançado. p. 1–46, 2009.

MIRON, D. S. et al. In vitro and in vivo evaluation of three metronidazole topical products. **Pharmaceutical development and technology**, v. 19, n. 2, p. 194–9, 2014.

MITJANS, M.; INFANTE, M. R.; VINARDELL, M. P. Human hemoglobin denaturation as an alternative to the Draize test for predicting eye irritancy of surfactants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 52, n. 2, p. 89-93, 2008.

MOHAMMED, D. et al. In vitro–in vivo correlation in skin permeation. **Pharmaceutical research**, v. 31, n. 2, p. 394-400, 2014.

MOHAMMED, D. et al. Influence of niacinamide containing formulations on the molecular and biophysical properties of the stratum corneum. **International journal of pharmaceutics**, v. 441, n. 1, p. 192-201, 2013.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, 2006.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

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.

MUTO, Y. et al. Mast cells are key mediators of cathelicidin-initiated skin inflammation in rosacea. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 11, p. 2728-2736, 2014.

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.

N'DRI-STEMPFER, B. et al. Optimizing metrics for the assessment of bioequivalence between topical drug products. **Pharmaceutical Research**, 25:1621-1630, 2008.

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. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 2590-2601, 2010.

NICOLI, S. et al. Dermatopharmacokinetics: factors influencing drug clearance from the stratum corneum. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 4, p. 865-871, 2009.

NÓBREGA, A. M. et al. Determination of eye irritation potential of low-irritant products: comparison of in vitro results with the in vivo draize rabbit test. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 3, p. 381-388, 2012.

NORLING, T. et al. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **Journal of clinical periodontology**, v. 19, n. 9, p. 687-692, 1992.

NORWOOD, R.; NORWOOD, D. Treating rosacea. **US Pharmacist**, v 32(9), p. 45–53, 2007.

OECD. **Draft guidance document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for serious eye damage and eye irritation** (Manuscript in Preparation). 2017.

OECD. **Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment**. Number 34. ENV/JM/MONO(2005)14. Paris, France, 2005.

OECD. **Guideline for the testing of chemical, n° 428**. Skin Absorption: in vitro Method, Paris, France, 2004.

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

OECD. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Test Guideline 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. **Organisation for Economic Cooperation and Development**, Paris. Disponível em [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]. 2013.

OLIVEIRA, A. G. L. et al. Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAMTBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 71(1):153-9, 2012.

OLIVEIRA, F. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo***. 2007, 205f. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

OREN, A. et al. In human epidermis, β -defensin 2 is packaged in lamellar bodies. **Experimental and molecular pathology**, v. 74, n. 2, p. 180-182, 2003.

ORTHABER, D.; GLATTER, O. Synthetic phospholipid analogs: a structural investigation with scattering methods. **Chemistry and physics of lipids**, v. 107, n. 2, p. 179-189, 2000.

ORTIZ, P. G. et al. The effect of irritant dermatitis on cutaneous bioavailability of a metronidazole formulation, investigated by microdialysis and dermatopharmacokinetic method. **Contact Dermatitis**, v. 59, n. 1, p. 23-30, 2008.

OSSOWSKI, T. et al. Determination of the pKa values of some biologically active and inactive hydroxyquinones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 1, p. 175-183, 2008.

OZGUNY, I. S. et al. Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from various formulations. **AAPS PharmSciTech**. v. 7, n. 4, p. E1-E7, 2006.

PAREKH, K. **Preparation, Characterization, and *In Vitro* Protein Release Studies in Pharmaceutically relevant Lecithin Microemulsions**. 2011. 162f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), The University of Toledo, Toledo - Espanha.

PARRILHA, G. L. et al. Coordination of lapachol to bismuth (III) improves its anti-inflammatory and anti-angiogenic activities. **BioMetals**, v. 25, n. 1, p. 55-62, 2012.

PATERNÓ, E. Ricerche sull'acido lapacico. **Gazz. Chim. Ital.**, v. 12, p. 337-392, 1882.

PATTON, T. F.; ROBINSON, J. R. Ocular evaluation of polyvinyl alcohol vehicle in rabbits. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 64, n. 8, p. 1312-1316, 1975.

PELLANDA, C. S. **Topical bioavailability of glucocorticosteroids: Dermatopharmacokinetic and dermatopharmacodynamic of topically applied triamcinolone acetonide in humans**. 2006. 192 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Naturais, Universidade de Basel, Basel, 2006.

PELLE, M. T.; CRAWFORD, G. H.; JAMES, W. D. Rosacea: II Therapy. **J Am Acad Dermatol**, v. 51, p. 499–514, 2004.

PENDLAND, S. L. et al. In vitro activities of metronidazole and its hydroxy metabolite against *Bacteroides* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, n. 9, p. 2106-2110, 1994.

PEREIRA, G. G. et al. Formulation and characterization of poloxamer 407 ® : Thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Quimica Nova**, v. 36, n. 8, p. 1121–1125, 2013.

PERSHING, L. K. et al. Assessment of dermatopharmacokinetic approach in the bioequivalence determination of topical tretinoin gel products. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 5, p. 740-751, 2003.

PERSHING, L. K. et al. Comparison of skin stripping, in vitro release, and skin blanching response methods to measure dose response and similarity of triamcinolone acetonide cream strengths from two manufactured sources*. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 91, n. 5, p. 1312-1323, 2002.

PHILLIPS, J. N. The energetics of micelle formation. **Transactions of the Faraday Society**, v.51, p.561-569, 1955.

POWELL, F. C. Rosacea. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 8, p. 793-803, 2005.

PRAÇA, F. S. G. **Liberação e permeação in vitro d produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais**. 2010. 84f. Tese (doutorado em ciências farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2010.

PRINSEN, M. K. The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage?. **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 1, p. 78-81, 2006.

RAGHALLAIGH, S. N.; POWELL, F. C. Rosacea. In: **European Handbook of Dermatological Treatments**. Springer Berlin Heidelberg, p. 835-843, 2015.

REGULATION, E. C. No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation

(EC) No 1907/2006. **EC, and amending Regulation (E. Luxembourg: Official Journal of the European Union**, 31 December 2008, L353, 2008.

REINHARDT, V. Taking better care of monkeys and apes. **Animal Welfare Institute**, 2008.

REINHOLZ, M. et al. Rosacea–S1 guideline. JDDG: **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 11, n. 8, p. 768-780, 2013.

RICCI, E. J. et al. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 161–167, 2002.

ROLAND, I. et al. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International journal of pharmaceutics**, v. 263, n. 1-2, p. 85-94, 2003.

ROSSETI, F. C. **Microemulsões como sistemas de liberação cutânea para zinco ftalocianina tetrasulfonada na terapia fotodinâmica do câncer de pele. 2006. 104f.** 2006. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP. 2016.

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

ROUGIER, A. et al. Stripping method for measuring percutaneous absorption *in vivo*. In: BRONAUGH, R. L.; MAIBACHM H. I. **Percutaneous absorption – drugs, cosmetics, mechanisms and methodology**, 3ed., Marcel Dekker: New York, p.375-394, 1999.

RUSSELL, L. M.; GUY, R. H. Novel imaging method to quantify stratum corneum in dermatopharmacokinetic studies. **Pharmaceutical research**, v. 29, n. 9, p. 2389-2397, 2012.

RUSSELL, L. M.; WIEDERSBERG, S.; DELGADO-CHARRO, M. B. The determination of stratum corneum thickness: An alternative approach. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 861-870, 2008.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L.; HUME, C. W. **The principles of humane experimental technique**. 1959.

RUSELL, W. M. S.; BURCH, R. L.; **Principles of Human Experimental Technique**, UFAW, England: Hyperion Books Inc., 1959.

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, C. M. C.; PIMENTA, C. A. M.; NOBRE, M. R. C. A. Systematic Review of Topical Treatments to Control the Odor of Malignant Fungating Wounds. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 39, n. 6, p. 1065–1076, 2010.

SANTOS, E. R. et al. Estudos de difusão cutânea do Lapachol. I–Ensaio “in vitro”. **Rev. Port. Farm**, v. 41, n. 3, p. 15-19, 1991.

SANTOS, H. Toxicologia: a garantia de cosméticos seguros. **Cosmetics and Toiletries Brasil**, São Paulo, SP, v. 20, p. 20-24, 2008.

SANTUS, G. C.; BAKER, R. W. Transdermal enhancer patent literature. **J. Controlled Release**, v. 25, p. 1-20, 1993.

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

SATO, M. E. O. et al. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

SAWHNEY, S. S. et al. Investigation on the interaction of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1, 4-naphthoquinone (lapachol) with copper (II) and iron (II). **Thermochimica acta**, v. 70, n. 1-3, p. 367-371, 1983.

SCHAUBER, J.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 3, p. R13-R18, 2009.

SCHEEL, J. et al. Eye irritation potential: usefulness of the HET-CAM under the globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 471-492, 2011.

SCHMOLKA, I. R. Artificial Skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatments of burns. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 6, p. 571–582, 1972.

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.

SCOTT, L. et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using bottom-up and top-down approaches. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2010.

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.

SELZER, D. A. et al. Strategy for in-silico prediction of skin absorption in man. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Alemanha, v. 11931, 2015.

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.

SHAH, R. R. et al. Fluconazole topical microemulsion: preparation and evaluation. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 2, n. 2, p. 353-357, 2009.

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

SHAH, V. P. IV-IVC for topically applied preparations—a critical evaluation. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 60, n. 2, p. 309-314, 2005.

SHEN, J. et al. An in silico skin absorption model for fragrance materials. **Food and Chemical Toxicology**. USA, v.74, p.164-176, 2014.

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. et al. 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.

SILVA, J. A. et al. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v 32(6), p. 1389-93, 2009.

SIMON, A. et al. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 234-241, 2016.

SIMONETTI, O. et al. Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy. **Archives of dermatological research**, v. 287, n. 5, p. 465-473, 1995.

SIRISH, V.; SADHNA, K.; NALINI, S. M. S. Formulation and evaluation of ion activated ocular gels of ketorolac tromethamine. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v 2(3), 2010.

SMITH, E. W.; SURBE, C.; MAIBACH, H. I. Topical dermatological vehicles: a holistic approach. In: BRONAUGH, R.L. & MAIBACH, H.I. **Percutaneous absorption – Drugs, Cosmetics, Mechanisms and Methodology**, 3ed., Marcel Dekker: New York, p.779-788, 1999.

SMITH, J. R. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rosacea. **British journal of ophthalmology**, v. 91, n. 2, p. 226-229, 2007.

SOARES, K. C. C. et al. Bioequivalência de medicamentos tópicos dermatológicos: o cenário brasileiro e os desafios para a vigilância sanitária. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 20, n. 11, p. 3599-3608, 2015.

SONGKRO, S. et al. Investigation of newborn pig skin as an in vitro animal model for transdermal drug delivery. **STP Pharma Sci.**, v.13, p.133-139, 2003.

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**. 2016. 121 f. Dissertação (mestrado em ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016.

SOUSA, G. D. et al. Biopharmaceutical Assessment and Irritation Potential of Microemulsions and Conventional Systems Containing Oil from Syagrus cearensis for Topical Delivery of Amphotericin B Using Alternative Methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 5, p. 1833-1842, 2017.

STEILING, W. et al. The HET–CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology in vitro**, v. 13, n. 2, p. 375-384, 1999.

STEINHOFF, M. et al. Clinical, cellular, and molecular aspects in the pathophysiology of rosacea. In: **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. Elsevier. p. 2-11, 2011.

STORPIRTIS, S. et al. **Farmacocinética básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SULK, M. et al. Distribution and expression of non-neuronal transient receptor potential (TRPV) ion channels in rosacea. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 4, p. 1253-1262, 2012.

SWARBRICK, J. et al. Drug permeation through human skin II: permeability of ionizable compounds. **J. Pharm. Sci.**, v. 73, n. 10, p. 1352-1355, 1984.

TABOSA, M. A. M. et al. Microemulsion Formulations for the Transdermal Delivery of Lapachol. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 4, p. 1837-1846, 2018.

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.

TANG, I. et al. The pH of multi-purpose soft contact lens solutions. **Optometry & Vision Science**, v. 73, n. 12, p. 746-749, 1996.

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.

THIBOUTOT, D. M. Acne and rosacea: New and emerging therapies. **Dermatologic clinics**, v. 18, n. 1, p. 63-71, 2000.

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

TWO, A. M. et al. Rosacea: part I. Introduction, categorization, histology, pathogenesis, and risk factors. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 5, p. 749-758, 2015.

UNITED NATIONS. ECONOMIC COMMISSION FOR EUROPE. SECRETARIAT. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**. United Nations Publications, 2009.

US FDA (1997). **Guidance for industry, extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of an in vitro/in vivo correlation.** FDA, CDER, 1997.

US FDA (1998). **Guidance for industry: Topical dermatological drug product ndas and andas- in vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies.** Draft guidance, June 1998, US. Development of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).

USP (2004). United States Pharmacopoeia. **In vitro and In vivo Evaluations of Dosage Forms**, 27th edition, Revision, Mack Publishing Co., Easton, PA., 2004.

VANPARYS, P. H. et al. Evaluation of the bovine corneal opacity-permeability assay as an in vitro alternative to the Draize eye irritation test. **Toxicology in vitro**, v. 7, n. 4, p. 471-476, 1993.

VERSTRAELEN, S. et al. 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**, v. 27, n. 4, p. 1298-1311, 2013.

VINARDELL, M. P.; MACIÁN, M. Comparative study of the Het-Cam test and the Draize eye test for assessment of irritancy potential. **Toxicology in vitro**, v. 8, n. 3, p. 467-470, 1994.

VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 1, p. 46-59, 2008.

VINARDELL, M. P.; GONZALEZ, S.; INFANTE, M. R. Adaptation of hemoglobin denaturation for assessment of ocular irritation of surfactants and manufactured products. **Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 18, n. 4, p. 375-384, 1999.

VIVES, M. A. et al. Irritancy potential induced by surfactants derived from lysine. **Toxicology in vitro**, v. 11, n. 6, p. 779-783, 1997.

WAGNER, H. et al. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of controlled release**, v. 75, n. 3, p. 283-295, 2001.

WANICK, M. C.; BANDEIRA, J. A.; FERNANDES, R. V. Ação antiinflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico do liber do pau d'arco rôxo (Tabebuia avellanedae), em

pacientes portadoras de cervicites e cérvico-vaginites. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.10, n.1/2, p.41-45, 1970.

WATKINSON, R. M. et al. Influence of Ethanol on the Solubility, Ionization and Permeation Characteristics of Ibuprofen in Silicone and Human Skin. **Skin Pharmacol Physiol.**, v.22, p.15–21, 2009.

WEN-DI, M. et al. Pluronic F127-g poly (acrylicacid) copolymers as in situ gelling vehicle for ophthalmic drug delivery system. **Int J of Pharmaceutics**, v. 350, p. 247-256, 2008.

WIEDERSBERG, S. et al. Pharmacodynamics and dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: assessment of topical bioavailability. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 3, p. 676-686, 2009.

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD, C. S.; GUY, R. H. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 453-466, 2008.

WIEDERSBERG, S.; LEOPOLD, C. S.; GUY, R. H. Dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: influence of formulation viscosity and skin surface cleaning procedure. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 362-366, 2009.

WILKIN, J. et al. Standard classification of rosacea: Report of the National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea. **J Am Acad Dermatol**, v. 46, p. 584–587, 2002.

WILKIN, J. K. Rosacea: pathophysiology and treatment. **Archives of dermatology**, v. 130, n. 3, p. 359-362, 1994.

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

WINSOR, T.; BURCH, G. E. Differential roles of layers of human epigastric skin on diffusion rate of water. **Archives of Internal Medicine**, v. 74, n. 6, p. 428-436, 1944.

WOLF, J. et al. Die innere Struktur der Zellen des Stratum desquamans der menschlichen Epidermis. **Z mikrosk anat Forsch**, v. 46, p. 170-202, 1939.

WOO, K. Y.; SIBBALD, R. G. Local wound care for malignant and palliative wounds. **Advances in skin & wound care**, v. 23, n. September, p. 417–428, 2010.

WORTH, A. P.; BALLS, M. **Alternative (non-animal) methods for chemicals testing: current status and future prospects**. Frame, 2002.

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.

YAMANE, M. A.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Effects of terpenes and oleic acid as skin penetration enhancers towards 5-fluorouracil as assessed with time; permeation, partitioning and differential scanning calorimetry. **Int. J. Pharm.**, v. 116, p. 237-251, 1995.

YANG, Y. et al. A procedure for application of eye irritation alternative methods on cosmetic ingredients. **ALTEX Proceedings**, 1, 12, 2010.

ZIP, C. M. Innovative use of topical metronidazole. **Dermatologic clinics**, v. 28, n. 3, p. 525-534, 2010.

ZLOTOGORSKI, A. Distribution of skin surface pH on the forehead and cheek of adults. **Arch Dermatol Res**; 279: 398-401,1987.