



Emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%: avaliação da estabilidade acelerada e estudos de liberação *in vitro*

Mendonça, C.C.¹; Silva, I.C.L.¹; Rodrigues, K.A.¹; Campos, M.A.L.¹; Medeiros, M.C.M.¹; Casteli, V.C.¹;
Ferrari, M.¹; Musis, C.R.¹; Machado, S.R.P.^{1*}

¹Laboratório de Desenvolvimento e Avaliação de Formas Farmacêuticas e Cosméticas,
Faculdade de Farmácia, Universidade de Cuiabá, UNIC, Cuiabá, MT, Brasil.

Recebido 16/09/2008 / Aceito 18/05/2009

RESUMO

Os objetivos do estudo foram desenvolver e avaliar a estabilidade físico-química de emulsões O/A contendo cetoconazol a 2,0% e determinar seu perfil de liberação *in vitro*. As formulações foram preparadas com bases auto-emulsionáveis com diferentes características químicas. A estabilidade do sistema foi avaliada de acordo com o Guia para Realização de Testes de Estabilidade em Produtos Farmacêuticos, utilizando diferentes temperaturas (4°C, 37°C e 45°C) por um período de tempo de três meses. Os parâmetros avaliados durante o ensaio foram: as características organolépticas, o pH, o comportamento reológico e a concentração do ativo. A emulsão considerada estável foi submetida ao ensaio de liberação *in vitro* utilizando célula de difusão de Franz. A quantificação do cetoconazol na formulação e na solução receptora foi realizada por método espectrofotométrico no ultravioleta a 244 nm. Dentre as formulações testadas, somente aquela preparada com álcool cetosteárfilico e estearato de polietilenoglicol (PEG20) manteve suas características físico-químicas estáveis durante o teste. O estudo de liberação *in vitro* demonstrou que o fármaco foi liberado do sistema gradualmente no decorrer do tempo, apresentando uma cinética pseudo zero ordem.

Palavras-chave: Cetoconazol. Estabilidade acelerada. Emulsão O/A. Liberação “*in vitro*”.

INTRODUÇÃO

As preparações semi-sólidas constituem uma significativa proporção das formas farmacêuticas presentes no mercado, pois servem como carreadores para fármacos que são liberados topicamente através da pele. Devido

a seu comportamento reológico peculiar, estas formas podem aderir à superfície da pele por um período de tempo suficientemente longo, propiciando um prolongamento da liberação do fármaco no sítio de aplicação. Além disso, são facilmente aplicáveis e versáteis, pois proporcionam a liberação tópica de uma grande variedade de moléculas de fármacos (Gupta & Garg, 2002).

Entre estas formas farmacêuticas, destacam-se as emulsões, que são uma mistura termodinamicamente instável de dois líquidos imiscíveis, constituídos de uma fase dispersa insolúvel na fase dispersante e um terceiro componente que é o agente tensoativo, responsável pela união destas duas fases (Ansel et al., 2000). As emulsões são muito utilizadas na área farmacêutica para os tratamentos tópicos, devido a sua capacidade de veiculação de princípios ativos hidrossolúveis e/ou lipossolúveis, de diminuição da irritabilidade dérmica de certos fármacos e principalmente da boa aceitação por parte do paciente (Lachman et al., 2001).

O cetoconazol é um derivado imidazólico com amplo espectro de ação antifúngica e alguma atividade antibacteriana, utilizado no tratamento de micoses sistêmicas e tópicas (Rang et al., 2000).

As formas farmacêuticas na fase de desenvolvimento devem passar por ensaios que visam à obtenção de informações sobre sua estabilidade, ou seja, a definição do seu prazo de validade, período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas. A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como a temperatura, a umidade e a luz, e outros relacionados ao próprio produto como as propriedades físicas e químicas dos princípios e excipientes farmacêuticos, a forma farmacêutica e sua composição, o processo de fabricação, o tipo e propriedades dos materiais de embalagem (Brasil, 2005).

As variações de temperatura são os principais parâmetros utilizados para induzir rápidas alterações químicas e físicas nas formulações, que são avaliadas pela quantificação do princípio ativo e pelo comportamento reológico do sistema estudado no decorrer dos ensaios de estabilidade (Guaratini et al., 2006).

Autor correspondente: Silvia Regina Pengo Machado. Faculdade de Farmácia - Universidade de Cuiabá - Av. Beira Rio, 3100, Jardim Europa, CEP: 78015-480, Cuiabá, MT, Brasil -Telefone (65)-3363 1044. Email para contato: silviapengo@yahoo.com.br

Entre os estudos de estabilidade propostos pela legislação vigente para produtos farmacêuticos (Brasil, 2005), os estudos de estabilidade acelerada utilizando temperaturas extremas, o doseamento do ativo e a determinação dos parâmetros reológicos são os mais utilizados, pois possibilitam a caracterização de uma formulação em períodos de tempo curtos (Di Mambro et al., 2003; Tadros., 2004).

Estudos preliminares da estabilidade de emulsões O/A contendo cetoconazol a 2,0 % já foram realizados. Foram preparadas oito formulações, sendo que apenas três destas apresentaram-se estáveis (Casteli et al., 2007).

Além da estabilidade, durante a fase de desenvolvimento de produtos dermatológicos é adequado empregar os ensaios de liberação *in vitro* para selecionar excipientes para as formulações que possam propiciar uma atividade terapêutica satisfatória. Pode-se considerar que os estudos de liberação proporcionam dados interessantes sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste em liberar os fármacos (Sato et al., 2007).

Tendo em vista o exposto, o objetivo do trabalho foi a avaliação da estabilidade acelerada de emulsões contendo cetoconazol 2,0% e a determinação do perfil de liberação destes sistemas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Instrumentação

A água utilizada foi proveniente do sistema de Osmose Reversa Mod. 10 LTH, GEHAKA. Todas as substâncias foram pesadas nas Balanças Digitais Semi-analítica e Analítica Mod. BG 2000, GEHAKA e Mod. FA 2104 N, BIOPRECISA. As emulsões foram preparadas com auxílio dos Agitadores Mecânicos Mod. 713 D, FISATOM e Mod. RW 20 DZM, IKA. Os ensaios de estabilidade foram realizados nas Câmaras Climáticas 420 CLD, NOVA ÉTICA, e Refrigerador Mod. RDE 35, ELECTROLUX. Os parâmetros avaliados durante estes ensaios foram realizados com auxílio do Medidor de pH Mod. PH 300, ALPAX, do Reômetro Brookfield DV III Ultra reômetro Mod. RV III, BROOKFIELD, do Espectrofotômetro FEMTO 800XI e do Banho de Ultra-som Mod. USC 1400, ULTRASONIC CLEANER, UNIQUE. Os ensaios de liberação foram realizados com o auxílio da Mesa Agitadora com aquecimento Mod. RT 10 IKA- WERKE e do Banho Ultratermostatizado, Mod. 521/1D- Nova Ética. Para homogeneização das soluções preparadas, utilizou-se o Agitador para tubos tipo Vórtex Mod. Lab Dancer, IKA.

MATERIAIS

As emulsões foram formuladas com as seguintes matérias-primas classificadas conforme a Denominação Comum Brasileira (Brasil, 2006): ácido esteárico - (Henrifarma Ltda, SP, Brasil), cetoconazol (98,9%) -

(Henrifarma Ltda, SP, Brasil), álcool ceto-estearílico e sulfato de sódio - Polawax NF® (Croda, SP, Brasil), álcool ceto-estearílico e seu derivado etoxilado- Paramul J® (Galena, SP, Brasil), 1,2 dibromo 2,4 dicianobuteno em 2 -fenoxietanol - Merguard 1200® (Pharma Special, SP, Brasil), polímero de taurato de acrilil dimetil amônio VP; 4 - fosfato de trilauril; poli gliceril - 2 - sesquisosterato, óleo de semente de flores de verão, tetra dibutil penta eritritil hidroxil hidrocinaurato de glicerina-Hostacerin NCB® (Pharma Special, SP, Brasil), óleo mineral - (Henrifarma Ltda, SP, Brasil), propilenoglicol, BHT, estearato de gliceril palmitato de Ascorbil, ácido cítrico de sódio- Oxyxex 20004® (Alpax, SP, Brasil), metabissulfito de sódio (Henrifarma Ltda, SP, Brasil), EDTA sódico - (Henrifarma Ltda, SP, Brasil), propilenoglicol - (Galena Química e Farmacêutica Ltda, SP, Brasil) e trietanolamina - (Henrifarma Ltda, SP, Brasil). Todos os outros reagentes possuíam grau de pureza adequada.

MÉTODOS

Preparação das Emulsões

Foram preparadas emulsões O/A que apresentaram uma fórmula farmacêutica básica composta por:

Cetoconazol	2,0 % (p/p)
EDTA Na	0,2 % (p/p)
Merguard 1200®	0,6 % (p/p)
Metabissulfito de Sódio	0,2 % (p/p)
Óleo Mineral	5,0 % (p/p)
Oxyxex 2004®	0,2 % (p/p)
Propilenoglicol	3,0% (p/p)

A Tabela 1 mostra a composição específica de cada formulação.

Formulações	Componentes da Emulsão (%) (p/p)				
	Ácido esteárico	Trietanolamina	Hostacerin NCB®	Paramul J®	Polawax NF®
1	3,0	1,0	-	-	8,0
2	-	-	-	10,0	-
3	-	-	5,0	-	-

As emulsões foram preparadas aquecendo as fases oleosa e aquosa a 75 oC e sob agitação constante verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa, mantendo a agitação (1.000 rpm) por 30 minutos. Foram preparados três lotes de cada formulação.

Ensaio de estabilidade acelerada

Aproximadamente 40 g de cada formulação foi acondicionada em frascos plásticos de poliestireno com

tampa (50 g) e submetidos a condições de temperatura variada (Wittern et al., 1985). Geladeira (4 ± 2 °C); Temperatura ambiente (37 ± 2 °C) ; Estufa (45 °C com umidade controlada a 75 %).

As formulações foram avaliadas a intervalos de tempo pré-determinados: 1, 15, 30, 60 e 90 dias.

Os parâmetros monitorados foram:

Determinação do pH

Em tubos de ensaio foram adicionados 1,0 g da emulsão e 9,0 g de água destilada (Ferrari, 2002). Com auxílio de vórtex as amostras foram homogeneizadas e a seguir o pH foi determinado, através do Medidor de pH pela inserção do eletrodo.

Determinação do comportamento reológico

A determinação da viscosidade e do comportamento reológico das amostras foi realizada em um Reômetro tipo cone e placa com interface a um Software Rheocalc 3.0, utilizando um spindle CP 52 e uma quantidade de amostras de 0,4 g, a 25°C. As variáveis contempladas neste estudo dependeram da formulação obtida. Para as formulações 1 e 2, as medidas foram feitas em velocidades de rotação progressivamente crescentes (1-30 rpm com variação em intervalos de 3 em 3 rpm), para obter-se a curva ascendente, sendo o procedimento repetido no sentido inverso com velocidades progressivamente decrescentes (30-1 rpm), com mesmo intervalo de variação, de 3 em 3 rpm, para obtenção da curva decendente. Para a formulação 3, as medidas foram feitas em velocidade de rotação progressivamente crescentes (1-100 rpm com variação em intervalos de 10 em 10 rpm) para obter-se a curva ascendente, sendo o procedimento repetido no sentido inverso com velocidades progressivamente decrescentes (100-1 rpm), com mesmo intervalo de variação de 10 em 10 rpm para obtenção da curva decendente.

Doseamento do fármaco

Validação da metodologia analítica para quantificação do fármaco nas emulsões O/A

A validação da metodologia analítica foi realizada segundo os critérios propostos pela Resolução da ANVISA RE nº 899, de 29/5/2003 (Brasil, 2003). Os parâmetros avaliados foram a linearidade, a precisão intermediária, a repetibilidade, a especificidade e a exatidão. A linearidade e o intervalo foram determinados por meio da construção da curva analítica com uma solução padrão de 250 µg/mL de cetoconazol em metanol. A partir desta solução foram realizadas diluições para obter soluções do fármaco nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL. Estas amostras foram avaliadas empregando espectrofotômetro de UV no comprimento de onda de 244 nm.

Precisão

Para avaliar a precisão intra corrida ou repetibilidade, três concentrações diferentes (5, 15 e 25 µg/mL) foram quantificadas em triplicata, totalizando nove determinações, sendo o resultado da análise expresso em termos de coeficiente de variação (CV). A precisão intermediária foi avaliada por meio da comparação entre a quantificação de uma mesma concentração (5, 15 e 25 µg/mL) realizada em três dias consecutivos, calculando-se posteriormente o CV obtido.

Especificidade

O ensaio de especificidade foi realizado através da análise das formulações sem princípio ativo (cetoconazol) em metanol. A quantidade de formulação contida nas soluções foi equivalente a utilizada no ensaio de doseamento do ativo nos estudos de estabilidade. Estas soluções foram avaliadas empregando espectrotômetro de UV no comprimento de onda de 244 nm.

Exatidão

Para avaliar a exatidão, três concentrações diferentes (5, 15 e 25 µg/mL) foram quantificadas em triplicata, totalizando nove determinações. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

A precisão e exatidão foram calculadas pelas fórmulas:

Precisão: % C.V. = (desvio padrão/média) x 100

Exatidão: % Bias = [concentração média experimental - concentração teórica / concentração teórica] x 100

Determinação da quantificação de fármaco na emulsão

Pesou-se 0,5 g do creme contendo o fármaco e transferiu-se para o balão de 100 mL com auxílio da adição de 80 mL de metanol. O balão foi sonicado por 15 minutos, o volume total do mesmo foi completado com o mesmo solvente e homogeneizado. A seguir, o conteúdo foi filtrado, sendo que os primeiros 15 mL do filtrado foram desprezados. Coletou-se 5 mL do filtrado, transferiu-se para um balão de 25 mL e completou-se o volume com metanol. A amostra foi avaliada empregando-se espectrotômetro UV no comprimento de onda de 244 nm.

Ensaio de Liberação in vitro

Após a seleção da formulação mais estável, por meio do teste de estabilidade acelerada, a mesma foi submetida ao ensaio de liberação *in vitro*.

Validação da metodologia analítica para quantificação do fármaco após experimento de liberação in vitro

Para a construção da curva analítica, utilizou-se uma solução padrão de 1 mg/mL de cetoconazol em tampão

fosfato pH 7,4 /etanol (60:40). A partir desta solução foram realizadas diluições para obter soluções do fármaco nas concentrações de 10, 15, 20, 25, 50 e 60 µg/mL. Estas amostras foram avaliadas empregando espectrofotômetro de UV no comprimento de onda de 244 nm.

Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas conforme descrito anteriormente.

Ensaio de liberação

Teste de liberação do fármaco in vitro

Foram utilizadas células de difusão vertical do tipo Franz, com área de liberação de 1,13 cm². Essas células são divididas em duas partes de forma que uma metade (compartimento doador) fica sobre a outra (compartimento receptor com volume de 9 mL) e entre elas a membrana. A parte inferior desta célula de difusão possui três portas, sendo uma entrada e uma saída de líquido circulante aquecido para manter a temperatura do compartimento a 37 ± 2 °C (banho-maria termostatizado) e uma entrada que se comunica com o compartimento interno (compartimento receptor) para permitir a coleta manual da solução receptora. A solução receptora foi mantida a 37 ± 2 °C e agitada a 350 rpm durante todo período de experimento. A célula de difusão foi montada com membrana de acetato celulose com retenção para macromoléculas acima de 12.0000 Daltons, (SIGMA-ALDRICH, EUA) separando o compartimento doador do receptor.

A solução tampão fosfato de sódio pH 7,4/etanol (60:40) foi colocada no compartimento receptor. Sobre as extremidades das células foram esticadas as membranas e o compartimento receptor foi fixado. A seguir, espalhou-se uniformemente sobre a membrana 0,4 g da formulação contendo cetoconazol 2,0%. Um volume de 3 mL foi coletado da fase receptora a cada três horas, seguido da reposição do mesmo volume com meio receptor limpo. As amostras coletadas foram quantificadas utilizando o comprimento de onda 244 nm.

Para o cálculo da quantidade liberada, consideraram-se as diluições que ocorreram após a primeira coleta.

Determinação da cinética de liberação do cetoconazol

Foram avaliados três modelos cinéticos: (1) Zero - Ordem: quantidade liberada (µg/cm²) /tempo (h); (2) Higuchi (pseudo zero ordem): quantidade liberada (µg/cm²) /√tempo (h) e (3) Primeira-Ordem: Log. da quantidade liberada (µg/cm²) /tempo (h).

Análise Estatística

Os resultados dos testes de estabilidade acelerada

foram submetidos aos testes de Tamhane para amostras heterogêneas e de Tukey (Sokal & Rohlf, 1995) para as homogêneas. As análises estatísticas foram realizadas com programa SPSS 13.0 for Windows.

RESULTADOS

Estudos de Estabilidade Acelerada

Avaliação Macroscópica

As formulações desenvolvidas foram submetidas ao armazenamento em condições de temperatura e umidade específica, 24 horas após seu preparo e criteriosamente avaliadas antes e após o ensaio de estabilidade acelerada.

Os parâmetros avaliados envolvem as alterações físicas e físico-químicas, tais como: o aspecto, a cor, o odor, o pH, o comportamento reológico e o teor do ativo.

A análise macroscópica das formulações 24 horas após seu preparo das formulações mostrou que todas se apresentavam visualmente estáveis. As características organolépticas das formulações inicialmente e posteriormente ao ensaio de estabilidade acelerada estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Observação visual das características organolépticas das formulações.

Formulação	Observação visual	
	Inicial	Final
1	A emulsão apresentou-se homogênea e de coloração branco brilhante.	A emulsão apresentou-se homogênea e de coloração branco opaco.
2	A emulsão apresentou-se homogênea e de coloração amarelada brilhante.	A emulsão apresentou-se com consistência fluida e de coloração rósea.
3	O gel-creme apresentou-se homogêneo e de coloração branco brilhante.	O gel-creme apresentou-se com consistência fluida e de coloração rósea.

Determinação do pH

A Tabela 3 apresenta a variação do valor do pH frente às condições propostas no estudo. Os valores apresentados correspondem à média dos valores de três lotes de cada formulação, sob cada condição proposta.

Valores calculados pelos valores originais (n=3) expressos pela média ± desvio padrão, entre parênteses são apresentados os valores do coeficiente de variação em porcentagem.

De acordo com a Tabela 3 somente a Formulação 1 mostrou-se estável em relação ao valor de pH durante todo período do ensaio, com diferenças de valores de desvio dentro do limite de variação aceitável 10%.

Tabela 3 - Avaliação dos pH das formulações durante o ensaio de estabilidade acelerada.

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Formulações		
		1	2	3
0	4	7,93 ± 0,27 (3,4)	7,50 ± 0,10 (1,3)	5,77 ± 0,06 (1,0)
	37	7,78 ± 0,15 (1,9)	7,43 ± 0,15 (2,0)	5,83 ± 0,06 (1,0)
	45	7,87 ± 0,24 (3,1)	7,47 ± 0,15 (2,0)	5,80 ± 0,00 (0)
15	4	7,77 ± 0,25 (3,2)	6,65 ± 0,25 (3,7)	5,83 ± 0,10 (1,7)
	37	7,77 ± 0,25 (3,2)	6,81 ± 0,48 (7,0)	5,80 ± 0,13 (2,2)
	45	7,77 ± 0,25 (3,2)	6,55 ± 0,19 (2,9)	5,47 ± 0,03 (0,5)
30	4	7,80 ± 0,20 (2,6)	O	5,65 ± 0,03 (0,5)
	37	7,70 ± 0,20 (2,6)	O	5,66 ± 0,10 (1,8)
	45	7,73 ± 0,15 (1,9)	O	O
60	4	7,70 ± 0,40 (5,2)	O	O
	37	7,80 ± 0,15 (1,9)	O	O
	45	7,60 ± 0,25 (3,3)	O	O
90	4	8,57 ± 0,20 (2,3)	O	O
	37	8,23 ± 0,32 (3,9)	O	O
	45	8,47 ± 0,20 (2,4)	O	O

O= oxidou.

Determinação da concentração de cetoconazol

Tendo em vista que um dos objetivos do trabalho foi determinar a estabilidade química das formulações e avaliar o perfil de liberação do fármaco *in vitro*, fez-se necessário o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica sensível e reprodutível para a realização do doseamento do cetoconazol. O método proposto foi baseado no trabalho de Kedor-Hackmann et al., (2006). A análise estatística dos dados por regressão linear indicou uma relação de linearidade entre as absorbâncias (nm) e as concentrações do fármaco ($\mu\text{g/mL}$), de acordo com a equação $y = 0,0396x - 0,1002$ e $r = 0,9860$.

A especificidade é um parâmetro analítico essencial para confiabilidade do método, os resultados mostraram que nenhum dos componentes da formulação ou mesmo o solvente (metanol), apresentou absorbância no mesmo comprimento de onda do cetoconazol.

Tabela 5 - Avaliação da precisão intra-corrída (repetibilidade) e inter-corrídas (intermediária) e da exatidão do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Repetibilidade (%)*	Intermediária (%)*	Exatidão (%)*
5	1,0707	4,8435	2,2660
15	1,8303	1,2784	4,9046
25	0,8440	0,6678	1,3878

*valores correspondem ao coeficiente variação em porcentagem

A análise da quantidade de fármaco presente nas emulsões no decorrer do ensaio de estabilidade acelerada foi realizada e os resultados correspondem à formulação 1, pois esta foi a única que se apresentou estável até o fim dos três meses.

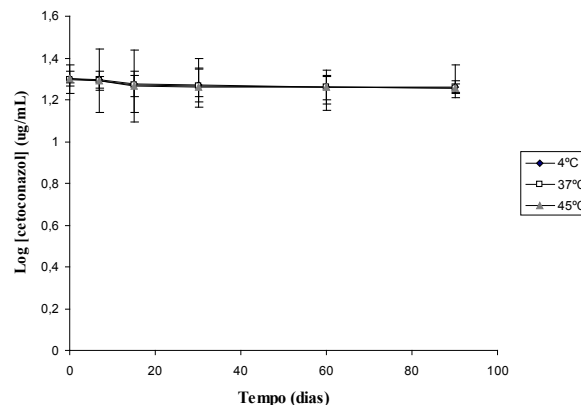


Figura 1. Quantificação do cetoconazol, expresso em log dos valores das concentrações de Cetoconazol pelo tempo, na formulação 1 durante o ensaio de estabilidade acelerada. As barras verticais indicam o desvio padrão de 3 lotes da formulação em cada temperatura.

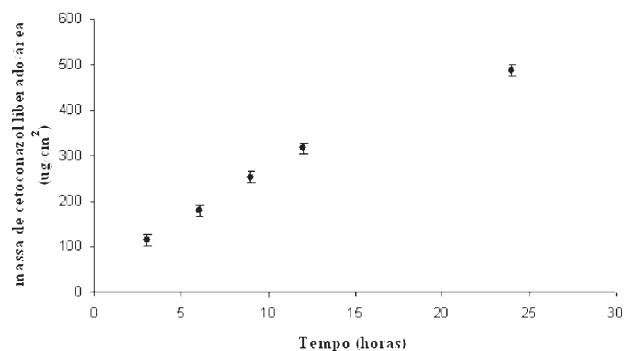


Figura 2. Massa de Cetoconazol acumulada na solução receptora de células de Franz equipadas com membrana de acetato de celulose normalizada pela área de contato em função do tempo. As barras verticais indicam o desvio padrão de 6 células.

A fim de conseguir quantificar o fármaco diretamente na fase receptora durante os ensaios de liberação foi validada uma nova curva analítica.

O método analítico proposto mostrou-se linear, pois a análise estatística dos dados por regressão linear indicou uma relação de linearidade entre as absorbâncias e as concentrações do fármaco, de acordo com a equação $y = 0,0215x - 0,0135$ e $r = 0,9992$.

Em relação à escolha do meio receptor adequado para utilização no experimento de liberação *in vitro*, os resultados obtidos demonstram que a adição do etanol aumentou a dissolução do cetoconazol em tampão fosfato pH 7,4 (13,07 $\mu\text{g/mL}$ para 870 $\mu\text{g/mL}$), possibilitando a garantia das condições "sink" durante o teste de liberação do fármaco *in vitro* a partir da formulação desenvolvida.

Tabela 6 - Avaliação da quantidade de cetoconazol durante o ensaio de estabilidade acelerada.

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Concentração de Cetoconazol	
		(µg/mL)	(%)
0	4	19,90 ± 0,012	99,5
	37	19,89 ± 0,017	99,45
	45	20,06 ± 0,083	100,3
15	4	18,81 ± 0,072	94,05
	37	18,75 ± 0,015	93,55
	45	18,42 ± 0,011	92,1
30	4	18,44 ± 0,016	92,2
	37	18,58 ± 0,06	92,9
	45	18,12 ± 0,019	90,6
60	4	18,14 ± 0,021	90,7
	37	18,27 ± 0,014	91,35
	45	18,19 ± 0,025	90,95
90	4	18,11 ± 0,020	90,55
	37	18,07 ± 0,018	90,35
	45	18,08 ± 0,019	90,4

Valores calculados pelos valores originais (n = 3) expressos pela média ± desvio padrão

Tabela 7 - Avaliação da precisão intra-corrída (repetibilidade) e inter-corrídas (intermediária) e da exatidão do método analítico.

Concentração (µg/mL)	Repetibilidade (%)*	Intermediária (%)*	Exatidão (%)*
10	3,31	5,85	1,6357
20	2,87	0,89	0,5038
60	3,63	3,30	2,5969

*valores correspondem ao coeficiente variação em porcentagem.

A Figura 2 apresenta o perfil de liberação do cetoconazol presente na formulação por meio das massas médias de Cetoconazol encontradas em cada tempo de coleta de amostra da solução receptora, normalizada pela área de contato da célula.

A Tabela 8 relaciona os parâmetros cinéticos de liberação *in vitro* do cetoconazol presente na formulação 1 por meio do modelo de cinética zero ordem, Higuchi (pseudo zero ordem e primeira ordem).

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da curva de liberação *in vitro* do cetoconazol na formulação 1.

Modelo Cinético	Parâmetros	
	J (µg/cm ² /min.)	r
0a ordem	0,428	0,991
Higuchi	2,939	0,999
1ª ordem	0,028	0,935

DISCUSSÃO

Os sistemas emulsionados fluidos e semi-sólidos são amplamente utilizados em produtos farmacêuticos e cosméticos para a veiculação de fármacos e ativos

cosméticos para pele. No passado, este sistema era utilizado devido a sua simplicidade e elegância como veículo para os fármacos, mas atualmente se sabe que as propriedades coloidais dos mesmos podem influenciar a biodisponibilidade dos ativos de várias formas. Estas interações entre o ativo/veículo e o veículo/pele conjuntas interferem na disponibilidade que o ativo atinge na superfície da pele permanecendo ou penetrando através do estrato córneo (Eccleston, 1997). Assim, é essencial que durante a formulação de uma forma farmacêutica se avalie as características das matérias-primas, do fármaco e do processo produtivo, a fim de garantir a estabilidade física, química e microbiológica.

Os estudos de estabilidade acelerada são destinados a aumentar a velocidade de degradação química e modificação física de uma substância ou alterar as características da forma farmacêutica (ANFARMAG, 2006). Também conhecidos como estudos de estabilidade normal ou exploratória, têm como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, o tempo de vida útil e a compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (Brasil, 2005).

Em relação às características físico-químicas do fármaco, o cetoconazol deve ser conservado em recipientes hermeticamente fechados e ao abrigo da luz, pois é facilmente oxidável e fotossensível. Assim sendo, é aconselhável que toda formulação contendo este fármaco contenha um sistema antioxidante composto como o sulfito de sódio 0,2% ou o metabissulfito de sódio 0,2%. Além disso, recomenda-se que o ativo seja conservado em temperatura ambiente (25°C) e protegido de temperaturas superiores a 40°C (Pharmapress, 2006).

As bases auto-emulsionáveis utilizadas apresentam características distintas. De acordo com a literatura técnica, o Polawax NF® é uma cera auto-emulsionante não-iônica que permanece estável em ampla faixa de pH, 3 a 12, como também na presença de altas concentrações de eletrólitos (Croda, 2005). O Paramul J® também é uma base auto-emulsionante não-iônica, porém com uma faixa de estabilidade em relação ao pH mais estreita, 5 a 7 (Galena, 2005). Já o Hostacerin NCB® é uma base de caráter aniônico que permanece estável com pH entre 4 e 9 (Pharmaspecial, 2005).

Analisando em conjunto as características físico-químicas da base e do ativo nas formulações e os resultados apresentados na Tabela 3, observou-se que embora as formulações 2 e 3 apresentassem valores de pH dentro da faixa aceitável para estabilidade das bases, ambas demonstraram indícios de perda de sua estabilidade no decorrer do ensaio. Este fato se deve às condições de temperatura e umidade extremas empregadas no teste. Isto possibilitou a degradação do cetoconazol nas formulações mesmo com a presença do sistema antioxidante. Peparo (2001) apresentou resultados semelhantes em relação à formulação mais estável física e quimicamente para

Avaliação do comportamento reológico

A Tabela 4 apresenta o comportamento reológico das formulações durante o ensaio de estabilidade acelerada. Os valores apresentados correspondem à média de três lotes de cada formulação sob condições específicas.

Tabela 4 - Comportamento reológico das formulações submetidas ao teste de estabilidade acelerada.

Formulações	1			2			3		
	Tempo (dias)	Temper. (°C)	η	IF	IC	η	IF	IC	IF
0	4	2924,87 ± 149,81	15596,5 ± 213,75	0,42 ± 0,04	23194 ± 134,35	3148,58 ± 364,82	0,35 ± 0	10054 ± 258,80	0,43 ± 0,01
	37	3125,43 ± 60,81	17094 ± 412,67	0,47 ± 0,04	28757,5 ± 108,19	2731,86 ± 392,89	0,39 ± 0	10027 ± 296,98	0,43 ± 0,01
	45	2751,7 ± 0	12388,5 ± 105,5	0,51 ± 0,07	23387,5 ± 354,26	3046,06 ± 416,28	0,31 ± 0,02	10238 ± 249,3	0,44 ± 0,02
15	4	2014,17 ± 32,75	16406,5 ± 138,22	0,45 ± 0,02	15149,6 ± 284,15*	1770,53 ± 51,89*	0,39 ± 0,03	10481,5 ± 532,5	0,43 ± 0,005
	37	1964,55 ± 159,03	20595 ± 294,17	0,36 ± 0	18958 ± 3789,5*	1933,69 ± 26,64*	0,36 ± 0,04	9108 ± 492,14	0,46 ± 0,007
	45	2146,45 ± 70,71	16887 ± 557,06	0,43 ± 0,07	10026 ± 569*	1723,12 ± 56,225*	0,45 ± 0,025	10197,5 ± 98,28	0,42 ± 0
30	4	2162,99 ± 74,83	15779 ± 274,35	0,41 ± 0,02	14980 ± 2200,51*	1640,43 ± 46,77*	0,37 ± 0,03	O	O
	37	2116,69 ± 46,77	18811 ± 603,86	0,37 ± 0,007	13557,5 ± 275,06*	1928,18 ± 70,15*	0,42 ± 0,02	O	O
	45	2348,20 ± 130,96	13551 ± 232,08	0,51 ± 0,05	11963,5 ± 427,05*	1508,14 ± 46,77*	0,41 ± 0,09	O	O
60	4	1991,01 ± 18,70*	14426 ± 255,72*	0,43 ± 0,03	14641,5 ± 2,12*	1620,59 ± 9,35*	0,37 ± 0,01	O	O
	37	2010,85 ± 9,35*	15827 ± 256,55*	0,41 ± 0,05	16572 ± 206,34*	1739,66 ± 84,18*	0,37 ± 0,021	O	O
	45	1812,41 ± 112,25*	13927,5 ± 188,61*	0,4 ± 0,03	23534,5 ± 201,40*	1445,3 ± 70,15*	0,27 ± 99,87	O	O
90	4	11828,96 ± 116,93	13394,5 ± 294,64*	0,43 ± 0,007	O	O	O	O	O
	37	1577,6 ± 4,68*	14009 ± 204,71*	0,39 ± 0,01	O	O	O	O	O
	45	1825,64 ± 30,31*	12945,67 ± 684,79*	0,47 ± 0,16	O	O	O	O	O

η = viscosidade mínima, IC= índice de consistência, IF= índice de Fluxo e O= oxidou.

Valores calculados pelos valores originais (n=3) expressos pela média ± desvio padrão. * p< 0,05

veicular este fármaco (base auto-emulsionante e sistema antioxidante). Skiba et al., (2000), estudaram a estabilidade de formulações aquosa contendo cetoconazol. Os resultados obtidos mostraram que as mesmas apresentaram uma maior estabilidade química quando armazenados a temperatura ambiente (25°C) durante até seis meses em faixa de pH 5,0 a 9,0. Uma taxa de degradação alta foi constatada na formulação com pH 1,0. Este fato sugere que o cetoconazol é susceptível especificamente a catálises ácidas. Paralelamente foi realizado um ensaio de estabilidade acelerada (25°C e 50°C) com uma formulação preparada com pH 7,0. Mesmo com neutralidade, houve uma perda de 5,0% e 15% do cetoconazol presente nas formulações acondicionadas respectivamente na temperatura ambiente e na estufa 6 meses após o início do ensaio

A reologia é definida como a ciência que estuda o fluxo e a maneira como os materiais respondem à aplicação de uma força ou tensão (Tonzar, 2006). As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, na estocagem e na aplicação de produtos de uso tópico (Leonardi & Campos, 2001).

Em relação aos parâmetros reológicos avaliados, sabe-se que o índice de consistência (IC) está relacionado com a própria viscosidade do produto, ou seja, com a resistência ao fluxo, enquanto o índice de fluxo (IF) está relacionado com o comportamento da curva, ou seja, indica o grau de pseudoplastia do material; quanto mais próximo de 1, menor a pseudoplastia (Leonardi et al., 2000). Outro parâmetro importante é a viscosidade aparente mínima que representa a viscosidade do produto a uma dada faixa de taxa de deformação (η) (Martin, 1993).

Os valores de η , IC e IF das formulações 1 e 3 (Tabela 4), não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) até o primeiro mês de estudo. Porém, após este período, a formulação 3 apresentou sinais físicos de instabilidade (perda visível de sua viscosidade) o que comprometeu a continuidade do estudo. Contrariamente, a formulação 1 apresentou-se visualmente estável até final do estudo, mas foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de η , IC e IF para os períodos de 60 e 90 dias.

Pela análise do IF e pelos reogramas obtidos, pode-se verificar que todas as emulsões estudadas apresentaram comportamento pseudoplástico e a presença de área de histerese, ou seja, os materiais apresentaram tixotropia. Os produtos tixotrópicos tendem a ter maior vida de prateleira, pois durante o armazenamento estes apresentam viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (Martin, 1993). Além dessa vantagem, os produtos com essas características são de bastante interesse, pois as formulações se deformam durante a aplicação, ou seja, tornam-se mais fluidas facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra (Gaspar & Maia Campos, 2003).

Os estudos reológico e a determinação da

concentração de ativo nas formulações representam uma completa, racional e necessária ferramenta para prever o comportamento físico das amostras durante tempo de prateleira determinado (Tadros et al., 2004).

A validação de métodos analíticos é um processo por meio do qual estudos estatísticos são utilizados para garantir que o método proposto atenda às exigências desejadas. Para validar é preciso definir parâmetros analíticos, tais como linearidade, exatidão, precisão e especificidade (Gil et al., 2007). A linearidade é um dos mais importantes passos na análise química e reflete a proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta obtida (absorbância) (Peng & Chiou, 1990). Para a construção da curva analítica é necessário usar um número suficiente (5 amostras) de soluções padrão em diferentes concentrações para definir adequadamente a relação entre a concentração analito ($\mu\text{g/mL}$) e a resposta obtida (absorbância). Cada concentração é preparada se adicionando um volume apropriado de solução estoque à solução secundária, sendo que este volume deve ser sempre menor ou igual a 2 % do volume total da amostra (Bressolle et al., 1996). As soluções preparadas para a construção da curva analítica também foram utilizadas para realização dos experimentos de precisão e exatidão. Com os resultados obtidos, realizou-se um gráfico relacionando as concentrações das soluções ($\mu\text{g/mL}$) e as absorbâncias obtidas (nm) e por meio da análise de regressão linear, obteve-se a equação da reta e o respectivo r (coeficiente de correlação linear). Segundo critério da RE 899/2003, o coeficiente de correlação (r) deve ser no mínimo igual a 0,99. O valor do coeficiente obtido experimentalmente para a validação do método analítico para a quantificação do fármaco diretamente na formulação durante o ensaio de estabilidade acelerada foi menor que o indicado pela legislação. Isto pode ter ocorrido devido às características físico-químicas do cetoconazol (fotoinstabilidade e fácil oxidação) e também pela alta volatilidade do solvente utilizado para a preparação das soluções (metanol).

A especificidade depende de quanto o método é indiferente à presença na amostra de espécies que poderiam interferir na determinação do analito (Leite, 1998). Portanto, a especificidade é analisada para certificar que o método utilizado não sofrerá interferência das formulações ou substâncias presentes na amostra. A precisão de um método analítico corresponde à medida de erro aleatório entre as leituras efetuadas com a mesma amostra, e pode ser expressa como a porcentagem do coeficiente de variação (C.V. %) ou desvio padrão relativo das medidas das replicatas. A exatidão (E) é uma medida de erro sistemático ou Bias e é definida como a relação entre o valor medido e o valor teórico. De acordo com literatura técnica, o Guia Para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (Brasil, 2003), os desvios máximos aceitáveis em relação à precisão de um método analítico devem ser definidos de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do

método, não se admitindo valores superiores a 5%. Embora não esteja especificado na legislação, os valores de desvios permitidos para exatidão são os mesmos da precisão. Os resultados da validação (Tabelas 5 e 7) mostraram que os métodos analíticos propostos mostraram-se lineares, específicos, precisos e exatos.

Segundo o Guia para Estabilidade de Produtos Farmacêuticos, para fins de prazo de validade provisório de 24 meses, será aprovado o relatório de estabilidade acelerada (6 meses) ou de longa duração (12 meses) que apresentar variação $\leq 5,0\%$ do valor declarado do princípio ativo. Caso as variações de doseamento estejam entre 5,1 e 10 % no estudo acelerado, o prazo de validade provisório será reduzido para 12 meses (Brasil, 2005). Conforme resultados descritos na Tabela 6, estima-se que o prazo de validade para esta formulação seja de 12 meses, pois a perda de princípio ativo durante os 3 meses do ensaio de estabilidade acelerado foi de 10 %

A avaliação da velocidade de degradação de um medicamento possibilita estimar o seu prazo de validade. Entende-se por prazo de validade, o tempo durante o qual o produto poderá ser utilizado e para medicamentos é caracterizado pelo tempo durante o qual o fármaco perde no máximo 10% de sua integralidade. Os estudos de cinética de uma reação conferem aos estudos de estabilidade suporte físico-químico e matemático, correlacionando o prazo de validade com a velocidade das reações. As reações químicas podem ser classificadas quanto à cinética de degradação química em: a) Zero Ordem, b) Primeira Ordem e c) Segunda Ordem (Gil et al., 2007).

O estudo da velocidade de degradação da química e do modo como é influenciada por fatores como a concentração do fármaco ou do reagente, o solvente empregado, as condições de temperatura e pressão e a presença de outros reagentes químicos na formulação é denominada cinética de reação (Ansel et al., 2007). De acordo com a Figura 1, a degradação do cetoconazol nesta emulsão seguiu uma cinética de reação de primeira ordem, o que é comum para maioria dos fármacos submetidos a testes de estabilidade. Na cinética de primeira ordem, a perda do fármaco é diretamente proporcional à concentração remanescente. Conseqüentemente, a concentração varia de modo exponencial com o tempo, de forma que a representação gráfica do logaritmo da concentração contra o tempo resulta em uma reta (Ortega & Netz, 2002).

No desenvolvimento de uma forma farmacêutica, os estudos do perfil de liberação *in vitro* servem para avaliar a quantidade de fármaco liberado em função do tempo. Os testes *in vitro* constituem um controle qualitativo e quantitativo do sistema de liberação e fornecem informações para estudos posteriores *in vivo* e ainda para os estudos clínicos. A realização dos estudos *in vitro* é importante, visto que reduz o número de amostras consideradas adequadas para a realização dos testes *in vivo* (Amidon et al., 1995).

Para a avaliação das formas farmacêuticas emulsionadas de uso dermatológico, a literatura científica relata o uso estudos de liberação (membrana sintética), permeação e retenção cutânea (membrana natural) *in vitro*, utilizando a “célula de difusão ou de Franz” (Franz, 1975, 1978). O sistema de difusão de Franz é bastante utilizado devido ao seu baixo custo, boa reprodutibilidade dos resultados e realização em pequeno espaço de tempo, comparativamente a outras técnicas (Leveque et al., 2003).

Uma terapia efetiva nas enfermidades cutâneas requer que o agente ativo seja liberado no sítio de infecção, em concentrações adequadas para produzir o efeito farmacológico. No caso de infecções superficiais da pele, onde o agente patogênico reside sobre ou entre as camadas mais externas da pele, o produto terapêutico deve ser liberado no estrato córneo em concentrações adequadas para inibir o crescimento do agente patogênico (Pershing et al., 1994). Para produtos dermatológicos, estes estudos são realizados de modo que o fármaco seja liberado da formulação onde está veiculado, e se difunda através de uma membrana que pode ser de origem artificial ou natural (humana ou animal) para uma solução receptora (OECD, 2004).

Nos estudos de liberação *in vitro*, os parâmetros devem ser escolhidos com critério, simulando as condições *in vivo*. É necessária a escolha da membrana sintética adequada, a manutenção da temperatura próxima à fisiológica (37°C), a agitação constante do fluido receptor e a escolha do fluido receptor ideal, considerando-se o pH, a isotonicidade e as condições “sink”. Neste ensaio foi empregada uma membrana sintética de acetato de celulose que é recomendada pelo FDA (U.S. FDA/CDER, 1997), pois não reage com a formulação ou o meio receptor, é permeável ao fármaco e não é determinante da taxa de liberação (Shah et al., 1998).

Na Figura 2, é possível observar que o perfil de liberação permaneceu linear com o tempo. É importante ressaltar que o desvio padrão entre as seis células de cada experimento foi adequado, indicando boa precisão do método, ou seja, baixa variabilidade entre as réplicas dos ensaios de liberação.

A taxa de liberação de um fármaco a partir de determinada formulação depende diretamente das características físico-químicas do veículo e do fármaco (Santoyo et al., 1996). A liberação do fármaco a partir do veículo que o contém é prerrogativa para a penetração na pele. O fármaco deve estar disponível na superfície da pele para que haja difusão através do estrato córneo. As principais características da formulação que irão governar essa etapa são a solubilidade do fármaco no veículo e a atividade termodinâmica. Entretanto, uma vez disponível para penetração na superfície da pele, a penetração e a permeação irão depender da capacidade do fármaco de atravessar a camada córnea da pele, e de características como lipofilicidade e tamanho da molécula,

além de modulação da formulação por meio da adição de promotores de penetração (Bemvindo, 2006). Outro fator importante para a velocidade de liberação é a viscosidade da formulação, pois quanto maior for a viscosidade da preparação, maior é a probabilidade de que esse fármaco seja liberado lentamente.

De acordo com Tabela 8, a liberação *in vitro* do cetoconazol na formulação 1 segue o modelo cinético de Higuchi ou pseudo zero ordem, indicando que a liberação do fármaco a partir do sistema ocorre por mecanismo de difusão (Serra, 1998).

O gráfico de quantidade de fármaco acumulado no meio receptor em função do tempo fornece o perfil de liberação e o fluxo de passagem do fármaco a partir da formulação para a solução receptora é representado pela inclinação da parte reta da curva (Shah et al., 1989). O tempo "lag" é outro parâmetro avaliado, pois determina o tempo necessário para que o sistema entre em equilíbrio e é calculado por extrapolação da reta de regressão linear até o eixo do tempo (Zatz, 1993). Assim sendo, aplicando o tratamento matemático de regressão linear no intervalo de tempo de coleta de três a 12 horas (três em três horas) foi possível determinar o fluxo (22,492 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$) e o tempo "lag" (duas horas).

Entre as emulsões desenvolvidas, somente a formulação 1 apresentou estabilidade física e química satisfatória durante os ensaios de estabilidade acelerada. O perfil de liberação *in vitro* foi adequado para sistema proposto, pois o fármaco foi liberado em concentrações e tempo pertinentes com o uso proposto. Uma próxima etapa do trabalho avaliará a retenção e permeação do sistema desenvolvido, utilizando membranas biológicas provenientes de orelha de porco.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Mato Grosso (FAPEMAT) pelo apoio financeiro ao projeto e pelas bolsas de Iniciação Científicas concedidas aos alunos. A Faculdade de Farmácia da Universidade de Cuiabá pelo apoio financeiro.

ABSTRACT

O/W Emulsion Containing 2.0% Ketoconazole: Accelerated Stability Test and in vitro Release

The goal of this work was to develop and assess the physicochemical stability of O/W emulsions containing 2.0% ketoconazole and to determine their *in vitro* release profile. These formulations were prepared with self-emulsifying bases that differed in their chemical characteristics. The stability of the system was assessed, as recommended in the Guide to Drug Product Stability

Tests, over 3 months at 3 different temperatures (4°C, 37°C and 45°C). The characteristics assessed during the test were the organoleptic properties, pH, rheological behavior and drug concentration. The most stable emulsion was subjected to an *in vitro* release test in a Franz diffusion cell system. The ketoconazole in both the formulation and receptor phase was determined by UV spectrophotometry at 244 nm. The O/W emulsion prepared with cetearyl alcohol and polyethylene glycol (PEG20) stearate was the only one that maintained its physicochemical characteristics throughout the test. The *in vitro* release test demonstrated that the drug was released gradually, exhibiting pseudo zero-order kinetics.

Keywords: Ketoconazole. Accelerated stability. O/W emulsions. *In vitro* release test.

REFERÊNCIAS

Amidon GL, Lennernäs H, Vinod PS, Crison JR. A theoretical basic for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vitro* bioavailability. *Pharm Res.* 1995; 12: 413-20.

ANFARMAG - Associação Nacional dos Farmacêuticos Magistrais. Encarte Técnico Ed 61. Formas farmacêuticas emulsionadas: sinais de instabilidade e ensaios de estabilidade acelerada. [citado 2006 Out 20]. Disponível em: <http://www.anfarmag.org.br>.

Ansel HC, Popovich NG, Allen Jr. LV. *Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.* 6.ed. São Paulo: Editorial Premier; 2000.

Ansel HC, Popovich NG, Allen Jr. LV. *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems.* 8th ed Londres: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

Bemvindo, CS. Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas. [Tese] Rio de Janeiro: Faculdade de Farmácia, UFRJ, 2006.

Brasil. Resolução nº 1 de 29 de Julho de 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso de suas atribuições autoriza ad referendum, a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Diário Oficial da União, 01 ago. 2005. Seção 1, Suplemento 146, p1.

Brasil. Resolução RDC nº 211 de 17 de novembro de 2006. Aprova as instruções para utilização da lista das Denominações Comuns Brasileiras e a lista das Denominações Comuns Brasileiras -DCB 2004 para substâncias farmacêuticas. Diário Oficial da União, 20 nov 2006. Seção 1, Suplemento 221, p1.

Brasil. Resolução RE nº 899 de 29 de Maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, determina a

- publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. [citado 2005 maio 08]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
- Bressolle F, Bromet-Petit M, Audram M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1996; 686: 3-10.
- Castelli VC, Mendonça CC, Silva LCI, Campos LAM, Medeiros MMC, Ferrari M, Machado SRP. Development and evaluation of the preliminary stability of O/W emulsion containing ketoconazole 2.0%. In: 6º Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences; 2007 fev., Ribeirão Preto, SP, 2007.
- CRODA. Encarte Técnico. [citado 2005 jun 05]. Disponível em: <http://www.croda.com.br>.
- Di Mambro VM, Borin MF, Fonseca MJ. Topical formulation with superoxide dismutase: influence of formulation composition on physical stability and enzymatic activity. J Pharm Biomed Anal. 2003; 32: 97-105.
- Eccleston GM. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. 1997; 123-124: 161-82.
- Ferrari M. Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexila e óleo de andiroba (*Carapa guyanensis*) [Tese] Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP; 2002.
- Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance of *in vitro* data. J Invest Dermatol. 1975; 64 (3): 190-5.
- Franz TJ. The finite dose technique as a valid *in vitro* model for the study of percutaneous absorption in man. Curr Probl Dermatol. 1978; 7: 58-68.
- Galena - Química e Farmacêutica Ltda. Encarte Técnico. [citado 2005 jun 05]. Disponível em: <http://www.galena.com.br>.
- Gaspar LRP, Maia Campos MBG. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. Int J Pharm. 2003; 205: 35-44.
- Gil ES, Orlando RM, Serrano SHP, Fischer DCH, Machado SAS, Matias R, Bara MTF, Cirilo HNC, Figueiredo G, Barbosa WG. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks; 2007.
- Guaratini T, Gianet MD, Campos, PM. Stability of cosmetic formulations containing ésteres of Vitamins E and A chemical and physical aspects. Int J Pharm. 2006; 327: 12-6.
- Gupta P, Garg S. Recent Advances in semisolid Dosage Forms for Dermatological Application. Pharm Technol N Am. 2002; 26: 144-62.
- Kedor-Hackmann ERM, Santoro MIR, Singh AK, Peparo AC. First-derivate ultraviolet spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of Ketoconazole in pharmaceutical emulsions. Rev Bras Ciên Farm. 2006; 42: 91-8.
- Lachman L, Lieberman HÁ, Kanig JA. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2001. v.2
- Leite F. Validação em análise química. Campinas: Editora Átomo; 1998.
- Leonardi GR, Beraldi P, Freitas PCD, Maia Campos PMBG. Produtos de uso tópico com Aloe Vera. Cosmet Toilet. (Ed. Port.) 2000; 12: 44-53.
- Leonardi GR, Campos PMM. Estabilidade de formulações cosméticas. Int J Pharm Comp. 2001; 3: 154-6.
- Leveque N, Makki S, Hafgraft J, Humbert P. Comparidion of Franz cells and microdialysis for assessing salilylic acid penetration through human skin. Int J Pharm. 2003; 269: 323-8.
- Martin A. Physical pharmacy. 4th. ed. Filadelfia : Lea & Febiger; 1993.
- OECD-Environment Directorate, Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Guidance for the Conduct of Skin Absorption Studies, OECD series on testing and assessment. n. 28, 05 mar,[S.I.:s.n], 2004.
- Ortega GG, Netz PA. Fundamentos da físico-química. uma abordagem para ciências farmacêuticas. São Paulo: Artmed; 2002.
- Peng GM, Chiou WL. Analysis of drugs and others toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. J Chromatogr. 1990; 531: 3-50.
- Peparo AC. Estabilidade física e metodologia analítica para formulações farmacêuticas contendo cetoconazol. [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 2001.
- Pershing LK, Corlett J, Jorgensen C. In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38 (1): 90-5.
- Pharmapress. Uma publicação mensal de acesso magistral. Manipulação de Formulações com Cetoconazol. V-março/2006. [citado 2006 abr. 16]. Disponível em: <http://www.pharmapress.com.br>.
- Pharmaspecial- Informativo Técnico Hostacerin NCB. [citado 2005 jun 15]. Disponível em: <http://www.pharmaspecial.com.br/imagens/literatura>.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

- Santoyo S, Arellano A, Ygartua P, Martin C. *In vitro* percutaneous absorption of piroxicam through synthetic membranes and abdominal rat skin. *Pharm Acta Helv.* 1996; 71: 141-6.
- Sato MEO, Gomara F, Pontarolo R, Andreazza IF, Zaroni M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Rev Bras Ciên Farm.* 2007; 43: 195-204.
- Serra CHR. Avaliação biofarmacéutica de comprimidos contendo cefalexina: cinética de dissolução e bioequivalência. [Tese] São Paulo: Faculdade de Farmácia de São Paulo, USP; 1998.
- Shah VP, Elkins J, Seeyan L, Skelly JP. Determination of *in vitro* drug release from hydrocortisone creams. *Int J Pharm.* 1989; 53: 53-9.
- Shah VP, Flynn GL, Yacobi A, Maibach HI, Bom C, Fleischer NM, Franz TJ, Kaplan SA, Kawamoto J, Lesko LJ, Marty JP, Pershing LK, Schaefer H, Sequeira JA, Shrivastava SP, Wilkin J, Williams RL. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms – methods of evaluation of bioequivalence. *Pharm Res.* 1998; 15: 167-71.
- Skiba M, Skiba-Lahiani M, Marchais H, Duclos R, Arnaud P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. *Int J Pharm.* 2000; 198: 1-6.
- Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry*. 3rd. ed. Nova York : W.H. Freeman & Co.; 1995. 887 p.
- Tadros T. Application of rheology for assessment and a prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004; 108-109: 227-58.
- Tadros T, Izquierdo P, Esquema J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004; 108/109: 303-18.
- Tonzar AC. Medições de viscosidade e reologia em cosméticos. *Cosmet Toilet.* (Ed. Port.) 2006; 18: 56.
- U.S. FDA/CDER. Nonsterile Semisolid Dosage Forms – Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; *In vitro* Release Testing and In vivo Bioequivalence Documentation. 1997.
- Wittern KP, Ansmann A, Huttinger R, Billek D, Charlet E, Hoenen L, Kuczera K, Mottichke L, Quack J, Selb K, Umbach I, Wolf G. Stability testing of cosmetic emulsions. *Cosmet. Toilet.* 1985; 10: 33-9.
- Zatz JL. *Skin Permeation - Fundamentals and Application*. Carol Stream: Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993.