

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE GEL DE ABSORÇÃO PERCUTÂNEA  
CONTENDO ESTRADIOL**

Dissertação apresentada por  
Airton Monza da Silveira  
para obtenção de grau acadêmico  
de mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick

Porto Alegre, 1994

Dissertação apresentada e aprovada em 27 de Outubro de 1994,  
perante a comissão examinadora constituída por:

Prof. Dr. Elias Fattal  
Université Paris-Sud (Chatenay-Malabry)

Prof. Dr. George González Ortega  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Valquíria Oliveira Linck  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

S586d Silveira, Airton Monza da.  
Desenvolvimento de gel de  
absorção contendo estradiol./  
Airton Monza da Silveira.-Porto  
Alegre: UFRGS, 1994.-180p.:  
il., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS.  
Faculdade de Farmácia.

1. Estradiol. 2. Gel. 3. Absorção  
percutânea. 4. Desenvolvimento ga-  
lênico. I. Petrovick, Pedro Ros.  
II. Título.

CDU: 615.454

Bibliotecário responsável:  
Ivone Job Antunes

À

Fabiola, Marcelle e Isadora

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick, pela orientação, incentivo, amizade e sobretudo pelo exemplo profissional.

Aos Professores George Ortega e Valquíria Oliveira Linck, pela amizade, apoio e amparo nos momentos de necessidade.

À Prof. Dra. Poli Mara Spritzer, pela proposição do tema, orientação e atenção sempre a mim dispensada.

Ao Farmacêutico Francisco Lhullier, pela realização dos ensaios de doseamento do estradiol por fluorimunoensaio.

As Farmacêuticas Lorena Fratini e Ana Antunes, pelo auxílio, orientação e realização dos ensaios de avaliação microbiológica das formulações.

Ao Prof. Dr. Marco Araujo pela realização das análises térmicas.

Aos meus pais, Celso e Flávia, pela geração, criação e princípios.

À Margarete Oliveira, minha sogra, pela disposição e carinho.

À Fabíola Oliveira, pela compreesão e companhia, sem as quais tudo ficaria mais difícil.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, representados por Helder Teixeira e Angela Campos, por compartilhar de todas as dúvidas, problemas e alegrias.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que apesar de não terem sido citados, jamais serão esquecidos.

## **ABSTRACT**

The hormonal replacement therapy for menopausal symptoms intends the healing and prevention of osteoporosis, the decrease of the incidence of cardiovascular diseases as well the improvement of life quality, affording relief from any of a long list of subjective complaints.

The election of a transdermal estradiol formulation is due to its abilities to bypass the liver resulting adequate hormonal plasmatic levels. In addition, it is considerably simple to manufacture and to adapt to individual dosages.

This research aims the formulation of estradiol as an hydroalcoholic gel using different gelformers. The development and adaptation of methodologies to perform the physical, chemical and biological characterization of the formulated products were also realized.

Two of the formulated gels showed appropriate characteristics of consistence, spreading and skin permeation. They were prepared with carbomer (Carbopol 940 ) and hydroxyethylcellulose (Cellosize QP 100). Biological evaluation was performed by the essay of the uterusweight of castrated rats and by immunofluorescence assay. The statistical analysis showed no differences between the methods and gels.

The stability test for the two formulations yielded good physical stability results but the hydroxyethylcellulose gel showed significant estradiol degradation. Although the gels artificial membrane absorptions didn't differ when submited to difference contact times, it was detected a kind of relationship between the applied gel amount and the absorbed estradiol.

**KEYWORDS: ESTRADIOL, GEL, GALENIC DEVELOPMENT, CARBOMER, HYDROXYETHYL CELLULOSE, STABILITY, PERCUTANEOUS ABSORPTION**

## RESUMO

A reposição estrogênica na pós-menopausa revela-se através de benefícios na melhora da qualidade de vida, prevenção e cura da osteoporose, bem como na diminuição da incidência de doenças cardiovasculares.

A via percutânea apresenta grande interesse devido a fatores como, manutenção de níveis plasmáticos e eliminação da primeira passagem hepática, responsável pelo surgimento de efeitos colaterais adversos, aliados a relativa simplicidade de desenvolvimento e produção, facilidade na aplicação e versatilidade.

Neste trabalho foram viabilizadas formulações de géis hidroalcoólicos contendo estradiol com diferentes bases, adaptando e desenvolvendo metodologias para determinação de características físicas, químicas e tecnológicas, como espalhabilidade, consistência, biodisponibilidade, teor da substância ativa e conservantes, bem como ensaios preliminares de penetração na pele, e em membranas artificiais e de estabilidade física e química de estradiol e dos conservantes.

Verificou-se que dois dos géis desenvolvidos, com bases de carbômero (Carbopol 940®) e hidroxietilcelulose (Cellosize QP 100®), apresentaram características apropriadas no que diz respeito a consistência, espalhabilidade e promoção da penetração de estradiol através da pele. Esta foi avaliada através do desenvolvimento ponderal uterino de ratas castradas e determinação dos níveis séricos de estradiol por fluorimunoensaio, não havendo diferença significativa entre os produtos neste ensaio.

Ambas as formulações mostraram-se estáveis fisicamente, porém, o produto desenvolvido com base de hidroxietilcelulose apresentou degradação significativa de estradiol. Os ensaios de absorção de estradiol em membranas artificiais não diferenciou significativamente as formulações quanto ao tipo de base e tempo de exposição, observou-se entretanto, que existe uma relação entre a quantidade aplicada de gel e de estradiol absorvido.

**UNITERMOS:** ESTRADIOL, GEL, DESENVOLVIMENTO GALÊNICO, CARBÔMERO, HIDROXIETILCELULOSE, ESTABILIDADE, ABSORÇÃO PERCUTÂNEA.

## SUMÁRIO

	PÁGINA	
RESUMO	V	
ABSTRACT	VI	
LISTA DE TABELAS	XV	
LISTA DE FIGURAS	XXI	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XXV	
1	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1.1	RELEVÂNCIA DO TEMA	2
1.2	OBJETIVOS DO TRABALHO	4
1.3	REVISÃO DA LITERATURA	5
2	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	28
2.1	<b>MATERIAIS</b>	29
2.1.1	Matérias-primas	29
2.1.2	Reagentes, soluções e meios de cultura	29
2.1.3	Aparelhos e equipamentos	30
2.2	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS</b>	33
2.2.1	Carbômero	33
2.2.2	Carboximetilcelulose sódica	33
2.2.3	17 $\beta$ -Estradiol	34
2.2.4	Etanol	34
2.2.5	Hidroxietilcelulose	36
2.2.6	Metilparabeno	36
2.2.7	Polissorbato 20	37

	PÁGINA
2.2.8	Propilparabeno 37
2.3	DESENVOLVIMENTO DOS GÉIS 38
2.3.1	Bases de carbômero 38
2.3.2	Bases de carboximetilcelulose sódica 41
2.3.3	Bases de metilcelulose.. 42
2.3.4	Bases de hidroxietilcelulose 43
2.4	PRÉ-TESTE DE PERMEABILIDADE DE ESTRADIOL ATRAVÉS DA PELE 45
2.4.1	Delineamento do ensaio e preparação dos animais 45
2.4.2	Doseamento de estradiol 46
2.5	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE ESTRADIOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) 47
2.5.1	Ensaio preliminares 47
2.5.1.1	Preparo da solução padrão 47
2.5.1.2	Condições cromatográficas 47
2.5.2	Curva padrão de estradiol 48
2.5.3	Preparação das amostras de gel para análise por CLAE 48



	PÁGINA	
2.5.3.1	Preparação das amostras de géis de base de carbômero	48
2.5.3.2	Preparação de gel padrão com base de carbômero	49
2.5.3.3	Verificação da eficiência de extração de estradiol	49
2.5.3.4	Verificação da eficiência de extração de metilparabeno	49
2.5.3.5	Verificação da eficiência de extração de propilparabeno	50
2.5.3.6	Preparação das amostras de géis de base de hidroxietilcelulose	50
2.5.3.7	Preparação de gel padrão de estradiol com base de hidroxietilcelulose	50
2.5.3.8	Verificação da eficiência de extração de estradiol	51
2.5.3.9	Verificação da eficiência de extração de metilparabeno	51
2.5.3.10	Verificação da eficiência de extração de propilparabeno	52
2.6	DETERMINAÇÃO DA CONSISTÊNCIA	52
2.7	DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE	53
2.8	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	54
2.8.1	Contagem de microrganismos viáveis totais	54
2.8.2	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	55
2.9	AVALIAÇÃO DA LIODISPONIBILIDADE	56

	PÁGINA	
2.9.1	Célula de cedência	56
2.9.2	Testes preliminares	56
2.10	<b>PRÉ-TESTE DE ABSORÇÃO DE ESTRADIOL EM MEMBRANAS DE COLÓDIO COM DODECANOL..</b>	<b>58</b>
2.10.1	Determinação da absorção de estradiol de géis de base de carbômero	58
2.10.2	Determinação da absorção de estradiol de géis de hidroxietilcelulose	59
2.10.3	Determinação da absorção de estradiol de Oestrogel®	59
2.11	<b>ANÁLISE TÉRMICA</b>	<b>59</b>
2.11.1	Análise de substâncias isoladas e de suas misturas	59
2.11.2	Análise dos géis	59
2.12	<b>PRÉ-TESTE DE ESTABILIDADE</b>	<b>60</b>
2.12.1	Avaliação do teor de estradiol	60
2.12.1.1	Quantificação de estradiol, metilparabeno e propilparabeno em géis de carbômero	60
2.12.1.2	Quantificação de estradiol, metilparabeno e propilparabeno em géis de hidroxietilcelulose	61
2.12.2	Avaliação da espalhabilidade	61
2.12.3	Avaliação organoléptica	62
2.13	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>62</b>
3	<b>RESULTADOS</b>	<b>64</b>

	PÁGINA
3.1	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS</b> 65
3.1.1	Carbômero 65
3.1.2	Carboximetilcelulose sódica 65
3.1.3	Etanol 66
3.1.4	17 $\beta$ -estradiol 66
3.1.5	Hidroxietilcelulose 70
3.1.6	Metilparabeno 71
3.1.7	Polissorbato 20 71
3.1.8	Propilparabeno 71
3.2	<b>DESENVOLVIMENTO DOS GÉIS</b> 75
3.2.1	Observações 75
3.2.1.1	Bases de carbômero 75
3.2.1.2	Bases de carboximetilcelulose sódica 76
3.2.1.3	Bases de metilcelulose 77
3.2.1.4	Bases de hidroxietilcelulose 77
3.3	<b>PRÉ-TESTE DE PERMEABILIDADE DO ESTRADIOL ATRAVÉS DA PELE</b> 78
3.4	<b>CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)</b> 79
3.4.1	Ensaio preliminar 79
3.4.2	Curva padrão de estradiol 79
3.4.3	Verificação da eficiência de extração dos constituintes dos géis com base de carbômero 80

3.4.3.1	Verificação da eficiência de extração de estradiol	80
3.4.3.2	Verificação da eficiência de extração de metilparabeno	80
3.4.3.3	Verificação da eficiência de extração de propilparabeno	81
3.4.4	Verificação da eficiência de extração de substâncias de géis de base de hidroxietilcelulose	82
3.4.4.1	Verificação da eficiência de extração de estradiol	82
3.4.4.2	Verificação da eficiência de extração de metilparabeno	82
3.4.4.3	Verificação da eficiência de extração de propilparabeno	82
3.5	DETERMINAÇÃO DA CONSISTÊNCIA	83
3.6	DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE	84
3.7	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	88
3.8	AVALIAÇÃO DA LIODISPONIBILIDADE	89
3.9	PRÉ-TESTE DE ABSORÇÃO DE ESTRADIOL EM MEMBRANAS DE COLÓDIO COM DODECANOL	89
3.9.1	Doseamento de estradiol em membranas de colódio após 3 horas em contato com géis de hidroxietilcelulose	89

3.9.2	Doseamento de estradiol em membranas de colódio após 4 horas em contato com géis de hidroxietilcelulose	90
3.9.3	Doseamento de estradiol em membranas de colódio após 3 horas em contato com géis de carbômero	91
3.9.4	Doseamento de estradiol em membranas de colódio após 4 horas em contato com géis de carbômero	92
3.9.5	Doseamento de estradiol em membranas de colódio após 3 horas em contato Oestrogel®	93
3.9.6	Doseamento de estradiol em membranas de colódio após 4 horas em contato Oestrogel®	94
3.10	<b>ANÁLISE TÉRMICA</b>	95
3.10.1	Análise de substâncias isoladas	95
3.10.2	Análise de misturas de matérias-primas	96
3.10.3	Análise de géis de carbômero e hidroxietilcelulose	98
3.11	<b>PRÉ-TESTE DE ESTABILIDADE</b>	99
3.11.1	Avaliação organoléptica	99
3.11.2	Quantificação de estradiol, metilparabeno e propilparabeno em géis de carbômero	100
3.11.3	Quantificação de estradiol, metilparabeno e propilparabeno em géis de hidroxietilcelulose	101
3.11.4	Espalhabilidade de géis de carbômero	103
3.11.5	Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose	104

## PÁGINA

4	<b>DISCUSSÃO</b>	119
5	<b>CONCLUSÕES</b>	165
6	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	167

## SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xxv
1 <b>INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 <b>RELEVÂNCIA DO TEMA</b>	2
1.2 <b>OBJETIVOS DO TRABALHO</b>	4
1.3 <b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	5
2 <b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	28
2.1 <b>MATERIAIS</b>	29
2.1.1 <b>Matérias-primas</b>	29
2.1.2 <b>Reagentes, soluções e meios de cultura</b>	29
2.1.3 <b>Aparelhos e equipamentos</b>	30
2.2 <b>CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS</b>	33
2.2.1 <b>Carbômero</b>	33
2.2.2 <b>Carboximetilcelulose sódica</b>	33
2.2.3 <b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b>	34
2.2.4 <b>Etanol</b>	34
2.2.5 <b>Hidroxietilcelulose</b>	36
2.2.6 <b>Metilparabeno</b>	36
2.2.7 <b>Polissorbato 20</b>	37

## LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
1 Testes utilizados para carbômero	65
2 Testes utilizados para CMC Na	65
3 Testes utilizados para etanol	66
4 Distribuição granulométrica do - 17 $\beta$ -estradiol (Sigma®)	69
5 Distribuição granulométrica do - 17 $\beta$ -estradiol micronizado	70
6 Testes utilizados para HEC	70
7 Testes utilizados para polissorbato 20	71
8 Valores de peso uterino e níveis de estradiol (E2) de ratas	78
9 Concentrações de soluções de estradiol em acetonitrila com respectivas áreas dos picos referentes ao estradiol determinadas por CLAE	79
10 Áreas e percentual de extração (PE) de estradiol (E2) de géis de carbômero	80
11 Áreas e percentual de extração (PE) de metilparabeno de géis de carbômero	80
12 Áreas e percentual de extração (PE) de propilparabeno de géis de carbômero	81
13 Áreas e percentual de extração (PE) de estradiol (E2) de géis de hidroxietilcelulose	81
14 Áreas e percentual de extração (PE) de metilparabeno de géis de hidroxietilcelulose	82



- 15 Áreas e percentual de extração (PE) de propilparabeno  
de géis de hidroxietilcelulose 82
- 16 Consistência das bases  
de hidroxietilcelulose 2%  
e carbômero 0,5%,  
determinadas com penetrômetro  
à temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C) 83
- 17 Consistência dos géis de estradiol (E2)  
com as diferentes bases 83
- 18 Valores de espalhabilidade (EI)  
da base de carbômero  
em função do peso adicionado 84
- 19 Valores de espalhabilidade (EI) de  
gel de carbômero  
em função do peso adicionado 85
- 20 Valores de espalhabilidade (EI)  
obtidos com a base de hidroxietilcelulose 2 %  
em função do peso adicionado 86
- 21 Valores de espalhabilidade (EI)  
de gel de hidroxietilcelulose 2 %  
em função do peso adicionado 87
- 22 Microrganismos viáveis totais  
(m.v.t.) e *Staphylococcus*  
*aureus* (*S.aureus*) nos géis de  
carbômero e Hidroxietilcelulose 88
- 23 Quantidade de estradiol (Q) em  
membranas de

- colódio em contato durante 3 h  
com géis de hidroxietilcelulose 89
- 24 Relação  $\Delta E$  entre a quantidade aplicada de  
gel de hidroxietilcelulose ( $G_a$ ) e a quantidade de  
estradiol absorvida ( $Q_a$ ) para contato de 3h 89
- 25 Quantidade de estradiol ( $Q$ ) em membranas de  
colódio em contato com géis de hidroxietilcelulose  
durante 4 horas 90
- 26 Relação  $\Delta E$  entre a quantidade aplicada de  
gel de hidroxietilcelulose ( $G_a$ ) e a quantidade  
absorvida de estradiol( $Q_a$ ) para 4h de contato 90
- 27 Quantidade de estradiol ( $Q$ ) em membranas de  
colódio em contato com géis de carbômero  
durante 3 horas 91
- 28 Relação  $\Delta E$  entre a quantidade aplicada de  
gel de carbômero ( $G_a$ ) e a quantidade de  
estradiol absorvida ( $Q_a$ ) para 3h de contato 91
- 29 Quantidade de estradiol ( $Q$ ) em membranas de  
colódio em contato com géis de carbômero  
durante 4 horas 92
- 30 Relação  $\Delta E$  entre a quantidade aplicada de  
gel de carbômero ( $G_a$ ) e a quantidade de  
estradiol absorvida ( $Q_a$ ) para 4h de contato 92
- 31 Quantidade de estradiol ( $Q$ ) em membranas de  
colódio em contato com Oestrogel <sup>®</sup>  
durante 3 horas 93
- 32 Relação  $\Delta E$  entre a quantidade aplicada de  
Oestrogel <sup>®</sup> ( $G_a$ ) e a quantidade

	absorvida de estradiol (Qa) para 3h de contato	93
33	Quantidade de estradiol (Q) em membranas de colódio em contato com Oestrogel <sup>®</sup> após 4 horas	94
34	Relação $\Delta E$ entre a quantidade aplicada de Oestrogel <sup>®</sup> (Ga) e a quantidade absorvida de estradiol (Qa) para 4h de contato	94
35	Percentual de estradiol em géis de carbômero em relação ao gel de carbômero no tempo zero	100
36	Percentual de metilparabeno em géis de carbômero em relação ao gel de carbopol no tempo zero	100
37	Percentual de propilparabeno em géis de carbômero em relação ao gel de carbômero no tempo zero	101
38	Percentual de estradiol em géis de hidroxietilcelulose em relação ao gel de hidroxietilcelulose no tempo zero	101
39	Percentual de metilparabeno em géis de hidroxietilcelulose em relação ao gel de hidroxietilcelulose no tempo zero	102
40	Percentual de propilparabeno em géis de hidroxietilcelulose em relação ao gel de hidroxietilcelulose no tempo zero	102
41	Valores de espalhabilidade (Ei) de gel de carbômero em função do peso adicionado no tempo zero	103
42	Valores de espalhabilidade (Ei) de gel de hidroxietilcelulose em função do peso adicionado no tempo zero	104

43	Espalhabilidade de géis de carbômero armazenados durante 4 dias	105
44	Espalhabilidade de géis de carbômero armazenados durante 8 dias	106
45	Espalhabilidade de géis de carbômero armazenadas durante 12 dias	107
46	Espalhabilidade de géis de carbômero armazenados durante 16 dias	108
47	Espalhabilidade de géis de carbômero armazenados durante 20 dias	109
48	Espalhabilidade de géis de carbômero armazenados durante 24 dias	110
49	Espalhabilidade de géis de carbômero armazenadas durante 28 dias	111
50	Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 4 dias	112
51	Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 8 dias	113
52	Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 12 dias	114
53	Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 16 dias	115
54	Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 20 dias	116
55	Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 24 dias	117
56	Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 28 dias	118

- 57 Características entre os picos no sistema cromatográfico utilizado para a determinação quantitativa em géis de carbômero 135
- 58 Características entre os picos no sistema cromatográfico utilizado para a determinação quantitativa em géis de carbômero 138
- 59 Testes utilizados e resultados do tratamento estatístico do percentual de absorção de estradiol HEC, de carbômero e de Oestrogel<sup>®</sup> submetidos ao pré-teste de absorção em membranas de dodecanol 146
- 60 Coeficientes de difusão do estradiol nos géis de carbômero, HEC e Oestrogel<sup>®</sup>, em contato com membranas durante 3h e 4 h 147
- 61 Testes utilizados e resultados do tratamento estatístico dos coeficientes de difusão (D) de estradiol nos géis de carbômero, hidroxietilcelulose e Oestrogel 148
- 62 Deslocamentos dos pontos de fusão ( $\Delta$ PF) e suas variações percentuais ( $\Delta$  %) para as misturas binárias de propilparabeno (PP), metilparabeno (MP) e estradiol (E2) 150
- 63 Testes utilizados e resultados do tratamento estatístico dos índices criados com a regressão polinomial de segunda ordem com os valores de espalhabilidade dos géis submetidos ao pré-teste de estabilidade 156

64	Testes utilizados e resultados do tratamento estatístico dos teores de estradiol metilparabeno e propilparabeno em géis de HEC e carbômero submetidos ao pré-teste de estabilidade	160
----	--	-----

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
1 Estrutura química do 17 $\beta$ -estradiol	5
2 Rota de biossíntese dos estrógenos	7
3 Metabolismo estrogênico	8
4 Estrutura esquemática da pele	15
5 Dispositivo para determinação da penetração de substâncias em membranas artificiais, proposto por NEUBERT	25
6 Desenho esquemático da célula de cedência	56
7 Representação esquemática dos procedimentos estatísticos.	63
8 Espectro no infravermelho do 17 $\beta$ -estradiol em pastilhas de KBr	67
9 Espectro na região ultravioleta de 17 $\beta$ -estradiol em metanol	68
10 Espectro no infravermelho do metilparabeno em pastilhas de KBr	72
11 Espectro no infravermelho do propilparabeno em pastilhas de KBr	73
12 Espectro na região ultravioleta do metilparabeno em NaOH 0,1M	74
13 Espectro na região ultravioleta do propilparabeno em NaOH 0,1M	74

- 14 Termograma do estradiol  
(20-200 °C, velocidade de varredura  
=20°C/min, amostra = 5,0 mg) 96
- 15 Termograma do metilparabeno  
(20-200 °C, velocidade de varredura  
=20°C/min, amostra = 5,0 mg) 96
- 16 Termograma do propilparabeno  
(20-200 °C, velocidade de varredura  
=20°C/min, amostra = 5,0 mg) 97
- 17 Termograma da mistura de estradiol  
e metilparabeno (20-200 °C,  
velocidade de varredura  
=20°C/min, amostra = 5,0 mg) 97
- 18 Termograma da mistura de  
estradiol com propilparabeno  
(20-200 °C, velocidade de varredura  
=20°C/min, amostra = 5,0 mg) 97
- 19 Termograma da mistura de metilparabeno e  
propilparabeno (20-200 °C,  
velocidade de varredura  
=20°C/min, amostra = 5,0 mg) 98
- 20 Termograma da mistura de estradiol,  
metilparabeno e propilparabeno  
(20-200 °C, velocidade de varredura  
=20°C/min, amostra = 5,0 mg) 99



21	Termograma de gel contendo estradiol com base de carbômero (20-200 °C, velocidade de varredura =20°C/min, amostra = 5,0 mg)	99
22	Termograma de gel contendo estradiol com base de hidroxietilcelulose (20-200 °C, velocidade de varredura =20°C/min, amostra = 5,0 mg)	100
23	Distribuição granulométrica de estradiol Sigma®	122
24	Distribuição granulométrica de estradiol micronizado	123
25	Peso uterino de ratas castradas tratadas com géis contendo estradiol com bases de hidroxietilcelulose, carbômero e Oestrogel® com aplicação tópica, injeção subcutânea de valerato de estradiol e grupo controle	129
26	Níveis plasmáticos de estradiol (pg/ml) determinados por fluorimunoensaio em ratas castradas tratadas com géis contendo estradiol com bases de hidroxietilcelulose, carbômero e Oestrogel® com aplicação tópica, injeção subcutânea de valerato de estradiol e grupo controle	130

## PÁGINA

27	Curva padrão de estradiol obtida por CLAE	132
28	Coeficiente de variação das áreas dos picos de estradiol em função da concentração	133
29	Cromatogramas de padrões de estradiol (c), metilparabeno (a), propilparabeno ( b) e gel de carbômero (d) em acetonitrila	136
30	Cromatogramas de padrões de estradiol (c), metilparabeno (b), propilparabeno (a) e gel de hidroxietilcelulose (d) em acetonitrila/água (6:4)	139
31	Espalhabilidade de géis de carbômero (A)e HEC (B) em função do peso adicionado	141
32	Índices de absorção de estradiol em relação à quantidade aplicada de gel nos diferentes tempos de exposição.	145
33	Índice A0 em géis de hidroxietilcelulose em função do tempo e temperatura de armazenamento	152
34	Índice A1 em géis de hidroxietilcelulose em função do tempo e temperatura de armazenamento	153

## PÁGINA

35	Índice A2 em géis de hidroxietilcelulose em função do tempo e temperatura de armazenamento	153
36	Índice A0 em géis de carbômero em função do tempo e temperatura de armazenamento	154
37	Índice A1 em géis de carbômero em função do tempo e temperatura de armazenamento	154
38	Índice A2 em géis de carbômero em função do tempo e temperatura de armazenamento	155
39	Teores de estradiol em gel de carbômero armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas	156
40	Teores de metilparabeno em gel de carbômero armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas	157
41	Teores de propilparabeno em gel de carbômero armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas	157
42	Teores de estradiol em gel de hidroxietilcelulose armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas	158

43	Teores de metilparabeno em gel de hidroxietilelulose armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas	158
44	Teores de propilparabeno em gel de hidroxietilelulose armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas	159
45	Teor de estradiol em função do tempo de estocagem de géis de hidroxietilcelulose armazenados a 45 °C	161
46	Logarítmo decimal do teor de estradiol em função do tempo de estocagem de géis de hidroxietilcelulose armazenados a 45°C	162
47	Inverso do teor de estradiol em função do tempo de estocagem de géis de hidroxietilcelulose armazenados a 45 °C	163

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	análise de variância
AUFS	absorbance units of full scale (unidades de absorvância de escala total)
C8	octilsilano
C18	octadecilsilano
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	carboximetilcelulose
D	coeficiente de difusão
E1	estriol
E2	17 $\beta$ -estradiol
EC	etilcelulose
E <sub>i</sub>	espalhabilidade
$\Delta E$	relação entre quantidade aplicada de gel e quantidade de 17 $\beta$ -estradiol absorvido
FSH	hormônio folículo estimulante
G <sub>a</sub>	quantidade de gel aplicada sobre membranas de colóide
HEC	hidroxietilcelulose
HPC	hidroxipropilcelulose
IR	infravermelho
K-W	kruskal-wallis
LH	hormônio luteinizante
MC	metilcelulose
MP	metilparabeno

m.t.v.	microrganismos viáveis totais
M-W-W	Mann-Whitney-Wilcoxon
NR	não realizado
PE	percentual de extração
PEG	polietilenoglicol
$\Delta E$	deslocamento do ponto de fusão
Q	quantidade de estradiol
Qa	quantidade de estradiol absorvida por membrana de colóide
RE	reposição estrogênica
STT	sistemas terapêuticos transdérmicos
TRH	terapia de reposição hormonal
UFC	unidade formadora de colônia
UV	ultravioleta

## **INTRODUÇÃO**

## 1.1. RELEVÂNCIA DO TEMA

A menopausa, caracterizada por uma série de sinais e sintomas, afeta sintomaticamente grande parte das mulheres. Neste período, ocorre um dramático declínio na produção de estrógenos devido à perda da função ovariana. A diminuição dos níveis circulantes do estradiol, o mais importante dos estrógenos, acarreta instabilidade vasomotora, atrofia do epitélio urogenital, desequilíbrio fisiológico e perda de massa óssea.

A reposição estrogênica na pós-menopausa tem se destacado pelo grande número de benefícios na melhora da qualidade de vida, alívio de sintomas, diminuição da perda de massa óssea e efeito cardioprotetor.

As vias de administração correntemente utilizadas neste caso, são a oral, parenterais, tais como intramuscular e subcutânea, e por outras não enterais, como vaginal, cutânea, intranasal e transdérmica. A via oral apresenta uma baixa biodisponibilidade, necessitando do aporte de quantidade suprafisiológica do hormônio. Isto ocasiona, no fígado, a produção de metabólitos quando da primeira passagem hepática, como substrato de renina e angiotensina, os quais podem promover o aparecimento de fenômenos tromboembólicos e alterações na pressão arterial sistêmica. As vias vaginal e intramuscular apresentam grande variação da biodisponibilidade, com a alternância de fases hiper e hipoestrogênica.

Segundo BASDEVANT (1987) a grande tendência para a reposição estrogênica são as vias não enterais, entre elas a transdérmica, que a exemplo de outras vias, lançam o estrógeno diretamente na circulação sanguínea, mimetizando o organismo feminino durante o período reprodutivo, eliminando também a primeira passagem hepática. Desta



forma pode-se administrar quantidades bem menores do hormônio sem observar a formação dos metabólitos responsáveis pelos efeitos secundários.

A obtenção de efeito sistêmico através da via transdérmica pode seguir, no mínimo, duas estratégias, baseadas nos sistemas que contêm a substância ativa. O primeiro modelo baseia-se num sistema reservatório variável, constituído por dispersões não coerentes, emulsões, ou coerentes, géis. O grau de penetração é determinado pela composição do reservatório. O emprego deste sistema para o estradiol mostrou níveis estáveis, encontrando-se, atualmente no comércio Europeu, uma formulação de gel hidroalcoólico, denominada Oestrogel<sup>®</sup> da empresa francesa Besins / Iscovescu. A metodologia simples de produção, aliada à facilidade de administração e à possibilidade de adaptação de dosagem fazem com que este tipo de formulação ganhe especial interesse.

A seguinte estratégia prende-se ao emprego de sistemas terapêuticos transdérmicos (STT). Neste caso o sistema é compreendido por um reservatório fixo, contendo a substância ativa e por um sistema de controle de liberação, que pode ser a matriz que constitui o reservatório ou uma membrana seletiva. No mercado farmacêutico encontram-se produtos como o TTS Estraderm<sup>®</sup> (CIBA-Geygi) e o Estradiol Patch<sup>®</sup> (Ortho-Cilag). O desenvolvimento e a produção de STT, exigindo tecnologia altamente especializada, difícil adaptação de dosagem e o alto custo de aquisição são desvantagens inerentes a estes sistemas. A obtenção de níveis constantes do hormônio por largo período de tempo, por outro lado, constitui seu principal ponto positivo.

Tendo em vista estes fatos, fica evidente a importância do desenvolvimento de formas farmacêuticas de aplicação tópica que aliem

simplicidade de produção, baixo custo e eficiência para o tratamento dos sinais e sintomas inerentes à menopausa.

## **1.2. OBJETIVOS DO TRABALHO**

- Viabilizar formulações de géis contendo estradiol para aplicação tópica e atividade sistêmica;
- Adaptar e desenvolver métodos de determinação qualitativa e quantitativa da substância ativa como matéria-prima e nas formulações;
- Verificar as características da formulação no que diz respeito a estabilidade e à biodisponibilidade;
- Avaliar a penetração de estradiol através da pele, utilizando ratos como modelo animal.

### 1.3 - REVISÃO DA LITERATURA

A menopausa, período em que ocorre cessação da menstruação devido a perda da função ovariana, é acompanhada de uma série de sinais e sintomas que podem ser compreendidos como climatério (RUDY, 1990). Clinicamente a menopausa é caracterizada por uma constelação de sintomas de natureza endocrinológica, somática e fisiológica (LAUFER, 1983; RUDY, 1990). Neste período ocorre um dramático declínio na produção de estrógenos, que começa na perimenopausa, alguns anos antes da última menstruação, e conduz a um aumento nos níveis circulantes do hormônio folículo estimulante (FSH).

Com a perda da função ovariana, o estradiol, o mais importante estrógeno, deixa de ser produzido normalmente. Sintetizado pelas células da granulosa a partir dos precursores androgênicos formados pelas células da teca (MURAD, 1991), é conhecido quimicamente como *estra - 1, 3, 5, (10) - trieno - 3, 17 $\beta$  - diol*, apresentando como sinônimos os termos *17 $\beta$  - diol* e *E<sub>2</sub>* e outros menos usuais como *hormônio diidrofolicular*, *diidroteelina*, etc. (SALOLE, 1990) (figura 1).

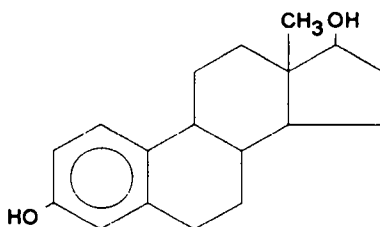


Figura 1 - Estrutura química do 17  $\beta$ -estradiol.

Os estrógenos, e o estradiol por consequência, têm como principal função fisiológica promover a proliferação celular e o crescimento dos tecidos dos órgãos sexuais e de outros tecidos relacionados à reprodução. O estradiol apresenta efeito sobre o útero e órgãos sexuais externos, promovendo a maturação e algumas transformações que se manifestam por aumentar a resistência ao traumatismo e às infecções. Atua também sobre as mamas, causando o desenvolvimento do estroma, crescimento de ductos e deposição de gorduras. Existe também conhecida ação sobre a atividade osteoblástica, fazendo com que o crescimento feminino seja bastante rápido durante vários anos. Outros efeitos de menores consequências também devem ser lembrados, como a promoção da deposição de proteínas, metabolismo e deposição de gorduras sobre a pele, sobre o equilíbrio eletrolítico e ainda algumas funções intracelulares (GUYTON, 1989).

A diminuição de estradiol circulante manifesta-se através dos mais diferentes sinais e sintomas, devido à presença de receptores estrogênicos em diversos tecidos do corpo. Alguns dos principais sintomas podem ser caracterizados através de (RUDY, 1990; MacLENNAN, 1991):

- Instabilidade vasomotora: fogachos com duração de 5 a 10 minutos acompanhados de sudorese e queda da temperatura corporal;
- atrofia do epitélio urogenital, ressecamento da mucosa urogenital, conduzindo a irritações, disúria e freqüentemente exacerbação do relaxamento pélvico, onde o maior sinal é a incontinência urinária;
- desequilíbrio psicológico, uma conexão causal entre estes sintomas e a deficiência estrogênica é de difícil comprovação. Entretanto, pode-se observar dramática e permanente melhora em pacientes quando tratadas com reposição estrogênica. Os principais sintomas são insônia, cansaço, fragilidade emocional,

depressão, que pode ser acompanhada de tendências suicidas, confusão e perda da memória;

- perda de massa óssea começa bem antes da menopausa, mas é grandemente acelerada nesta fase. Os sintomas decorrentes da perda da massa óssea são fraturas vertebrais, pélvicas e nos pulsos, perda de peso, e dores.

Biossinteticamente o estradiol é produzido a partir da aromatização da androstenodiona, tendo como precursores diretos estrona e/ou testosterona (figura 2).

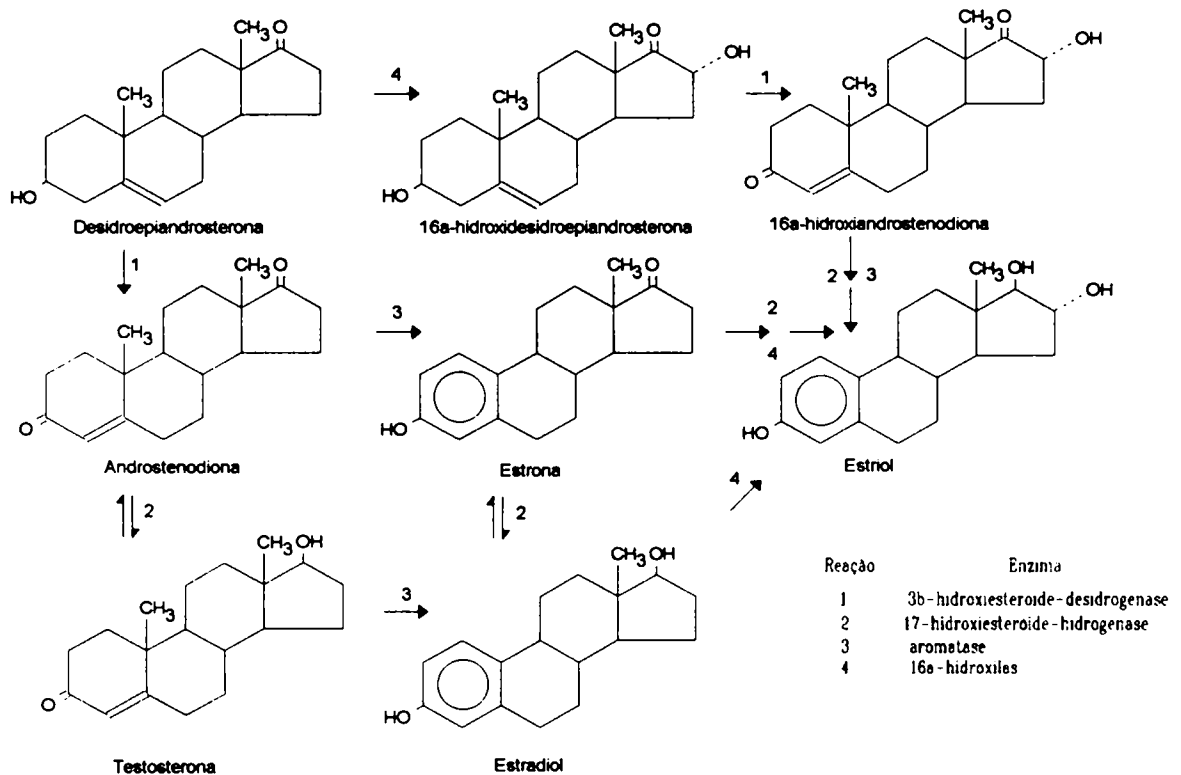


Figura 2 - Rota de biossíntese dos estrógenos.

O metabolismo dos estrógenos é representado por múltiplas transformações as quais podem ser observadas na figura 3, com as respectivas razões de conversão entre estradiol/estrona e outros derivados.

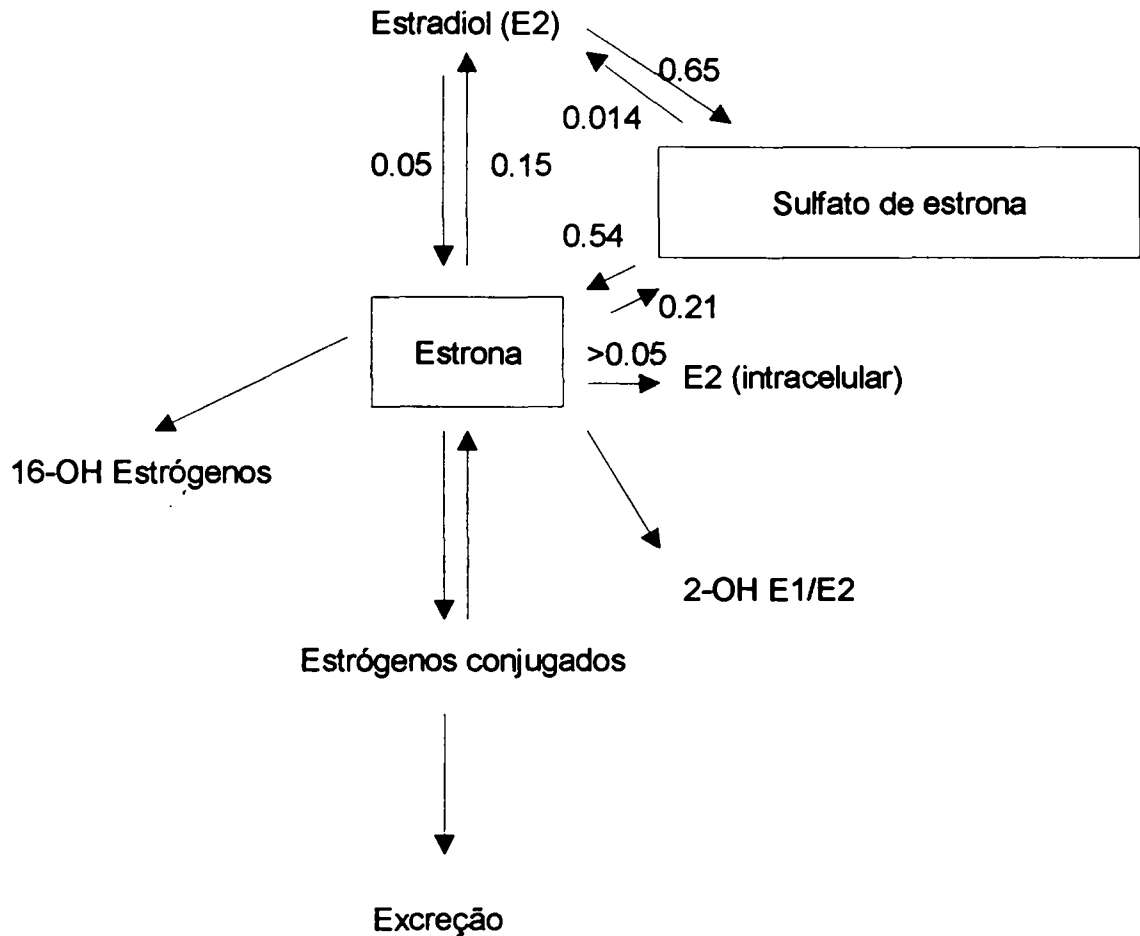


Figura 3 - Metabolismo estrogênico.

A reposição estrogênica no climatério é terapia consagrada devido à grande gama de benefícios que leva aos seus pacientes. Inúmeros trabalhos relatam a eficácia deste tipo de tratamento no alívio de sintomas específicos (vaginite atrófica), na melhora da qualidade de vida (amenizando fogachos e desequilíbrios emocionais), reduzindo a perda da massa óssea (prevenindo a osteoporose) e ainda diminuindo a incidência de doenças

cardiovasculares (BARDETT-CONNOR, 1993; BASDEVANT, 1988; CHETKOWISKI, 1988; ETTINER, 1988; LAUFER, 1983; LIGNIERES, 1986; LOBO, 1987; MacLENNAN, 1991; MILLER-BASS, 1990; OSÓRIO, 1992; RUDY, 1990; WEHBE, 1992). Segundo RUDY (1990), a reposição estrogênica pode aumentar em diversos anos de vida, devido somente a diminuição da incidência de fraturas ósseas, sem levar em conta um dos mais importantes efeitos que é a diminuição de doenças cardiovasculares, cujos riscos são reduzidos em até 50%

Deve-se ter bem claro que a reposição estrogênica pode conduzir a formação de carcinoma do endométrio, porém quando associada a progestágenos este risco é prevenido. Da mesma forma, o medo do surgimento do câncer de mama deve ser descartado, uma vez que o uso de anticoncepcionais, que possuem uma maior dose de estrógenos que na reposição estrogênica, não conduz a formação deste tipo de câncer (RUDY, 1990; MacLENNAN, 1991). Outros efeitos colaterais que podem estar relacionados com a reposição de estrógenos são a colecistite e doenças tromboembólicas e que devem ser levadas em conta no momento da escolha da terapêutica.

A via de administração e a substância ativa são escolhidas em função da potência relativa e do perfil biofarmacêutico de cada formulação. Via de regra o estradiol é o mais potente dos estrógenos, sendo cerca de 12 vezes mais potente que a estrona e aproximadamente 80 vezes mais ativo que o estriol (GUYTON, 1989). As moléculas sintéticas como o estilbestrol têm potências semelhantes ou inferiores ao estradiol (LIMA, 1991) e o etinilestradiol com uma potência relativa muito maior que o estradiol, porém pouco usado na reposição estrogênica, sendo utilizado em combinações de contraceptivos orais (RUDY, 1990).

A via oral tem sido a mais comumente usada na administração de estrógenos, porém, os estrógenos naturais apresentam baixa biodisponibilidade devido à peculiaridades na absorção intestinal e no metabolismo hepático (SPRITZER, 1992). Os humanos são protegidos naturalmente por mecanismos enzimáticos intestinais e hepáticos frente aos esteróides naturais contidos na alimentação, principalmente nas carnes de animais adultos e, particularmente, nas fêmeas gestantes (BASDEVANT, 1988). Desta forma o estradiol ingerido é metabolizado em mais de 70 % à estrona. Esta mistura estradiol / estrona é transportada para o fígado através do sistema porta onde se ligarão a receptores estrogênicos capazes de captar, reter e concentrar estes estrógenos. Posteriormente, estes estrógenos sofrem uma série de transformações sendo totalmente inativados, evitando, de forma eficaz, os efeitos de absorção alimentar de estrógenos naturais. Apesar de todos os mecanismos de inativação dos estrógenos pela via oral, a estrogoterapia por esta via ainda permite a obtenção de níveis terapêuticos, às custas entretanto, de um certo número de efeitos secundários, como perturbações do metabolismo de lipoproteínas, alterações de fatores de homeostase, síntese aguda de diversas proteínas hepáticas, tais como a renina e a angiotensina (BASDEVANT, 1988; LIGNIERES, 1986; MURAD, 1991). Todas estas perturbações no metabolismo hepático estão associadas a uma incidência aguda de patologias hipertensivas e tromboembólicas, ainda que não sejam conhecidos precisamente os mecanismos fisiopatológicos (CHETKOWSKI, 1986).

A via parenteral é utilizada, visando assim evitar o metabolismo de primeira passagem hepática. A reposição estrogênica por vias alternativas tem sido feita pelas vias vaginal, cutânea, sublingual, nasal, intramuscular e subcutânea. O estradiol administrado por estas vias alcança níveis superiores ao da estrona (inverso da relação com a administração oral), fazendo com que os efeitos adversos não sejam observados.



A via vaginal apresenta uma grande variação na biodisponibilidade em decorrência da forma farmacêutica e dos veículos utilizados (anel vaginal, óvulos, comprimidos, cremes). Rapidamente obtém-se níveis plasmáticos elevados do hormônio que sofrem um gradual decréscimo em cerca de 12 horas. A terapia prolongada por esta via faz com que ocorra a diminuição progressiva da absorção devido a alterações na estrutura da parede vaginal. A aceitação por parte dos pacientes ainda é limitada e também não são conhecidos os efeitos a longo prazo sobre a focalização do fluxo estrogênico sobre a vagina e colo uterino (SPRITZER, 1992; LOBO, 1987; BASDEVANT, 1988).

A via intramuscular acarreta alternância de fases hiper e hipo estrogênica, que não são recomendáveis para tratamentos prolongados. Os implantes subcutâneos também apresentam grandes flutuações da biodisponibilidade (BASDEVANT, 1988). A via intranasal libera estrógenos extremamente bem, mas a dissipação dos níveis de fármacos oscila tanto quanto a administração intramuscular. Outra via de administração ainda pesquisada é a sublingual, a qual resulta em substanciais oscilações nos níveis de estrógenos. possivelmente por ocorrer em paralelo uma combinação das vias oral e sublingual (LOBO, 1987).

BASDEVANT (1987) afirma que a tendência para a reposição estrogênica são as vias alternativas, em especial a transdérmica. A via transdérmica tem sido muito estudada (BALFOUR, 1990; BERBA, 1990; CHETKOWISK, 1988; JUDD, 1987; MacCARTHY, 1992; MILLER-BASS, 1990; STEVENSON, 1990; SITRUK-WARE, 1989; SCOTT, 1991). Os sistemas transdérmicos de estradiol são de particular interesse quando se deseja a manutenção de níveis de estradiol e estrona. Os efeitos biológicos dos patches de estradiol foram estudados por CHETKOWSKI (1986) e JUDD (1987) no que diz respeito a níveis de estradiol (E2), estrona (E1), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), superfície celular vaginal, níveis

urinários de cálcio, creatinina e hidroxiprolina, bem como os fatores de coagulação e lipídeos e não foram observadas variações significativas destes parâmetros, comprovando sua inocuidade.

STEVENSON (1990) avaliou o efeito da reposição estrogênica oral e transdérmica em relação à densidade óssea, concluindo que a terapia transdérmica é tão eficiente quanto a oral, sendo efetiva na prevenção da osteoporose.

Um dos maiores problemas que podem levar a interrupção do tratamento pela via transdérmica utilizando sistemas terapêuticos transdérmicos (STT) são as reações cutâneas, como desconforto, eritema, prurido, erupções, endurecimento e pigmentação residual. BALFOUR (1990) afirma que estas reações ocorrem numa frequência de 24 a 40 % dos pacientes, tendo sido observadas reações severas em 2,5 a 7,2 % dos casos (pústulas e pruridos intensos) que, obrigatoriamente conduzem à interrupção do tratamento. Segundo MacCARTHY (1992) este problema parece ser mais grave ainda em locais com clima quente e úmido, que além de proporcionarem o surgimento de reações na pele, fazem com que seja desenvolvida uma forte secreção de líquidos sobre o patch resultando na perda da adesão.

SCOTT (1991) observou que pacientes tratadas com STT Estraderm® 0,050 mg apresentaram uma pequena diminuição nos níveis plasmáticos de E2 com o passar dos dias, equivalente a um declínio de 50,3 a 28,2 pg / ml durante os três dias de uso, podendo ser problemático.

A administração de formulações tópicas com absorção sistêmica, a exemplo de outras vias não enterais evita a primeira passagem hepática, minimizando assim o surgimento de efeitos secundários adversos. Diversos autores têm trabalhado no sentido de caracterizar os efeitos biológicos do estradiol em formulações para aplicação tópica e ação sistêmica. LIGNIERES e col. (1986) fizeram uma comparação entre a terapia de reposição hormonal

(TRH) pelas vias oral e percutânea, observando que entre outras determinações, os níveis de estradiol são mantidos elevados durante o tratamento, bem como gonadotrofinas, LH e FSH sofrem uma redução. A partir de tais dados, concluíram que estas vias são eficientes na TRH. SCOTT e col. (1991), estabeleceram um paralelo entre TRH com gel percutâneo, STT e estradiol micronizado (via oral), no que diz respeito à farmacocinética, afirmando que a administração percutânea de Oestrogel ® resulta em níveis estáveis de E2 e E1, bem como a relação entre eles que iguala-se à razão E2/E1 na mulher no período fértil.

Estudos do efeito da reposição estrogênica (RE) nos níveis tensionais e perfis metabólicos e hormonais em mulheres hipertensas foram realizados por OSÓRIO e col. (1992), onde verificaram que a reposição estrogênica pela via percutânea não demonstrou alterações nos níveis plasmáticos de proteínas hepáticas, consideradas como marcadores específicos da ação estrogênica. Os níveis tensionais observados antes e durante o tratamento mostraram-se estáveis, sugerindo que o tratamento por esta via é seguro, podendo ser utilizado em pacientes hipertensas.

A via percutânea apresenta especial interesse na TRH, devido à facilidade de administração do medicamento. Dependendo do veículo da formulação tem-se quase que instantaneamente a sensação de limpeza, sem que nada manche ou grude nas roupas da paciente (MILLER-BASS, 1990). Isto pode ser observado com géis contendo estradiol.

A importância do estudo da absorção percutânea de fármacos reside na crescente utilização da via transdérmica para obtenção de efeitos sistêmicos, devido às não raras contaminações ocupacionais por esta via e também pela utilização de medicamentos de uso tópico que podem ter algum efeito sistêmico indesejável caso ultrapassem a barreira cutânea.

A pele é o maior órgão do corpo humano e está constantemente exposto a numerosos agentes físicos e químicos, tais como novas substâncias sintéticas, gases, líquidos tóxicos, detritos industriais, ambientais e de pesquisa que caso penetrem no organismo, podem conduzir a efeitos tóxicos sistêmicos. Observa-se assim, uma das principais funções da pele, a proteção. Outras funções essenciais devem ser lembradas, como a termorregulação, sensibilidade (táctil, pressórica, etc.), regulação da perda de água, proteção contra radiações, etc.

O revestimento cutâneo de um adulto cobre em média uma área de 2 m<sup>2</sup> e recebe cerca de um terço do sangue circulante do organismo (SITRUK-WARE, 1989). Microscopicamente, a pele é um órgão composto de epiderme, derme e hipoderme (figura 4). A epiderme é caracterizada pela ausência de fluxo sangüíneo capilar, e é composta de cinco tipos de células (estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal). É também a principal barreira, protegendo o corpo de agentes externos e da perda excessiva de água. O estrato córneo é constituído de células queratinizadas, desidratadas, compactadas e achatadas que são inativas fisiologicamente e são perdidas e recolocadas continuamente pelas camadas inferiores da epiderme. Entre os queratinócitos observa-se uma gama de substâncias apolares que fornecem uma maior flexibilidade ao tecido epitelial (COSTA, 1993; SITRUK-WARE, 1989; WESTER, 1992). A derme apresenta alta vascularização capilar, criando uma extensa interface epiderme / derme. A razão da perfusão sanguínea através da pele é normalmente tão rápida que variações extremas de temperatura (frio-calor) num curto intervalo de tempo, não afetam as velocidades de absorção de drogas aplicadas sobre a epiderme. Encontram-se ainda na derme folículos pilosos, melanócitos, glândulas sebáceas, músculos e nervos eretores dos pelos. Algumas destas estruturas transpassam a epiderme, promovendo a formação de

poros. Na hipoderme estão alojados vasos de maior calibre arteríolas e veias, nervos, glândulas sebáceas e papilas dos folículos pilosos (SITRUK-WARE, 1989; POTTS, 1991; COSTA, 1993; JASS, 1991).

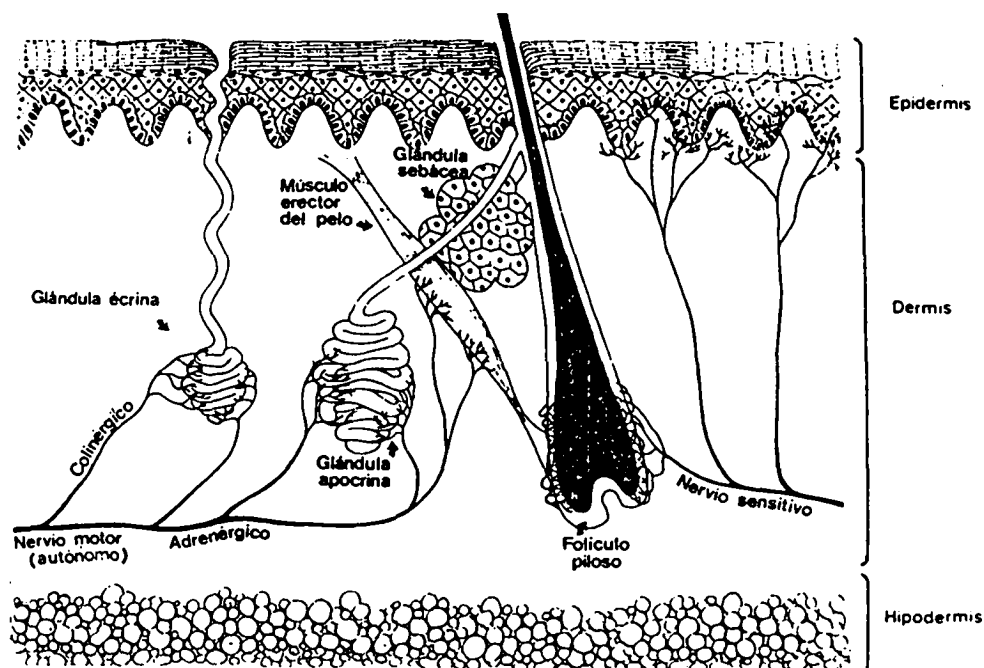


Figura 4 Estrutura esquemática da pele

Moléculas provenientes do meio externo necessitam atravessar a pele intacta, penetrando no estrato córneo e outras estruturas de origem endógena. Atingindo então, derme, paredes capilares para então atingirem o sistema sangüíneo (sangue e linfa) (IDSON, 1975). O transporte através de membranas da pele é um processo complexo. Para estabelecer as características de permeação de uma determinada substância é necessário considerar os diferentes mecanismos e barreiras, tais como:

*Barreira epidérmica:* A teoria mais aceita correntemente para absorção percutânea trata a pele como uma matriz celular uniforme e invariável, a qual produz uma fina camada de células mortas impermeáveis que protegem o organismo. A superfície lipídica parece oferecer resistência relativamente pequena à passagem de água e de outros compostos químicos. A principal barreira para a absorção são as células mortas de estrato córneo, restringindo os movimentos de entrada e de saída de substâncias e promovendo uma alta resistência elétrica (IDSON, 1975). Os queratinócitos são cercados de lipídeos, glicoproteínas, e outras substâncias apolares dispostos em bicamadas. Conforme as características de polaridade da substância ela seguirá um trajeto intra- ou extracelular (ILLEL, 1991; JASS, 1991; ASHTON, 1992). Esta barreira é vulnerável a alguns solventes e aminas orgânicas, refletindo no aumento da permeabilidade da pele (promotores de absorção) (ILLEL, 1991).

*Barreira reservatória:* A existência de um reservatório ou depósito no estrato córneo é conhecida e estudada há várias décadas. Fármacos e/ou substâncias químicas aplicadas sobre a pele podem formar um reservatório através da formação de um filme com o preenchimento de poros (glândulas sebáceas e folículos pilosos). A quantidade e o tempo de permanência destas substâncias nos reservatórios variam conforme as substâncias e podem também ser influenciadas por fatores externos como temperatura, umidade e presença de solventes (SITRUK-WARE, 1989; IDSON, 1975).

*Difusão epidérmica:* A difusão através do estrato córneo é um processo puramente passivo, afetado somente por condições ambientais. A absorção percutânea, por outro lado, é um processo mais complicado. A difusão epidérmica é a primeira fase, e a liberação para a derme é a segunda. A última depende do efetivo fluxo sangüíneo, movimento do fluído intersticial, e talvez, de outros fatores tais como combinações com constituintes dérmicos. Um sistema passivo tem duas principais características: (a) um tempo de latência após a

aplicação da substância na superfície cutânea, no qual a membrana começa a ser carregada com o penetrante, e (b) razão constante de penetração.

São três as principais rotas de penetração através da pele: (a) pelas regiões foliculares, (b) através dos ductos sudoríparos e (c) inter e intraqueratinócitos. Regiões como a palma das mãos e a sola dos pés indicam que a absorção via glândulas sudoríparas é representativa, já que os folículos pilosos estão ausentes e a camada córnea é extremamente desenvolvida e mesmo assim pode-se observar a penetração de alguns fármacos. Geralmente as substâncias penetram na pele pelas três vias, porém a penetração inter e intraqueratinócitos é a determinante, por apresentar uma área de 100 a 1000 vezes maior do que as outras rotas de absorção. As glândulas sudoríparas e os folículos pilosos são distribuídos na pele em diferentes números, a soma de suas áreas seccionais é de aproximadamente 0,1 a 1,0 % da área da pele (IDSON, 1975). Moléculas polares e apolares difundem através do estrato córneo por diferentes mecanismos moleculares. Com a hidratação dos queratinócitos ocorre o acúmulo de água na superfície externa dos filamentos proteicos. Moléculas polares parecem passar através desta água imobilizada. Ao contrário, moléculas apolares, provavelmente, dissolvem-se e difundem-se na matriz lipídica entre os filamentos proteicos. A energia de ativação para moléculas apolares é quase sempre menor do que para a difusão de moléculas polares (IDSON, 1975; POTTS, 1991; ASHTON, 1992; SITRUK-WARE, 1989).

São inúmeros os fatores que regem a absorção percutânea, ligados a absorção no trato gastrointestinal e a diversos fatores ambientais. A pele intacta é um dos principais fatores limitantes da absorção. Agentes químicos, tais como gás mostarda, ácidos e álcalis, podem provocar danos no estrato córneo, aumentando a permeabilidade. Assim como frente a agentes químicos, doenças de pele provocam alteração nos perfis de absorção de fármacos quando aplicados sobre a pele (IDSON, 1975).

A pele humana sofre consideráveis alterações com o aumento da idade. Numerosas alterações fisiológicas e bioquímicas podem ser identificadas nos tecidos, como: diminuição da hidratação cutânea, redução da atividade das glândulas sebáceas, resultando uma diminuição da quantidade de lipídeos na superfície da pele, achatamento da junção derme/epiderme e atrofia da rede capilar, produzindo uma alteração do suprimento sanguíneo da epiderme. Apesar de conhecidas algumas destas alterações, não foram ainda caracterizadas as influências que elas possam vir a ter sobre a permeação de substâncias ativas através da pele (ROSKOS, 1989). Experimentalmente, sabe-se que a pele de fetos e de crianças é mais permeável que a de adultos, talvez por apresentar menor queratinização e maior hidratação do estrato córneo (IDSON, 1975).

Via de regra, o fluxo sanguíneo nos vasos dérmicos aumenta a difusão de substâncias permeantes. Ao contrário, a vasoconstrição obtida, por exemplo, pela aplicação de corticoesteroides tópicos provoca a diminuição da absorção de outros fármacos (IDSON, 1975).

Já faz algumas décadas que ficou caracterizada a diferença da permeabilidade entre diferentes sítios do organismo humano. Esta diferenciação foi uma das razões para a escolha do local de aplicação do primeiro sistema terapêutico transdérmico (região retro-auricular TTS-Scopoderm® - escopolamina) (SCHENKEL, 1986; IDSON, 1975; Van ROOJJ, 1993).

Humanos e animais de experimentação apresentam amplas variações de características físicas da pele, tais como o número de poros por unidade de área e espessura do estrato córneo. Estas diferenças físicas e estruturais obviamente afetam a penetração percutânea de fármacos. A pele como a de coelhos, ratos e camundongos, as quais têm sido comumente utilizadas na determinação da penetrabilidade através do tecido epitelial,



apresentam reduzidas glândulas sudoríparas e inúmeros pelos e folículos pilosos, ao contrário dos humanos. Normalmente, a pele destes roedores é mais permeável do que a pele humana. A correlação da permeação entre espécies não é constante para diferentes substâncias, mas a pele de coelhos apresenta maior permeabilidade, seguidos da pele de ratos, porcos da Índia e posteriormente da pele humana (IDSON, 1975; SHAH, 1991).

A hidratação do estrato córneo situa-se entre os fatores promotores de absorção de maior importância, fazendo com que aumente o fluxo de todas as substâncias através da pele. A hidratação resulta da difusão de água de camadas mais profundas da epiderme e derme provenientes da perspiração. Pode-se conseguir o aumento da hidratação mediante o uso de substâncias emolientes que promovem uma obstrução parcial dos poros, evitando assim a perda excessiva de água. Sob condições de hidratação forçada o estrato córneo altera a hidratação normal de 5 a 15 % para 50 % ou mais, aumentando a permeabilidade em 4 a 5 vezes.

A quantidade de substância ativa absorvida percutaneamente por unidade de área por intervalo de tempo aumenta com a concentração da droga no veículo. Assim como, uma maior quantidade de droga é absorvida por intervalo de tempo a concentrações constantes quando a droga é aplicada numa maior superfície de pele. Entretanto, com algumas poucas substâncias ocorre o contrário, obtém-se diminuição da absorção com o aumento da concentração (substância cáusticas, induzindo à formação de crostas) (IDSON, 1975).

As características de solubilidade do penetrante influenciam grandemente a propriedade de atravessar membranas biológicas. Já no início do século foi estabelecida uma teoria de absorção baseada na relação entre a solubilidade das substâncias e a composição das membranas biológicas. Segundo a teoria de MEYER-OVERTON, as substâncias lipofílicas passam através das membranas e as hidrofílicas passam através das proteínas após

hidratação das mesmas. As características moleculares como o tamanho e forma podem ter um papel tão importante quanto a hidratação e solubilidade. Alguns autores sugerem uma correlação inversa entre o peso molecular e a razão de absorção (DURANDEAU,1992).

A influência da formulação e a escolha dos adjuvantes são fatores que não devem ser esquecidos no desenvolvimento de formas farmacêuticas de aplicação tópica com efeito sistêmico. Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que a liberação de uma substância será favorecida pela escolha de veículos que tenham uma afinidade pequena com penetrante, com um coeficiente de partição veículo/estrato córneo, tendendo mais para o estrato córneo (IDSON, 1975; MOLLGAARD, 1983).

A pele é um obstáculo bastante difícil de ser ultrapassado, tendo como elemento essencial a camada córnea. Os produtos que passam através desta camada tem algumas características em comum, como o peso molecular (< 1000 Daltons), o ponto de fusão pouco elevado e marcada lipofilia. Medicamentos para serem utilizados pela via percutânea com ação sistêmica devem apresentar um alto índice terapêutico, uma vez que somente pequenas concentrações atingem o sistema sangüíneo. Frente a todos estes fatores, muitas vezes é necessário aumentar o fluxo da substância ativa através da pele. Uma das maneiras de realizar esta modulação da permeação é fazer o uso de substâncias que facilitam a penetração por esta via. Estas substâncias são denominadas "promotores de absorção" (IDSON, 1975; DURANDEAU,1992). São várias as categorias de substâncias químicas que atuam como agentes de absorção, entre elas estão os solventes alcoólicos (LIU, 1991; DURANDEAU, 1992; ZATZ, 1991), solventes apróticos (DURANDEAU, 1992, IDSON, 1975; ASHTON, 1992; ASHTON, 1992a), tensoativos, uréia e seus derivados, etc. (ZATZ, 1991a; WILLIAMS, 1992). Frequentemente, os obstáculos para a penetração são comparados a uma

parede, onde os corneócitos são os tijolos e o cimento é formado de lipídeos dispostos em bicamadas (ácidos graxos, triglicerídios, colesterol, esfingolipídios, etc.). De uma forma geral, os promotores polares agem sobre a queratina endocitária ou sobre as cabeças polares das bicamadas lipídicas, agentes apolares agem fluidificando a parte apolar das bicamadas lipídicas (LIU, 1991; DURANDEAU, 1992).

Devido a fatores tecnológicos, performance biofarmacêutica, facilidade de aplicação e baixo custo de produção, os géis apresentam grande interesse na veiculação de substâncias com destino a penetração percutânea. De maneira geral, os géis podem ser caracterizados como um sistema disperso, formado por pelo menos duas fases, a primeira constituída por um esqueleto tridimensional (ou matriz) o qual mantém uma fase líquida imobilizada no seu interior. Neste tipo de sistema disperso as fases estão completamente interpenetradas, não sendo possível fazer distinção entre elas, ao contrário do que acontece com as emulsões e suspensões (VOIGT, 1982; PARROT, 1970). De acordo com VOIGT (1982), as pomadas e suas bases podem ser classificadas em géis, dependendo da estrutura química e das propriedades, ou seja, gel seria uma característica de pomadas e poderiam ser classificados como:

- Géis de hidrocarbonetos (vaselinas, plastibase®);
- Lipogéis (gorduras naturais, hidrogenadas, sintéticas);
- Géis de PEG (Polietilenóxidos-Polywachse®, carbowax);
- Hidrogéis (dióxido de silício, éteres de celulose, polímeros do ácido acrílico, etc.).

Os hidrogéis constituem os géis no seu sentido mais clássico e são obtidos pelo esponjamento limitado de substâncias orgânicas macromoleculares ou combinações inorgânicas. Tecnicamente, os géis apresentam vantagens em relação aos outros tipos de formulação no que diz respeito à produção,

envase e aplicação. Atualmente, grande parte dos produtos veiculados em líquidos, cremes, pomadas e aerossóis podem ser incorporados aos géis. Via de regra os géis podem ser aplicados com completo controle e de maneira simples, apresentam um excelente aspecto visual e versatilidade no envase (FOX, 1984; SCHMOLKA, 1984).

FOX (1984) classifica os materiais gelificantes mais comumente utilizados segundo sua origem e natureza. Alguns exemplos dos materiais de maior utilização podemos ver a seguir:

- gomas sintéticas (resinas); etilcelulose (EC), metilcelulose (MC), hidroxietilcelulose (HEC), hidroxipropilcelulose (HPC), carboximetilcelulose (CMC), polietilenoglicóis (PEG) e carbômeros.
- gomas naturais; acácia, alginatos, guar, caraia, pectina, etc.
- materiais inorgânicos; bentonita, derivados de sílica (dióxido de silício coloidal)
  
- Outros: polioxietileno e copolímeros, estearatos, polímeros de polioxietileno/ polioxipropileno (poloxamer), álcoois graxos etoxilados (derivados da lanolina e amidas)

Entre os materiais gelificantes os mais difundidos são os derivados do ácido acrílico (Carbopol<sup>®</sup>), derivados celulósicos e polímeros de etileno de baixo peso molecular (SCHMOLKA, 1984).

Carbômeros são utilizadas em formulações cosméticas e farmacêuticas há cerca de quarenta anos. Estes polímeros de alto peso molecular e caráter aniônico são amplamente empregados na preparação de cosméticos, como estabilizadores de emulsões, agentes suspensores, espessantes, etc. São produzidos pela precipitação do ácido acrílico através da polimerização (AMJAD, 1992). Apresenta-se como pó branco que se dispersa facilmente em água, originando soluções ácidas. As soluções são preparadas

pela simples adição de água ao pó, devendo-se agitar energicamente durante toda a operação. Os principais mecanismos que envolvem a gelificação destas moléculas estão ligados à ionização dos grupamentos carboxílicos, através da neutralização com álcalis, com conseqüente repulsão de cargas e estiramento das cadeias poliméricas formando a matriz tridimensional. E interposição de tensoativos entre as cadeias poliméricas formando pontes de hidrogênio com a conseqüente distensão das cadeias e gelificação. Em se tratando de uma resina aniônica, pode-se inferir que a estabilidade é diretamente afetada pelo pH e eletrólitos (BFGOODRICH, 1987; PRISTA, 1975). Não sendo afetado entretanto pela temperatura e microrganismos, apresentam boa compatibilidade com diversos conservantes como parabenos e fenol (TEOT, 1982).

Dos derivados celulósicos destaca-se a metilcelulose (MC) (Tylose<sup>®</sup>, Methocel<sup>®</sup>). Preparada a partir do tratamento da celulose com cloreto de metila, apresenta-se solúvel em água fria, coagulando com o aquecimento. Por ser um derivado não-iônico mostra-se estável frente variações de pH na faixa de 2-12 (PRISTA, 1975). Ao contrário das resinas poliméricas não apresenta incompatibilidades com eletrólitos (HELMAN, 1982).

A hidroxietilcelulose (HEC), produto da reação entre celulose e óxido de etileno catalisada por hidróxido de sódio, é um derivado não-iônico que difere dos demais derivados de celulose quanto à solubilidade. MC e hidroxipropilcelulose (HPC) apresentam-se solúveis em água fria, já a HEC é também solúvel a quente. Graças à suas propriedades a HEC apresenta uma vasta gama de aplicações nos mais diferentes setores, como na manufatura de petróleo, no processamento têxtil, em indústrias agrícolas, em cosméticos e em formulações farmacêuticas, tais como géis emulsões, loções, e outros (GREMINGER, 1982).

A carboximetilcelulose sódica, preparada por tratamento de celulose por álcalis e subseqüente reação como monocloroacetato de sódio,

encontra-se no comércio nas variedades alta, média e baixa viscosidade. Devido ao caráter aniônico apresenta relativa instabilidade frente à variação de pH, sendo sensível também à temperatura. A exemplo do carbômero apresenta incompatibilidade com eletrólitos. Além da utilização na formação de hidrogéis apresenta grande aplicação como estabilizador de emulsões e suspensões, bem como desintegrante na fabricação de comprimidos (GREMINGER, 1982)

A determinação da biodisponibilidade de formulações tópicas tem particular interesse nas fases de desenvolvimento e otimização de formulações, bem como na determinação da estabilidade e controle de qualidade do produto final (KNORST, 1991). Metodologias *in vitro* padronizadas, reprodutíveis e reconhecidas são necessárias na avaliação da performance biofarmacêutica, no sentido de economizar experimentos *in vivo* (NEUBERT e WOHLRAB, 1990). KNORST (1991) faz uma compilação dos diversos modelos de liberação *in vitro*, caracterizando quanto ao princípio de funcionamento e membranas utilizadas. NEUBERT e BENDAS (1991); NEUBERT e PARTYKA (1990) NEUBERT e WOHLRAB (1990a); e NEUBERT e WOHLRAB (1990b) desenvolveram um dispositivo que permite a determinação da penetração de substâncias contidas em formas farmacêuticas plásticas em membranas artificiais (figura 5).

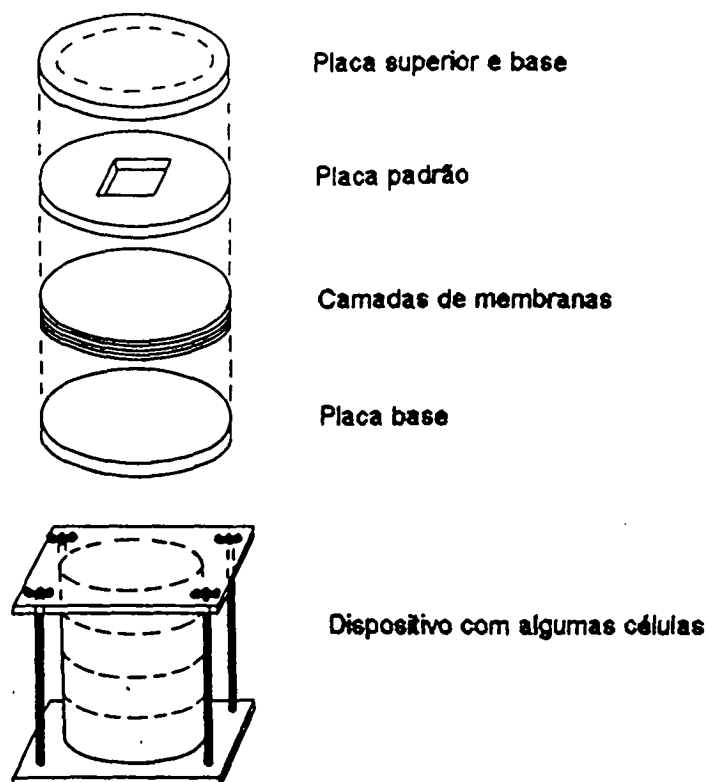


Figura 5 Dispositivo para determinação da penetração de substâncias em membranas artificiais, proposto por NEUBERT (1981)

Nestes experimentos foram realizados estudos referentes à penetração do ácido salicílico, salicilato de metila, ditranol e valerato de betametasona em modelos multilamelares constituídos de membranas de colódio com dodecanol em função do tempo e em comparação com os perfis de penetração em pele excisada *in vitro*. Nestes trabalhos, verificou-se que as substâncias analisadas apresentaram uma relativa equivalência entre os perfis de permeação em modelos multilamelares de colódio e nas camadas externas do estrato córneo. O modelo descrito, além de propiciar uma previsão das razões de penetração de determinada substância através do estrato córneo, possibilita a comparação entre diferentes formulações com a mesma substância ativa em veículos distintos. Os autores ressaltam que apesar das coincidências dos perfis de permeação na pele excisada e no

modelo proposto, é necessário estabelecer exatamente qual é o grau de coincidência entre os perfis de penetração em função do tempo para que estas técnicas sejam utilizadas como instrumentos na otimização de formulações tópicas.

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica inclui obrigatoriamente metodologias para a avaliação da qualidade no que diz respeito tanto às características físicas quanto químicas. O controle de qualidade das matérias-primas, doseamento de substância ativa no produto final bem como o teor de substâncias submetidas a testes de estabilidade podem ser feitas por diferentes técnicas. Inúmeros trabalhos relatam metodologias analíticas para o estradiol e substâncias análogas, como técnicas de cromatografia em camada delgada (CORTI, 1984) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (CASTAGNETTA, 1991; CAPITANO, 1978; COCHRAN e EWING, 1979; DIBBELT e KUSS, 1985; HARA, MAYASHI, 1977; MOLLGAARD, 1983; LIU e HIGUCHI, 1990; LIU e HIGUCHI, 1991; LEROY e BENOIT, 1986, JANSEN e BLITTERSWIJK, 1985; FRIEND e CATZ, 1989; ALBERS e MÜLLER, 1992; HATANAKA e INUMA, 1990; LIU e KURIHARA-BERGSTROM, 1991; SHEIKH e TOUCHSTONE, 1987; TSCHERNE e CAPITANO, 1977; NEEDHAM e PFEIFER, 1992). Os trabalhos em que constam técnicas de CLAE utilizam na maioria fase estacionária de fase reversa (C8 e C18) com desenvolvimento isocrático, utilizando como eluentes acetonitrila e água, metanol e água, acetonitrila e ácido fosfórico e metanol e ácido fosfórico, nas proporções em torno de 40 % de acetonitrila e 30 % de metanol. Os métodos de detecção variam do ultravioleta, com comprimento de onda em torno de 280 nm, a fluorimétrico, cintilométrico e amperométrico.

Os testes de estabilidade são uma necessidade e um meio vital para ajudar a assegurar que determinada formulação manterá sua integridade,



no que diz respeito à qualidade física, química e microbiológica, bem como sua pureza, durante o prazo de validade estipulado (DUKES, 1990).

Existe uma série de razões para a realização do estudo de estabilidade de uma forma farmacêutica, a principal delas é sanitária, ou seja, deve-se tomar cuidado quanto à inocuidade da formulação. Mesmo que uma substância ativa não seja tóxica nas doses utilizadas, não significará que seus produtos de degradação também o sejam. Existem ainda as razões legais e até comerciais, onde a perda da eficácia ou alterações de características organolépticas levam o paciente a rejeitar a terapia não sendo uma boa promoção para o produto (NUDELMAN, 1975; MOLLICA, 1978).

Os testes acelerados de estabilidade podem ser definidos como métodos validados ou métodos pelos quais a estabilidade de um produto pode ser estipulada através da estocagem do produto sob condições que acelerem alterações de uma forma previsível. As condições de estresse utilizadas são temperatura, luz umidade, agitação, gravidade, pH, embalagem e método de manufatura (YOUNG, 1990).

As formas farmacêuticas semi-sólidas podem sofrer inúmeras alterações que vão desde o tamanho das partículas dispersas até a liberação da substância ativa e tem conseqüências na aparência (cor, odor e textura), uniformidade de conteúdo e na biodisponibilidade do produto (DAVIS, 1987).

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

## 2.1 MATERIAIS

### 2.1.1 MATÉRIAS-PRIMAS

- Álcool etílico 96°GL
- Carbômero 940 B.F. Goodrich® (Carbopol 940)
- Carboximetilcelulose sódica Alta viscosidade Delaware
- Carboximetilcelulose sódica baixa viscosidade Delaware
- 17 $\beta$ -Estradiol micronizado (fornecido pelo Prof. Dr Hartmut Derendorf)
- Hidroxiethylcelulose Delaware (Cellosize QP100)
- Éter nonilfenol poliglicólico (Makon 10)
- Glicerina Delaware
- Metilparabeno Merck
- Polietilenoglicol Delaware
- Polissorbato 20 Delaware
- Propilparabeno Merck
- Tylose MH300 Hoescht
- Tylose MH2000 Hoescht

### 2.1.2 REAGENTES ,SOLUÇÕES e MEIOS DE CULTURA

- Acetonitrila Lichrosolv Merck
- Azul de bromotimol (solução)
- Ácido clorídrico 0,5M

- Ácido clorídrico 3M
- Ácido láctico
- Ágar ágar MERCK
- Ácido sulfúrico concentrado Merck (P.A.)
- Ácido sulfúrico 2M
- Bacto buffered peptone Water desidratado (DIFCO)
- Dextrose REAGEN
- Etanol 70 %
- Fenol (solução 1:20)
- Fenolftaleína SI
- Hidróxido de potássio alcoólico 0,5M SV
- Hidróxido de sódio SR
- Hidróxido de sódio 0,1M
- Hidróxido de sódio 0,02M
- Hidróxido de sódio 1M
- Iodo 0,1M
- Kit DELFIA® estradiol WALLAC (anticorpos policlonais de coelho marcados com Európio)
- Laurilsulfato de sódio (Texapon K12)
- Lecitina de soja INLAB
- Metanol PA Merck
- Permanganato de potássio (solução 1:100)
- Polissorbato 80 INLAB
- Tampão cloreto de sódio-peptona
- Vaselina líquida

### 2.1.3 APARELHOS E EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético Fisaton
- Aparelho de determinação de ponto de fusão Reichert, segundo

#### Kofler

- Balança Sartorius 200g
- Balança Sartorius 3000g
- Banho termostatizado Biomatic
- Banho termostatizado circulante Haake
- Banho ultra-sônico Transsonic 460 Elma
- Bidestilador / Deionizador Heareus
- Bomba peristáltica DESAGA
- Calculadora HP 32S II
- Calorímetro diferencial de varredura (DSC) PL Polymer 12000, interfaciado com sistema de dados Data Station 3700
- Câmara de fluxo laminar (Veeco)
- Célula de difusão (peça em aço inoxidável e teflon<sup>®</sup>, de construção própria)
- Contador de colônias (Biomatic)
- Bomba de vácuo Waters / Millipore
- Cromatógrafo líquido Waters constituído de:
  - Bombas 510
  - Controlador de fluxo AGC
  - Detector UV/Vis 484, 481 e 486
  - Injetor Rheodyne (20µl)
  - Integrador 746
- Estufas Biomatic
- Estufa a vácuo Heraeus
- Estufa Heraeus

- Espectrofotômetro de difração de raios laser Sympatec LASER  
(Sympatec GmbH / Claustahl-Zellerfeld / Alemanha)
- Espectrofotômetro IR Perkin-Elmer 1310
- Espectrofotômetro IR Shimadzu FTIR-8101
- Espectrofotômetro UV Shimadzu UV-160
- Fluorômetro DELFIA® modelo 1232 WALLAC
- Microscópio óptico Leitz
- Micrômetro Mitutoyo série 293-621, capacidade 25,0 mm e resolução de 1  $\mu\text{m}$
- Misturador de hélice Heidolph
- Penetrômetro Herzog

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

### 2.2.1 Carbômero

- Perda por dessecação:

Realizado pelo método gravimétrico conforme preconiza a USP XXII (THE UNITED, 1990.)

- Determinação do pH:

Realizada potenciometricamente em dispersão aquosa de 0,5 % (m/v) adicionada de NaOH, conforme a Pharmacopée Française 9. ed. (PHARMACOPÉE, 1983)

### 2.2.2 Carboximetilcelulose sódica (alta e baixa viscosidade)

- Identificação:

Conforme testes de identificação A, B e C preconizados pela USP XXII (THE UNITED, 1990).

Teste A baseia-se numa reação de desenvolvimento de coloração entre o derivado celulósico e ácido sulfúrico;

Teste B baseado na precipitação frente a cloreto de bário;

Teste C Reação de identificação de sódio resultando num precipitado amarelo ouro mediante a adição de acetato de uranilcobalto.

- Determinação de pH:

Realizada potenciometricamente em dispersão aquosa (1:100) (m/v) conforme preconiza a USP XXII (THE UNITED, 1990.)

- Perda por dessecação:

Realizado pelo método gravimétrico conforme preconizado pela USP XXII (THE UNITED, 1990.)

### 2.2.3 Etanol

- Identificação:

Conforme testes A e B da USP XXII (THE UNITED, 1990)

Teste A baseado na reação de coloração entre etanol, permanganato de potássio e ácido sulfúrico com nitroferricianeto e piperazina, impregnados em papel de filtro.

Teste B baseado na formação de iodofórmio mediante a reação com hidróxido de sódio e iodo.

- Densidade:

determinada em picnômetro seguindo USP XXII (THE UNITED, 1990).

- Substâncias insolúveis em água:

Realizada mediante adição de água e observação de possível precipitação conforme a USP XXII (THE UNITED, 1990).

- Resíduos não voláteis:

Realizada por técnica gravimétrica de acordo com a USP XXII (THE UNITED, 1990).

- Acidez:

determinada através da titulação com NaOH 0,02 M com fenolftaleína como indicador conforme USP XXII (THE UNITED, 1990).

### 2.2.4 Estradiol

- Identificação:

Espectroscopia no infravermelho: Realizada em pastilhas



de KBr, com comparação dos espectros obtidos com espectros padrões de DIBBERN (1978).

Espectroscopia no ultravioleta: Espectros obtidos em metanol. Conforme DIBBERN (1978).

- Ponto de fusão:

Realizada em aparelho de determinação de ponto de fusão, segundo Kofler.

- Perda por dessecação:

Efetuada pelo método gravimétrico conforme preconiza USP XXII (THE UNITED, 1990).

- Análise granulométrica:

A distribuição granulométrica foi realizada em espectrofotômetro de difração de raios laser. A substância foi suspensa em água contendo 1 % (m/v) de texapon K12 (lauril sulfato de sódio) na concentração de 1 % (m/m). A dispersão foi tratada em banho de ultra-som por 1 minuto para assegurar a destruição de aglomerados. A medição foi feita em cubeta de quartzo sob as seguintes condições:

foco de 100 mm,

tempo de medição  $10 \text{ s}^{-1}$ ,

velocidade de agitação  $5 \text{ s}^{-1}$ .

Os resultados foram plotados através da distribuição granulométrica e do somatório das frequências.

---

Análises efetuadas por Martin Braun, Pharmazeutische Instiüt /  
Universität Tübingen

### 2.2.5 Hidroxietilcelulose

- Identificação:

Conforme testes A, B e C de THE UNITED, 1990.

Teste A baseado na dissolução de HEC a quente em água;

Teste B baseado numa reação com desenvolvimento de cor mediante a adição de fenol à solução de HEC com ácido sulfúrico.

Teste C realizada com a dispersão coloidal obtida no teste A e consiste na formação de um filme após a evaporação da água.

- Determinação de pH:

Efetuada potenciométricamente em dispersão aquosa de acordo com a USP XXII (THE UNITED, 1990).

- Perda por dessecação:

Avaliada pelo método gravimétrico segundo a USP XXII (THE UNITED, 1990).

### 2.2.6 Metilparabeno

- Identificação:

Espectroscopia no infravermelho, utilizando-se pastilhas de KBr, conforme DIBBERN (1978).

Espectroscopia no ultravioleta, espectros obtidos em NaOH 0,1 M como descrito por DIBBERN (1978).

- Determinação do ponto de fusão:

Realizada em aparelho de determinação de ponto de fusão, segundo Kofler.

- Perda por dessecação:

Realizada pelo método gravimétrico preconizado pela USP XXII (THE UNITED, 1990).

### 2.2.7 Polissorbato 20

- Identificação:

Teste A de THE UNITED, 1990.

- Água:

Realizada através da titulação com reagente de Karl Fischer conforme a USP XXII (THE UNITED, 1990).

- Índice de saponificação:

Titulação baseada na neutralização de ácidos livres e éteres saponificáveis por hidróxido de potássio.

### 2.2.8 Propilparabeno

- Identificação:

Espectroscopia no infravermelho, realizada em pastilhas de KBr, segundo técnica descrita por DIBBERN (1978).

Espectroscopia no ultravioleta, realizada em NaOH 0,1 M, conforme DIBBERN (1978).

- Ponto de fusão:

Realizada em aparelho de determinação de ponto de fusão, segundo Kofler.

- Perda por dessecação.

Determinada pelo método gravimétrico segundo preconiza a USP XXII (THE UNITED, 1990).

## 2.3 DESENVOLVIMENTO DOS GÉIS

### 2.3.1 Bases de Carbômero

#### 2.3.1.1 Formulação A:(m/v)

1) 17 $\beta$ - estradiol (Sigma)	0,06 %
2) Carbômero	0,5 %
3) Hidróxido de sódio 5 % (m/v)	1,0 %
4) Etanol 96° GL	25,0 %
5) Água destilada	73,5 %

#### Técnica:

Em geral, umectar o carbômero com pequena quantidade de água, adicionando o restante de água em pequenas porções com agitação permanente. Num béquer, dissolver o 17 $\beta$ -estradiol em etanol e em seguida incorporar a solução à dispersão de carbômero, em pequenas porções e com constante agitação até completa homogeneização. Ajustar o pH até a neutralidade com a Solução de NaOH a 5 %.

#### 2.3.1.2 Formulação B: (m/v)

1) 17 $\beta$ -estradiol (Sigma)	0,06 %
2) Carbômero	0,5 %
3) Hidróxido de sódio 5 % (m / v)	1,0 %
4) Polissorbato 20	3,0 %
5) Etanol 96° GL	25,0 %
6) Água destilada	70,5 %

Técnica:

Proceder como em 2.3.1.1, adicionando o polissorbato à solução etanólica de estradiol.

#### 2.3.1.3 Formulação C: (m/v)

1) 17 $\beta$ -estradiol (Sigma)	0,06 %
2) Carbômero	0,5 %
3) Hidróxido de sódio 5 % (m/v)	1,0 %
4) Polietilenoglicol	10,0 %
5) Etanol 96° GL	25,0 %
6) Água destilada	63,5 %

Técnica:

Proceder como em 2.3.1.1, adicionando o polietilenoglicol à solução etanólica de estradiol.

#### 2.3.1.4 Formulação D: (m/v)

1) 17 $\beta$ -estradiol micronizado	0,06 %
2) Carbômero	0,5 %
3) Solução conservante	1,0 %
4) Hidróxido de sódio 5 % (m/v)	1,0 %
5) Etanol 96° GL	25,0 %
6) Água destilada	72,5 %

## Técnica:

Proceder como em 2.3.1.1, adicionando a solução conservante à solução etanólica de estradiol. A solução conservante foi preparada com a dissolução de 3 g de metilparabeno e 1 g de propilparabeno em 100 ml de etanol 96° GL.

## 2.3.1.5 Formulação E (m/v)

1) 17 $\beta$ -estradiol micronizado	0,06 %
2) Carbômero	0,5 %
3) Solução conservante	1,0 %
4) Hidróxido de sódio 5 % (m/v)	1,0 %
5) Polissorbato 20	3,0 %
6) Etanol 96° GL	25,0 %
7) Água destilada	72,5 %

## Técnica:

Proceder como em 2.3.1.1, adicionando o polissorbato e a solução conservante à solução etanólica de estradiol.

## 2.3.1.6 Formulação F (m/v)

1) 17 $\beta$ -estradiol micronizado	0,06 %
2) Carbômero	0,5 %
3) Solução conservante	1,0 %
4) Hidróxido de sódio 5 % (m/v)	1,0 %
5) Éter nonilfenol polietilenoglicólico (Makon 10 <sup>®</sup> )	0,5 %
6) Etanol 96° GL	25,0 %

7) Água destilada 72,0 %

Técnica:

Proceder como em 2.3.1.1, adicionando o éter nonilfenólico e solução conservante à solução etanólica de estradiol.

#### 2.3.1.7 Formulação G (m/v)

1) 17 $\beta$ -estradiol micronizado	0,06 %
2) Carbômero	0,5 %
3) Solução conservante	1,0 %
4) Hidróxido de sódio 5 % (m/v)	1,0 %
5) Polissorbato 20	2,0 %
6) Etanol 96° GL	25,0 %
7) Água destilada	69,5 %

Técnica:

Proceder como em 2.3.1.1, adicionando polissorbato e solução conservante à solução etanólica de estradiol.

#### 2.3.2 Bases de carboximetilcelulose sódica

##### 2.3.2.1 Formulação A (m/v)

1) 17 $\beta$ -estradiol estradiol	0,06 %
2) CMC Na	3,0 %
3) Glicerina	10,0 %
4) Etanol 96° GL	25,0 %
5) Água destilada	62,0 %

**Técnica:**

Em geral umectar a CMC Na com glicerina e em seguida adicionar toda água com agitação constante. Num béquer dissolver o estradiol em etanol, posteriormente verter a solução sobre a dispersão de CMC Na, homogeneizando a mistura.

**2.3.2.2 Formulação B (m/v)**

1) 17 $\beta$ -estradiol micronizado	0,06 %
2) CMC Na	3,0 %
3) Polissorbató 20	3,0 %
4) Glicerina	10,0 %
5) Etanol 96° GL	25,0 %
6) Água destilada	59,0 %

**Técnica:**

Proceder como em 2.3.2.1, adicionando o polissorbató à solução etanólica de estradiol.

**2.3.3 Bases de metilcelulose****2.3.3.1 Formulação A (m/v)**

1) 17 $\beta$ -estradiol micronizado	0,06 %
2) Metilcelulose	5,0 %
3) Glicerina	10,0 %
4) Etanol 96° GL	25,0 %
5) Água destilada	60,0 %



**Técnica:**

Em geral, umectar a metilcelulose com glicerina e em seguida adicionar a água com permanente agitação. Em copo de béquer dissolver estradiol em etanol, vertendo posteriormente esta solução na dispersão celulósica.

**2.3.3.2 Formulação B (m/v)**

1) 17 $\beta$ -estradiol micronizado	0,06 %
2) Metilcelulose	3,0 %
3) Polissorbato 20	3,0 %
4) Glicerina	10,0 %
5) Etanol 96° GL	25,0 %
6) Água destilada	60,0 %

**Técnica:**

Proceder como em 2.3.3.1, adicionando o polissorbato à solução etanólica de estradiol.

**2.3.4 Bases de hidroxietilcelulose (HEC)****2.3.4.1 Formulação A (m/v)**

1) 17 $\beta$ -estradiol micronizado	0,06 %
2) HEC	3,0 %
3) Etanol 96° GL	25,0 %
4) Água destilada	72,0 %

Técnica:

Em geral, suspender a HEC na água previamente aquecida a aproximadamente 70 °C. Num copo de béquer, dissolver o estradiol em etanol, posteriormente verter a solução sobre a suspensão, com agitação permanente. Aguardar cerca de 12 horas.

#### 2.3.4.2 Formulação B (m/v)

1) 17 $\beta$ -estradiol micronizado	0,06 %
2) HEC	2,5 %
3) Polissorbato 20	3,0 %
4) Etanol 96° GL	25,0 %
5) Água destilada	69,0 %

Técnica:

Proceder como em 2.3.4.1, adicionando polissorbato à solução etanólica de estradiol.

#### 2.3.4.3 Formulação C (m/v)

1) 17 $\beta$ -estradiol micronizado	0,06 %
2) HEC	2,0 %
3) Polissorbato 20	2,0 %
4) Etanol 96° GL	25,0 %
5) Água destilada	70,0 %

Técnica:

Proceder como em 2.3.4.2.

#### 2.3.4.4 Formulação D (m/v)

1) 17 $\beta$ -estradiol micronizado	0,06 %
2) Solução conservante	1,0 %
3) HEC	2,0 %
4) Polissorbato 20	2,0 %
5) Etanol 96° GL	25,0 %
6) Água destilada	70,0 %

#### Técnica:

Proceder como em 2.3.4.1, adicionando HEC e solução conservante à solução etanólica de estradiol.

### 2.4 PRÉ-TESTE DE PERMEABILIDADE DE ESTRADIOL ATRAVÉS DA PELE

#### 2.4.1 Delineamento do ensaio e preparação dos animais

Os géis de estradiol micronizado, com bases de carbômero e HEC, preparados como descrito em 2.3.1.7 (p. 40) e 2.3.4.4 (p. 45) respectivamente, foram avaliados quanto sua penetrabilidade através da pele de ratas Wistar, de aproximadamente 4 meses e peso entre 270 e 350 g, que tiveram seus dorsos depilados momentos antes da primeira aplicação das amostras.

As aplicações tópicas dos géis (160 mg) foram feitas diariamente com o auxílio de uma seringa, com início 72 horas após a castração e 24 horas antes do sacrifício de cada animal.

Os animais foram divididos em cinco grupos submetidos a diferentes tratamentos, como segue:

Grupo I = 9 ratas tratadas com gel de base HEC;

Grupo II = 9 ratas tratadas com gel de base Carbômero;

Grupo III= 9 ratas tratadas com Oestrogel®;

Grupo IV= 9 ratas tratadas com solução de valerato de estradiol subcutâneo

Grupo V = 9 ratas livres de qualquer tratamento (grupo controle).

Os animais foram sacrificados nos dias 3, 7 e 10 após o início dos tratamentos, sendo que a cada dia apenas três animais de cada grupo eram sacrificados, com exceção dos animais do grupo V que foram todos sacrificados no décimo dia de tratamento. O sacrifício dos animais foi feito por guilhotinamento, com o recolhimento do sangue troncular para posterior separação do soro onde foram determinados os níveis de estradiol por técnica de fluorimunoensaio. Cada animal teve seu útero dissecado e pesado.

#### 2.4.2 Doseamento de estradiol\*

Análise realizada por método imunofluorométrico sobre fase sólida, utilizando Kit DELFIA® estradiol WALLAC, que consiste de anticorpos policlonais de coelho marcados com európio. Utilizou-se fluorômetro DELFIA® modelo 1232 WALLAC, com excitação a 320 nm e emissão do európio a 615 nm.

---

\* Análise realizada pelo farmacêutico Francisco Lhullier do Serviço de Radioimuno ensaio do Hospital de Clínicas / Porto Alegre.

## 2.5 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE ESTRADIOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

### 2.5.1 Ensaio preliminares

#### 2.5.1.1 Preparo da solução padrão

Foi preparada uma solução de estradiol contendo aproximadamente 0,4 mg/ml, utilizando-se acetonitrila : água (1:1) como solvente, filtrada através de membranas de politetrafluoretileno com diâmetro de 13 mm e porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore FHLP 013).

#### 2.5.1.2 Condições cromatográfica

Coluna: Lichrosorb RP 8 (5 $\mu\text{m}$ , 25 x 4 mm i.d.)

Pré-coluna: Bondapack C18 / Corasil (37 - 50 $\mu\text{m}$ )

Fase móvel: Acetonitrila : água (1 : 1)

Fluxo: 1,0 ml / min

Injeção de 20  $\mu\text{l}$  (por alça dosadora Rheodyne)

Detecção: U.V = 280 nm

Sensibilidade = 0,050 AUFS

Filtro = 1,2

Registro: Atenuação = 512

Velocidade de registro = 0,5 cm / min

Este sistema proporcionou uma pressão de aproximadamente 14 atm.

Fase móvel filtrada em membranas Millipore FWLP ( porosidade de

0,5 $\mu$ m), sob pressão reduzida e desgaseificada por ação de ultra-som e pressão reduzida.

## 2.5.2 Curva Padrão de Estradiol

Foram preparadas soluções com concentrações de 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 e 32  $\mu$ g / ml de estradiol em acetonitrila. Cada solução foi filtrada como descrito em 2.5.1.1 e aplicada no sistema cromatográfico em triplicata. Os cromatogramas obtidos foram avaliados conforme suas áreas sobre os picos, onde foram determinadas as médias das mesmas, com seus respectivos desvios e coeficientes de variação percentual. As áreas foram expressas em mV.s.

As médias das áreas referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração x área, onde foram calculados o coeficiente de correlação linear da curva e a equação da reta gerada através da regressão linear.

## 2.5.3 Preparação das amostras de gel para análise por CLAE

### 2.5.3.1 Preparação de amostras de géis de base de carbômero

Foram preparadas diluições dos géis de carbômero em acetonitrila preparados como descrito em 2.3.1.7 (p. 40), Foram pesadas exatamente cerca de 500 mg das amostras diretamente em balão volumétrico de 10 ml com o auxílio de seringa, fornecendo uma concentração de cerca de 30  $\mu$ g / ml de estradiol. Após a adição de acetonitrila a dispersão foi agitada vigorosamente, e homogeneizada por ultra-som durante 1 min. As amostras foram filtradas como em 2.5.1.1 e aplicadas em triplicata. Com as áreas obtidas, calcularam-se as médias das

mesmas com os respectivos desvios e coeficientes de variação percentual para cada amostra.

#### 2.5.3.2 Preparação de gel padrão de estradiol com base de carbômero (m/m)

Foi preparado gel com base de carbômero (conforme formulação 2.3.1.7 p. 41), onde todos os constituintes da formulação foram exatamente pesados.

#### 2.5.3.3 Verificação da eficiência de extração de estradiol

Foram preparadas cinco amostras do gel padrão (2.5.3.2), conforme descrito em 2.5.3.1. O sistema cromatográfico consistia de:

Coluna: Lichrospher RP 8 10  $\mu\text{m}$  (250 x 4 mm di)

Pré-coluna: Bondapak C18 (37 - 50  $\mu\text{m}$ )

Fase móvel: Acetonitrila : água (44:56)

Fluxo: 2 ml / min

Volume injetado: 20  $\mu\text{l}$ .

As áreas referentes aos picos de estradiol foram comparadas com padrão de estradiol com concentração de 30,0  $\mu\text{g}$  / ml em acetonitrila. Os resultados foram expressos em percentual de extração.

#### 2.5.3.4 Verificação da eficiência de extração de metilparabeno

As áreas referentes aos picos de metilparabeno, obtidas como em 2.5.3.3 foram comparadas com padrão de metilparabeno na

concentração de 15  $\mu\text{g} / \text{ml}$  em acetonitrila. Os resultados foram expressos em percentual de extração.

#### 2.5.3.5 Verificação da eficiência de extração de propilparabeno

As áreas referentes aos picos de propilparabeno, obtidas como em 2.5.3.3 foram comparadas com padrão de propilparabeno na concentração de 5  $\mu\text{g} / \text{ml}$  em acetonitrila. Os resultados foram expressos em percentual de extração.

#### 2.5.3.6 Preparação de amostras de géis de base de hidroxietilcelulose

Foram pesados exatamente cerca de 250  $\mu\text{g}$  do gel direto em balão volumétrico de 5 ml. Em seguida, adicionaram-se sob agitação constante 4,0 ml de água destilada previamente aquecida a aproximadamente 70 °C, sob constante agitação. Após o arrefecimento da dispersão, completou-se o volume com acetonitrila sob agitação vigorosa por cerca de 30 s. Em seguida as amostras foram submetidas a sonificação durante 1 min. Sendo, posteriormente, centrifugadas a 2500 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi então filtrado como em 2.5.1.1 (p. 47) e aplicado em triplicata. Com as áreas obtidas calcularam-se as médias das mesmas com os respectivos desvios e coeficientes de variação percentual para cada amostra.

#### 2.5.3.7 Preparação de gel padrão de estradiol com base de hidroxietilcelulose



Foi preparado gel com base de hidroxietilcelulose (conforme 2.3.4.4 p. 45), onde todos os constituintes da formulação foram exatamente pesados.

#### 2.5.3.8 Verificação da eficiência de extração de estradiol dos géis de base de hidroxietilcelulose

Foram preparadas cinco amostras do gel padrão (obtidos como em 2.5.3.5) conforme descrito em 2.5.3.4 (p. 49). As amostras foram aplicadas em triplicata no sistema cromatográfico que consistia de :

Coluna Lichrosorb RP 8 5  $\mu$ m (250 x 4 mm di)

Pré-coluna Lichrosorb RP 18 5  $\mu$ m

Fase móvel acetonitrila:água (45:55)

fluxo 1,2 ml / min

Volume injetado de 20  $\mu$ l

Detecção ultravioleta 280 nm

As áreas referentes ao pico de estradiol foram comparadas com padrão de estradiol na concentração de 30,0  $\mu$ g / ml em acetonitrila. Os resultados foram expressos em percentual de extração.

#### 2.5.3.9 Verificação da eficiência de extração do metilparabeno de géis de hidroxietilcelulose

As áreas referentes ao pico do metilparabeno obtidas de cromatogramas como em 2.5.3.3 (p. 49) foram comparadas com as do padrão de metilparabeno na concentração de 15  $\mu$ g/ml em acetonitrila. Os resultados foram expressos em percentual de extração.

#### 2.5.3.10 Verificação da eficiência de extração do propilparabeno de géis de hidroxietilcelulose

As áreas referentes ao pico do propilparabeno obtidas de cromatogramas como em 2.5.3.3 (p. 49) foram comparadas com as do padrão de propilparabeno na concentração de 5 µg/ml em acetonitrila. Os resultados foram expressos em percentual de extração.

### 2.6 DETERMINAÇÃO DA CONSISTÊNCIA

Para a determinação da consistência foi utilizado penetrômetro munido de haste metálica e de um cone padronizado, o qual pesou 102,6 g, conforme descrito por KNORST (1991). As amostras foram colocadas no recipiente de medição, evitando-se a inclusão de ar e efetuando-se o nivelamento da superfície com espátula. O recipiente contendo amostra foi colocado sobre a mesa do penetrômetro, procedendo-se com a aproximação do cone até leve contato com a amostra. Após o ajuste do zero da escala, a haste com o cone era liberado para a queda e conseqüente penetração na amostra, mantendo-se a haste livre durante cinco segundos. Posteriormente efetuou-se a leitura da penetração em décimos de milímetros.

O resultado foi calculado a partir da média de oito determinações.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE

Foi empregada metodologia descrita por KNORST (1991), com a colocação de uma fonte luminosa na parte inferior da lâmina de vidro suporte e com a adição de um corante hidrofóbico (Sudan III (C.I 26100) 3 % em vaselina líquida) em torno das porções de amostra, com a finalidade de facilitar a visualização da evolução dos diâmetros das amostras.

Utilizaram-se as mesmas placas-molde e suporte. As amostras foram introduzidas no orifício da placa-molde e a superfície das mesmas foi nivelada com espátula. Ao redor das amostras foram colocadas algumas gotas da solução corante. Sobre as amostras foram colocadas placas-carga de vidro previamente pesadas com intervalos de 1 minuto, procedendo-se com a medição do diâmetro em dois sentidos, com a posterior determinação do diâmetro médio. As operações de adição de placas e determinação dos diâmetros foram repetidas a cada minuto até um total de 16 a 17 placas.

A espalhabilidade ( $E_i$ ), determinada a temperatura ambiente foi calculada através da equação:

$$E_i = \frac{d^2 \times \pi}{4} \quad (1)$$

Onde:  $E_i$  = espalhabilidade da amostra para o peso  $i$  ( $\text{mm}^2$ )

$d$  = diâmetro médio (mm)

Os valores de espalhabilidade em função da massa foram calculados com o auxílio de programa montado em calculadora HP 32S com posterior plotagem em gráficos e correspondem a média de três determinações.

## 2.8 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA (FARMACOPÉIA, 1988; KNORST, 1991)

Os ensaios foram realizados em câmara de fluxo laminar horizontal, utilizando-se meios de cultura extemporâneos, esterilizados imediatamente antes do uso. A vidraria foi esterilizada em estufa a 200 °C, durante uma hora e os diluentes, soluções e acessórios esterilizados em autoclave a 121 °C, durante quinze minutos.

### 2.8.1 Contagem de microrganismos viáveis totais

Na contagem de microrganismos viáveis totais, para a preparação de tampão cloreto de sódio peptona (pH 7,0) contendo neutralizantes. Foram pesados , 3,0 g de polissorbato 80 e 0,3 g de lecitina em erlenmeyer de 250 ml e dissolvidos em banho de água a 40 °C, pela adição de 90,0 ml de tampão cloreto de sódio-peptona, pH 7,0.

Para a preparação das amostras foram separadas, aleatoriamente, três embalagens. A limpeza externa das mesmas foi feita com algodão embebido em etanol 70 %. O conteúdo das mesmas foi homogeneizado em gral de porcelana e 10,0 g da amostra foram pesados assepticamente, em erlenmeyer de 250 ml. A seguir, o volume foi completado a 100 ml com tampão cloreto de sódio-peptona contendo neutralizantes. A mistura foi homogeneizada sob agitação magnética para a inativação do sistema conservante. A partir desta diluição na proporção de 1:10, foi procedida a diluição em proporções 1:100, 1:1000 e 1:10000, utilizando-se tampão cloreto de sódio-peptona, como diluente. Após, foi realizado o plaqueamento das diluições pipetando-se 1,0 ml das mesmas

em placas de petry de 100 x 20 mm em triplicata e adicionando-se a cada uma delas 20,0 ml do meio de cultura.

Para a pesquisa de fungos foi utilizado meio ágar-sabouraud-dextrose e para a de bactérias, ágar de caseína-soja. As placas foram incubadas em estufa a 25 °C durante 7 dias, para o crescimento de fungos e a 37 °C durante 5 dias para o crescimento de bactérias. Paralelamente, nas mesmas condições citadas, foram incubadas placas contendo meio de cultura, meio de cultura e diluente, meio de cultura e neutralizante e meio de cultura e polissorbato, como branco de ensaio. A contagem de microrganismos foi realizada com auxílio de contador de colônias munido de lupa e luz indireta. O cálculo da média aritmética de cada diluição foi efetuado a partir do número de colônias observado nas placas, calculando-se o número de microrganismos por grama, para cada diluição e multiplicando-se o número de colônias pela diluição utilizada. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC).

#### 2.8.2 Pesquisa de *Staphylococcus aureus* (ANTUNES, 1991)\*

O ensaio baseia-se na detecção da enzima coagulase, característica exclusiva dos *Staphylococcus aureus* dentre as espécies deste gênero que ocorrem em humanos. O teste realizado em tubo com colônia de 12 h com determinações em paralelo de cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P e cultura positiva de *Staphylococcus aureus* do Laboratório de Análises Clínicas desta Faculdade.

---

\* Teste realizado pela farmacêutica Ana Maria Antunes do Laboratório de Análises Clínicas desta Faculdade.

## 2.9 AVALIAÇÃO DA LIODISPONIBILIDADE

### 2.9.1 Célula de cedência

Para a avaliação da cedência *in vitro* foi desenvolvido um dispositivo de liberação (figura 6) que consiste de duas peças de aço inoxidável delimitando as câmaras receptoras, um anel de Teflon® constituindo a câmara doadora, anéis de vedação em cada uma das peças de aço e duas grades metálicas de 25 mm de diâmetro que dão a sustentação às membranas.

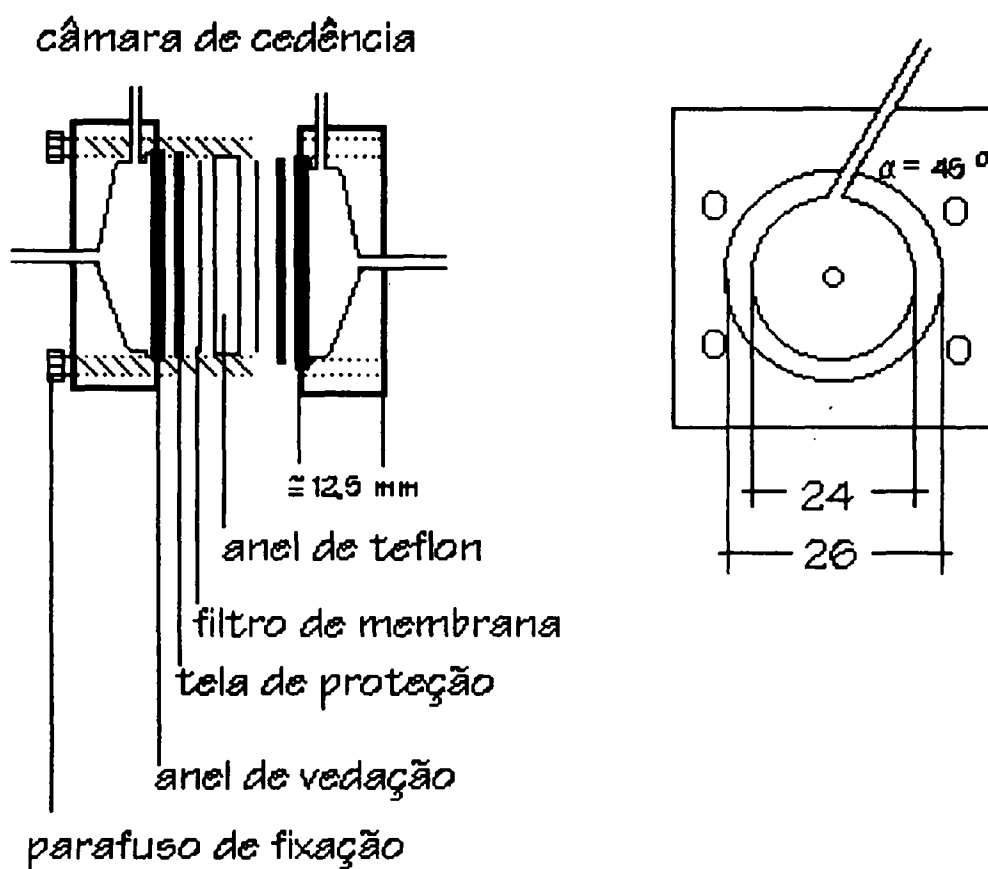


Figura 6 Desenho esquemático da célula de cedência (dimensões em mm)

### 2.9.2 Testes preliminares

As amostras foram pesadas diretamente no orifício central da câmara doadora com o preenchimento total da mesma. As câmaras doadora e receptoras foram separadas por membrana de acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade e 25 mm de diâmetro (Millipore HAWP 025 00), membranas de colódio com dodecanol ou papel de filtro. O dispositivo foi fechado e conectado a tubos de Tygon <sup>®</sup>, através dos quais circulou o líquido receptor mediante o auxílio de bomba peristáltica em sistema fechado. O meio de cedência constituído de 50 ml de água foi colocado em erlenmeyer de 50 ml e mantido a temperatura de  $37 \pm 1$  °C com o auxílio de banho termostaticado e sob constante agitação obtida com agitador magnético. A velocidade de fluxo foi regulada em 100 ml / h efetuando-se coletas de 3,0 ml da fase receptora a cada hora durante 6 horas e após passadas 15 horas.

As amostras foram filtradas como em 2.5.1.1 (p. 47) e injetadas no sistema cromatográfico que consistia de :

coluna Lichrospher RP 8 5 $\mu\text{m}$  (250 x 4 mm di)

pré-coluna Lichrospher RP 18 5 $\mu\text{m}$

fase móvel acetoneitrila : água (45:55)

fluxo de 1,2 ml / min

detecção ultravioleta 280 nm (Waters 486)

Para a quantificação de estradiol compararam-se as áreas dos picos referentes ao estradiol com as do padrão do mesmo na concentração de 10  $\mu\text{g}$  / ml em acetoneitrila : água (1 : 1)

## 2.10 PRÉ-TESTE DE ABSORÇÃO DE ESTRADIOL EM MEMBRANAS DE COLÓDIO COM DODECANOL

Para a avaliação da absorção de estradiol por membranas de colódio foi utilizado um dispositivo proposto por NEUBERT (1991) (figura 5 p. 25), que consiste de discos de poliacrilato (Piacryl ®) com 4 cm de diâmetro e 4 mm de espessura, tendo alguns destes discos (discos padrão) um orifício quadrado central de área de 4 cm<sup>2</sup>, onde são aplicadas as amostras. Foram colocados ao mesmo tempo cinco destes sistemas em banho termostatizado 32 ± 1 °C sendo o sistema retirado passadas 3 e 4 h.

### 2.10.1 Determinação da absorção de estradiol de géis com base de carbômero (preparados como descrito em 2.3.1.7 (p. 40))

As células descritas em 2.10 foram revestidas com papel alumínio a partir da placa base, sobre a qual foi colocada membrana de colódio previamente pesada. Em seguida foi colocado o disco padrão onde foi aplicado com espátula uma quantidade exatamente pesada de gel.

As amostras e membranas foram deixadas em contato durante os tempos e condições estabelecidas no item anterior, o sistema foi retirado do banho termostatizado e cada uma das membranas separada. Os géis que haviam sido aplicados foram raspados com auxílio de espátula e a membrana pesada novamente.

Após a exposição das membranas aos géis, as mesmas foram tratadas com 4,0 ml de acetonitrila. A dispersão foi homogeneizada em ultra-som e posteriormente filtrada como em 2.5.1.1 (p. 47) e aplicadas em triplicata no sistema cromatográfico como em 2.5.3.3 (p. 49) com fase móvel acetonitrila:água (47:53) e fluxo de 1,2 ml / min. As áreas dos picos



referentes ao estradiol foram comparadas com a área de padrão de estradiol 1 µg / ml em acetonitrila.

2.10.2 Determinação da absorção estradiol de géis com base de hidroxietilcelulose (preparado como em 2.3.4.4, p. 45)

Procedeu-se como em 2.10.1

2.10.3 Determinação da absorção de estradiol de gel comercial (Oestrogel®)

Determinou-se como em 2.10.1

## 2.11 ANÁLISE TÉRMICA

Tais análises foram realizadas por calorimetria diferencial de varredura, utilizando-se calorímetro descrito no item 2.1.3 (p. 31)

2.11.1 Análise de substâncias isoladas e de suas misturas

As análises foram efetuadas com amostras de aproximadamente 5,0 mg, na faixa de temperatura de 20 a 200 °C e velocidade de varredura de 20 °C / min, com a repetição do ciclo para algumas amostras.

### 2.11.2 Análise dos géis

Foram pesados aproximadamente 10 g dos géis a serem analisados e colocados em banho de vapor até a obtenção de resíduo seco. Este resíduo foi então analisado como em 2.11.1, na faixa de temperatura de -40 a 200 °C e com varredura de 20 °C / min.

Determinações realizadas pelo Prof. Dr. Marco Aurélio de Araújo do Instituto de Química desta Universidade.

## 2.12 PRÉ-TESTE DE ESTABILIDADE

Foram envasados cerca de 10 g dos géis de estradiol com base de carbômero e de hidroxietilcelulose (preparados como em 2.3.1.7, p. 40 e 2.3.4.4, p. 45) em tubos de alumínio revestidos com resina epóxi e com tampa rosqueável. Os tubos foram enchidos com auxílio de bisnaga plástica e fechados manualmente com dobradura tríplice. Cada um dos géis foi estocado em geladeira ( $10 \pm 1^\circ\text{C}$ ), temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), e a 35 e 45 °C em estufas termostatizadas.

Os géis foram analisados no dia zero (24 h após preparação), quanto as características organolépticas, teor de estradiol e espalhabilidade. As determinações do teor de estradiol, espalhabilidade e características organolépticas foram realizadas após decorridos 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 dias de armazenamento. O perfil de biodisponibilidade foi novamente avaliado no vigésimo oitavo dia de estocagem.

### 2.12.1 Avaliação do teor de estradiol

A quantificação do estradiol foi realizada através de CLAE.

#### 2.12.1.1 Quantificação de estradiol, metilparabeno e propilparabeno em géis de carbômero

As amostras foram preparadas como em 2.5.3.1 (p. 48) e aplicadas no sistema cromatográfico que, inicialmente, possuía as mesmas características do item 2.5.3.3 (p. 49), sendo posteriormente alteradas as condições de fase móvel para acetonitrila:água (39 : 61) e de fluxo para 2 ml / min.

As áreas referentes aos picos de estradiol, metilparabeno e propilparabeno de cada uma das amostras foram comparadas com as respectivas áreas de cada substância nas amostras no tempo zero, onde foi atribuído um teor de 100 %. Os resultados foram expressos através do percentual de cada substância.

#### 2.12.1.2 Quantificação de estradiol metilparabeno e propilparabeno em géis de base de hidroxietilcelulose

As amostras foram preparadas como em 2.5.3.4 (p. 49) e aplicadas em triplicata no sistema cromatográfico descrito em 2.5.3.6. (p. 50)

As áreas referentes aos picos de estradiol, metil e propilparabeno de cada uma das amostras foram comparadas com as respectivas áreas de cada substância nas amostras no tempo zero, onde foi atribuído um teor de 100 %. Os resultados foram expressos através do percentual de cada substância.

### 2.12.2 Avaliação da espalhabilidade (Ei)

Os géis constituídos das bases de carbômero e hidroxietilcelulose, armazenadas nas condições descritas em 2.12 (p. 60), foram submetidas ao teste de espalhabilidade em seguida à retirada das amostras dos locais de armazenagem, deixando-as cerca de uma hora para regulação à temperatura ambiente. O procedimento foi o mesmo descrito em 2.7 (p. 53), bem como o cálculo dos valores dos índices de espalhabilidade. Os valores de Ei correspondem a média de três determinações.

### 2.12.3 Avaliação organoléptica

No momento da retirada das amostras para avaliação da espalhabilidade dos géis procedeu-se com a observação do odor e coloração das amostras.

## 2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cálculos estatísticos foram utilizados para a descrição do comportamento individual das variáveis em estudo, onde foram determinadas as médias, desvios padrões e coeficientes de variação percentual. Para as análises de pares de variáveis entre as quais supunha-se haver dependência linear foram calculado os coeficientes de regressão linear e correlação linear de Pearson ( $r$ ).

Testes nos quais existiam mais de duas variáveis e/ou exigiam a comparação de dois ou mais grupos constituídos sempre do mesmo número de indivíduos, utilizou-se o procedimento do quadro que segue:

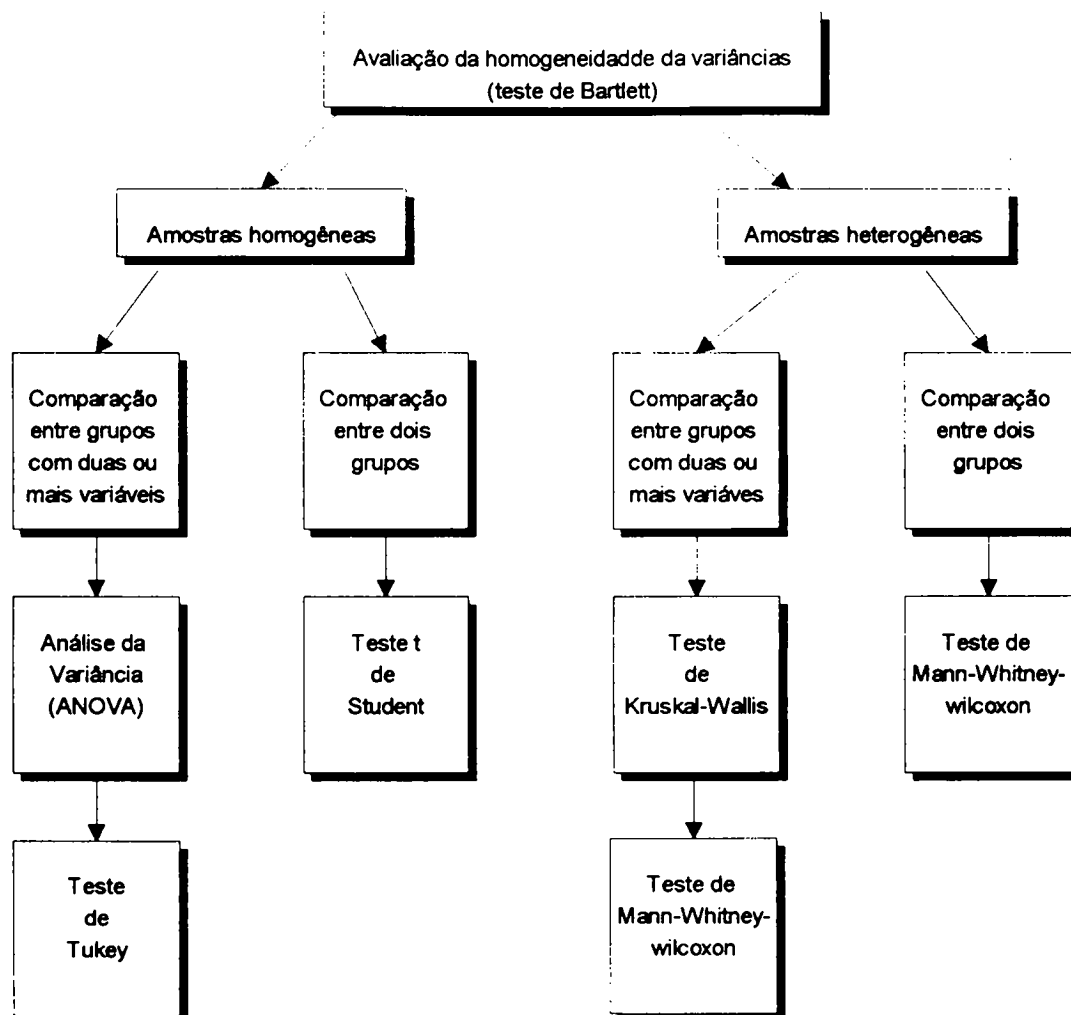


Figura 7 Representação esquemática dos procedimentos estatísticos

### **3. RESULTADOS**

### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

#### 3.1.1 Carbômero 940

Tabela 1: Testes utilizados para carbômero

Teste	Especificação	Resultado
Perda por dessecação	máximo 2 %	1,90 ± 0,13 % (n=3)
pH	7,3 a 7,8	7,5 (n=3)

#### 3.1.2 Carboximetilcelulose sódica

Tabela 2: testes utilizados para CMC Na

Teste	Especificação	Resultado
Identificação		
A	cor vermelho púrpura	de acordo
B	precipitado branco fino	de acordo
C	precipitado branco fino	de acordo
Perda por dessecação	máximo 10,0 %	6,55 ± 0,1 % (n=3)
pH	6,5 - 8,5	6,73 ± 0,06

## 3.1.3 Etanol

Tabela 3: Testes utilizados para etanol

Testes	Especificação	Resultado
Identificação		
A	cor azul no papel de filtro	de acordo
B	precipitado amarelo	de acordo
Gravidade específica	0,812 a 0,816	0,810
Subs. insolúveis em água	mistura deve manter-se límpida	de acordo
Resíduos não voláteis	máximo 1,0 mg	0.8 mg
Acidez	máximo 0,90 ml NaOH 0,02 M	0,65 ml

3.1.4 17 $\beta$ - estradiol

## Identificação:

Espectro infravermelho obtido, e o do padrão de DIBBERN (1978) são sobreponíveis (figura 8).

Espectro ultravioleta obtido, confere com espectro de padrão de DIBBERN (1978), (figura 9).

## Ponto de fusão:

Difícil visualização da faixa do ponto de fusão devido ao tamanho reduzido das partículas, faixa de fusão observada entre 170 - 180 °C.



xT

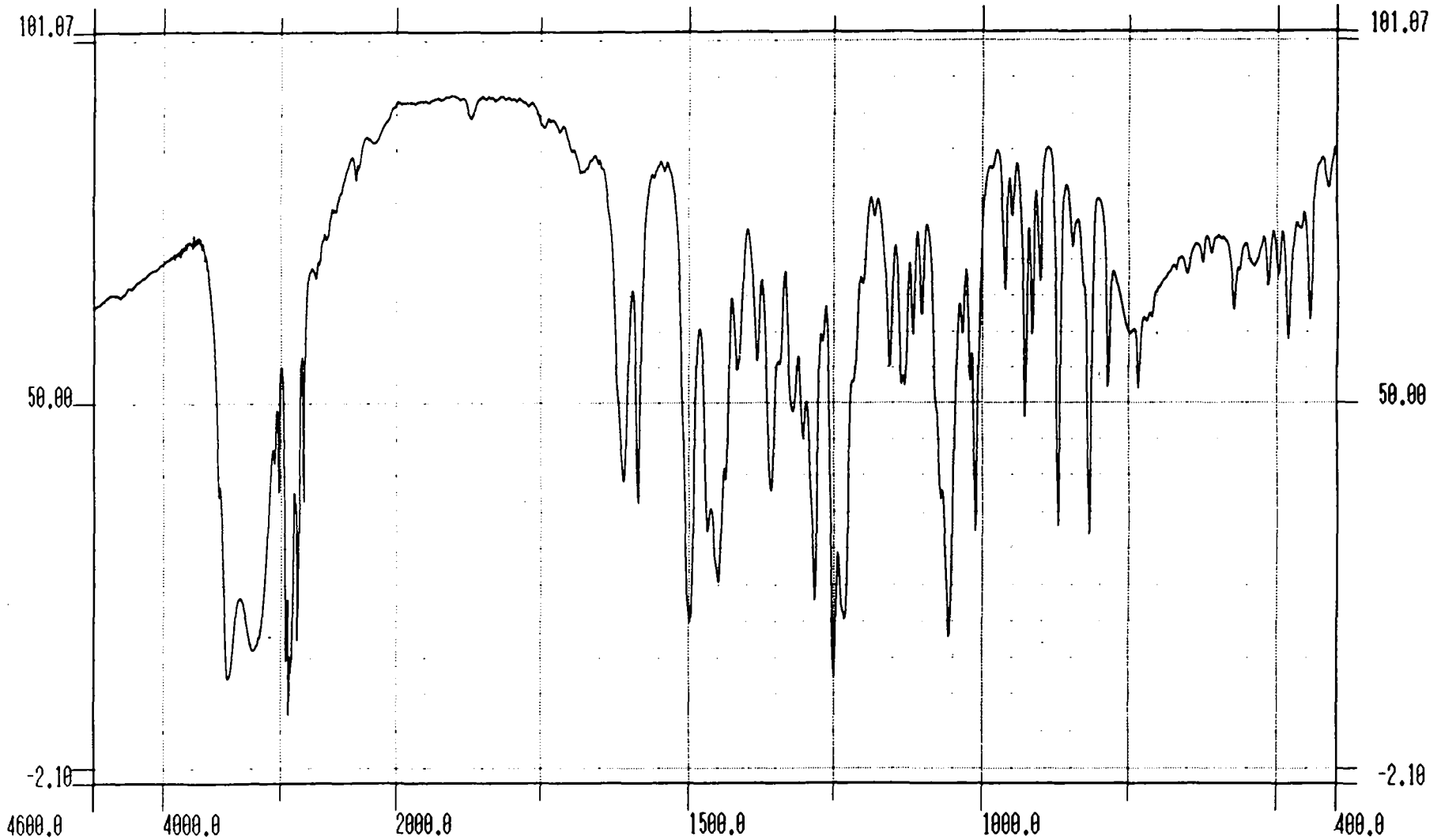


Figura 8 Espectro no infravermelho de 17β-estradiol em pastilhas de KBr

cm<sup>-1</sup>

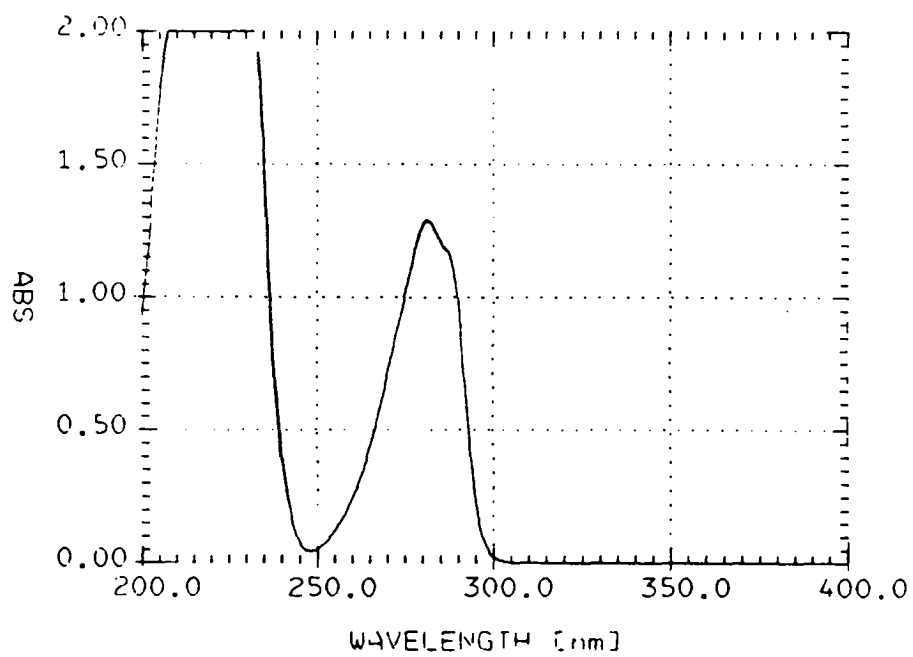


Figura 9 Espectro na região ultravioleta de 17β-estradiol em metanol

## Análise granulométrica:

Tabela 4 Distribuição granulométrica do estradiol Sigma®

Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Freqüência cumulativa (%)	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Freqüência cumulativa (%)	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Freqüência cumulativa (%)
<34	12,87	578	80,79	1122	96,69
68	26,31	612	82,50	1156	97,07
102	37,84	646	83,83	1190	97,64
136	47,03	680	84,69	1224	97,83
170	52,27	714	85,93	1258	98,02
204	55,42	748	87,07	1292	98,31
238	59,04	782	88,40	1326	98,31
272	61,90	816	89,73	1360	98,40
306	63,81	850	90,68	1394	98,78
340	66,29	884	91,92	1428	98,97
374	68,20	918	92,68	1496	99,06
408	70,01	952	93,44	1564	99,15
442	71,92	986	93,92	1598	99,24
476	73,73	1020	94,78	1768	99,33
510	75,73	1054	95,54	1870	99,42
544	76,97	1088	96,40		

Tabela 5 Distribuição granulométrica do estradiol micronizado

Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Frequência cumulativa (%)	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Frequência cumulativa (%)	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Frequência cumulativa (%)
0,90	8,07	6,00	67,53	43,00	100,00
1,10	11,62	7,50	78,50	51,00	100,00
1,30	14,86	9,00	86,04	61,00	100,00
1,50	17,87	10,50	90,90	73,00	100,00
1,80	22,05	12,50	94,78	87,00	100,00
2,20	27,20	15,00	97,38	103,00	100,00
2,60	32,03	18,00	98,86	123,00	100,00
3,10	37,81	21,00	99,49	147,00	100,00
3,70	44,52	25,00	99,82	175,00	100,00
4,30	51,01	30,00	99,99		
5,00	58,28	36,00	100,00		

## 3.1.5 Hidroxietilcelulose

Tabela 6 Testes utilizados para hidroxietilcelulose

Testes	Especificação	Resultado
Identificação		
A	permanecer límpido	de acordo
B	formação de filme	de acordo
C	coloração vermelha	
pH	6,5 - 8,0	5,2
Perda por dessecação	não exceder 10,0 %	de acordo (6.82 %)

### 3.1.6 Metilparabeno

**Identificação:**

Espectro de infravermelho confere com espectro padrão de DIBBERN (1978), (figura 10).

Espectro de ultravioleta obtido, confere com espectro de padrão de DIBBERN (1978), (figura 12).

**Determinação do ponto de fusão:**

131 -134 °C.

**Perda por dessecação:**

0,38 %, as perdas não excedem os 0,5 % estipulados.

### 3.1.7 Polissorbato 20

Tabela 7 Testes realizados para polissorbato 20

Teste	Especificação	Resultado
Identificação		
A	solução opalescente	de acordo
Índice de Saponificação	40 a 50	49,55

### 3.1.8 Propilparabeno

**Identificação:**

Espectro infravermelho obtido confere com espectro padrão de DIBBERN (1978), (Figura 11).

XT

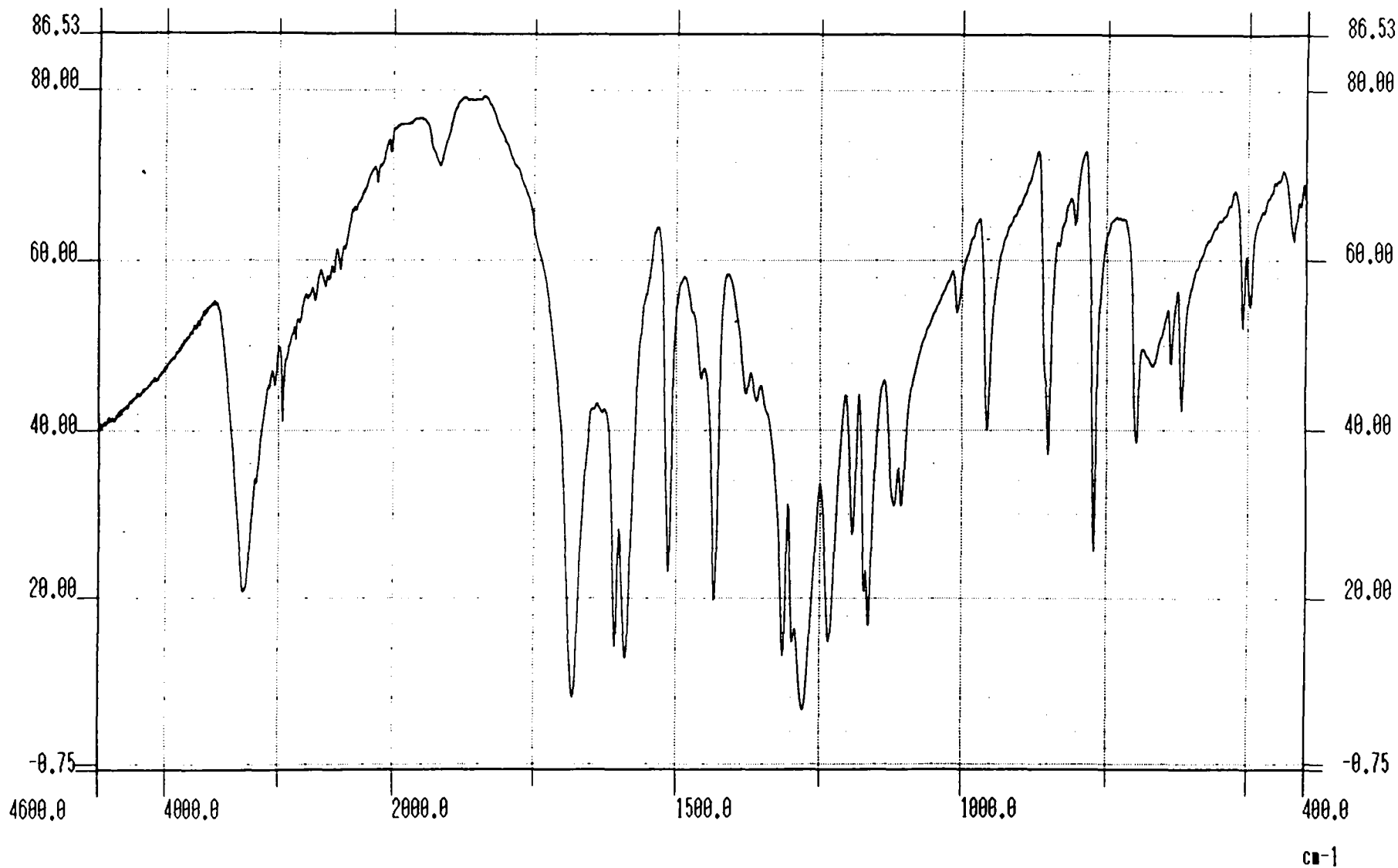


Figura 10 Espectro no infravermelho de metilparabeno em pastilhas de KBr

xT

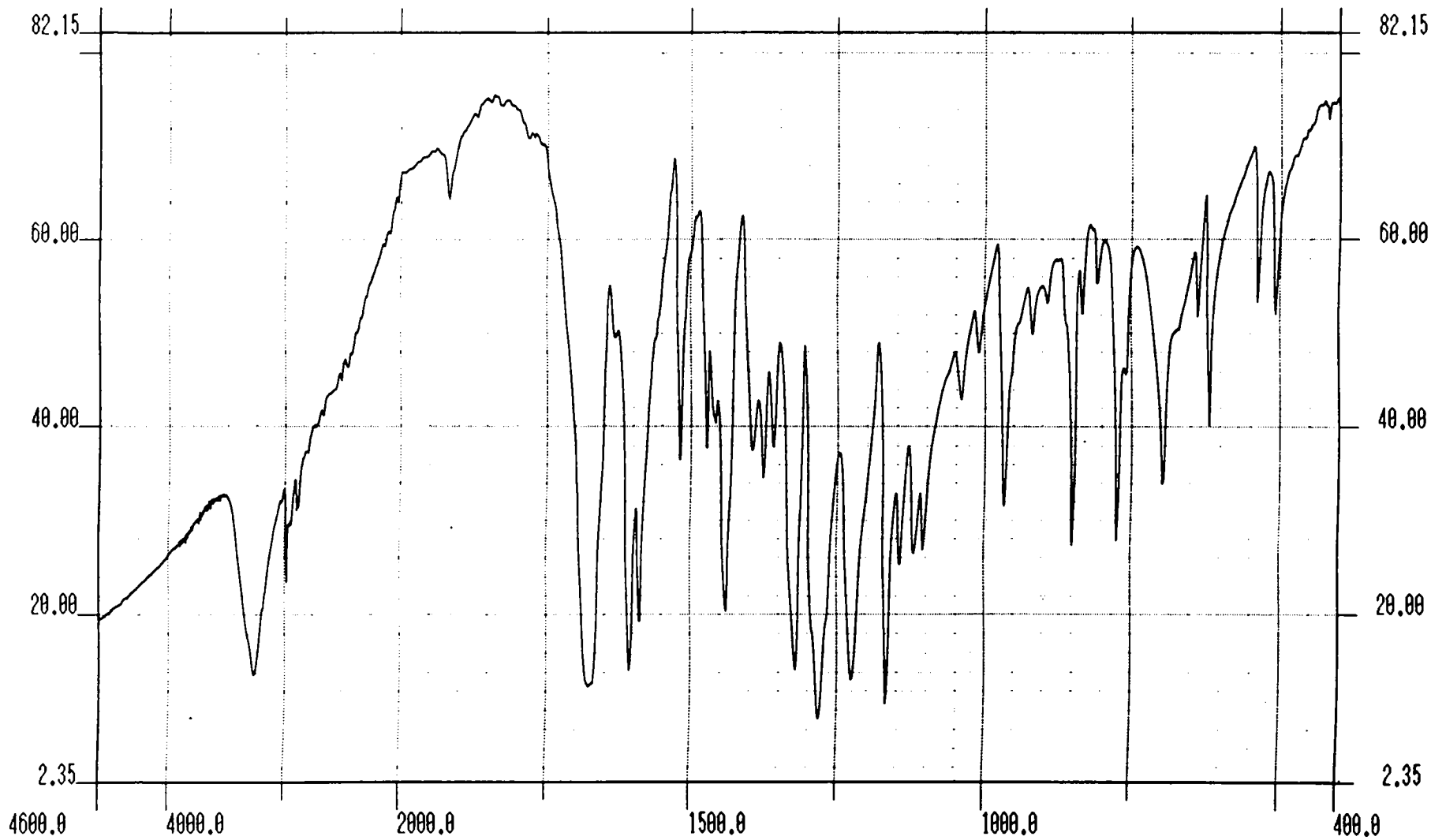


Figura 11 Espectro no infravermelho de propilparabeno em pastilhas de KBr

cm-1

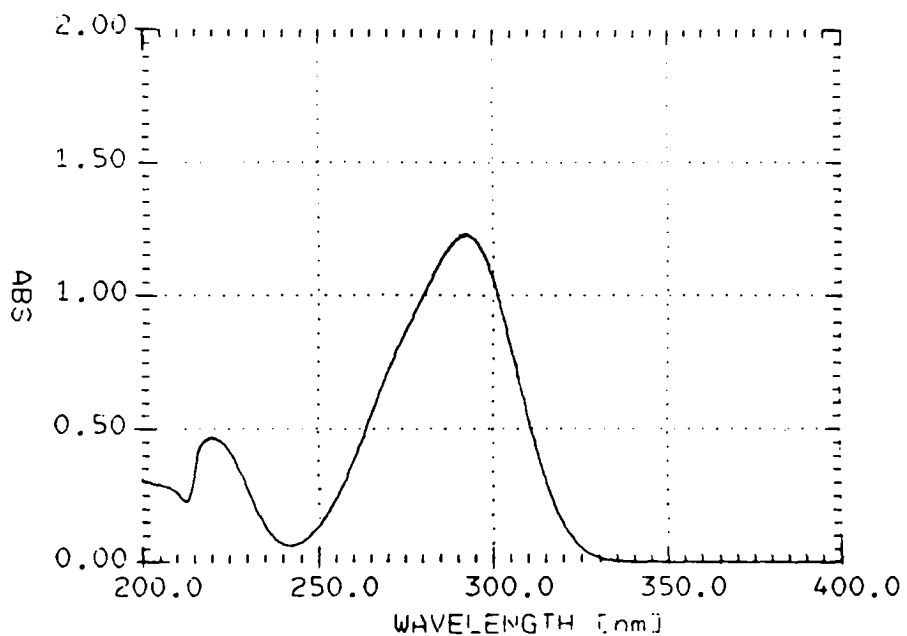


Figura 12 Espectro na região ultravioleta de metilparabeno em NaOH 0,1M

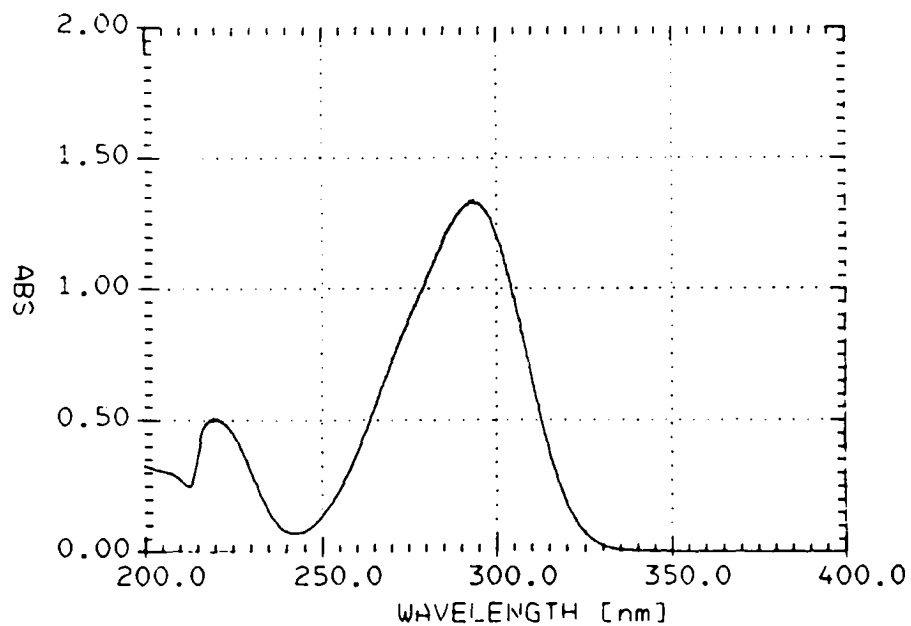


Figura 13 - Espectro na região ultravioleta de propilparabeno em NaOH 0,1M.



Ponto de fusão:

95 a 100 °C.

Perda por dessecação:

0,39 %, as perdas não excedem os 0,5 % estipulados.

## **3.2 DESENVOLVIMENTO DOS GÉIS**

### **3.2.1 Observações**

Os géis foram analisados de forma preliminar quanto a suas características organolépticas, fazendo-se, sempre que possível, uma comparação com o Oestrogel<sup>®</sup>.

#### **3.2.1.1 Bases de Carbômero**

##### **3.2.1.1.1 Formulação A**

Observou-se turvação inicial quando a solução etanólica de estradiol foi vertida sobre a dispersão aquosa de carbômero, que desapareceu dentro de uma semana.

##### **3.2.1.1.2 Formulação B**

No momento da preparação ocorreu pequena turvação que foi eliminada com a adição de NaOH. O polissorbato utilizado apresentava-se levemente amarelado, conferindo esta característica ao produto final.

#### 3.2.1.1.3 Formulação C

Ocorreu turvação no momento da preparação, que persistiu até 15 dias após preparação. A consistência parece ser bem maior que os outros géis de carbômero desenvolvidos.

#### 3.2.1.1.4 Formulação D

Obteve-se um gel turvo, com características de consistência semelhantes aos demais géis de carbômero, característica esta, que se mantém mesmo após passados 15 dias.

#### 3.2.1.1.5 Formulação E

Gel obtido com aparência bastante próxima do Oestrogel®. Observa-se grande quantidade de ar incluída no gel.

#### 3.2.1.1.6 Formulações F e G

Produtos com grande turvação que diminui no momento da alcalinização e retorna ao promover-se a homogeneização final com espátula.

### 3.2.1.2 Bases de carboximetilcelulose sódica

#### 3.2.1.2.1 Formulação A

O gel obtido apresentou leve turvação, com consistência bem menor que os géis obtidos com carbômero.

#### 3.2.1.2.2 Formulação B

O gel assim obtido apresentou intensa turvação que desapareceu após sete dias, apresentando aspecto grumoso.

#### 3.2.1.3 Bases de metilcelulose

##### 3.2.1.3.1 Formulação A

O gel obtido apresentou-se com forte turvação, sem mostrar grânulos.

##### 3.2.1.3.2 Formulações B e C

Ambas formulações apresentaram-se líquidas, mesmo decorridas 24 h, não sofrendo a gelificação.

#### 3.2.1.4 Bases de hidroxietilcelulose

##### 3.2.1.4.1 Formulação A

Ocorreu turvação no momento da mistura da solução etanólica de estradiol à dispersão celulósica. Passados 30 min começou a ocorrer uma separação de fases, que, pela homogeneização conduziu a um gel turvo. Passadas 12 h havia ainda persistência da turvação.

##### 3.2.1.4.2 Formulação B

Ocorreu leve turvação no momento da mistura da solução etanólica de estradiol à dispersão celulósica, que tende a desaparecer com a posterior formação de espuma. Passadas 12 h observou-se um gel

semelhante ao Oestrogel<sup>®</sup> e com redução da turvação, porém com grande quantidade de bolhas de ar.

#### 3.2.1.4.3 Formulações C e D

Produtos obtidos com características bastante próximas às características do Oestrogel<sup>®</sup>.

### 3.3 PRÉ-TESTE DE PERMEABILIDADE DO ESTRADIOL ATRAVÉS DA PELE

Tabela 8 Valores de peso uterino e níveis de estradiol (E2)

Grupo	peso uterino (mg)			E2 (pg/ml)	
	dia 4	dia 7	dia 10	dia 4	dia 10
I gel HEC (2.3.4.4 p. 45)	295±22*	385±46*	407±38*	3271±126*	7391±206*
II gel CBP (2.3.1.7 p. 41)	265±21*	355±21*	353±47*	4691±186*	10091±126*
III Oestrogel	340±5*	358±16*	349±21*	4241±46*	809±184*
IV val E2	286±19*	302±18*	3582±2*	-	6936±56*
controle			118±6		181±26

\* diferença significativa para  $\alpha=0.05$ .

### 3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

#### 3.4.1 Ensaio Preliminares

Cromatograma do solução padrão de estradiol de 400 µg / ml em acetonitrila, apresentou tempo de retenção de 7,60 min, com área média de 7453432 (mV.s) com um desvio padrão de 65308 e coeficiente de variação percentual de 0,88(n=3).

#### 3.4.2 Curva padrão de estradiol

Tabela 9 Concentrações de soluções de estradiol em acetonitrila com respectivas áreas dos picos referentes ao estradiol determinadas por CLAE

concentração (g/ml)	área média(mV.s)	±s	CV %
1	22784	962	4,22
2	38102	508	1,33
4	710045	780	1,10
8	124135	1145	0,92
12	211401	1484	0,70
16	278181	1688	0,61
20	357658	2603	0,73
24	419023	2627	0,63
28	493093	2042	0,41
32	558156	2973	0,53

(n=3)

### 3.4.3 Verificação da eficiência de extração dos constituintes dos géis com base de carbômero

#### 3.4.3.1 Verificação da eficiência de extração de estradiol

Tabela 10 Áreas e percentual de extração (PE) de estradiol de géis de carbômero

amostra	área média(mV.s)	s	CV %	massa (mg)	PE (%)
padrão	113967	1822	1,60	500,0	100
gel 1	112754	356	0,32	500,6	98,81
gel 2	113647	757	0,67	501,4	99,44
gel 3	112740	851	0,75	494,3	100,06
gel 4	111747	507	0,45	499,0	98,25
gel 5	108508	2075	1,9	503,7	94,73

(n=3)

#### 3.4.3.2 Verificação da eficiência de extração de metilparabeno

Tabela 11 Áreas e percentual de extração (PE) de metilparabeno de géis de carbômero

amostra	área média(mV.s)	s	CV %	massa (mg)	PE (%)
padrão	424665	390	0,09	---	100
gel 1	429217	5997	1,39	500,6	100,95
gel 2	423503	1236	0,29	500,2	99,69
gel 3	438365	3687	0,84	501,4	102,94
gel 4	432081	2548	0,59	494,3	102,92
gel 5	426395	988	0,25	499,4	100,53

(n=3)

### 3.4.3.3 Verificação da eficiência de extração de propilparabeno

Tabela 12 Áreas e percentual de extração (PE) de propilparabeno de géis de carbômero

amostra	área média(mV.s)	s	CV %	massa (mg)	PE (%)
padrão	114503	432	0,38	---	100
gel 1	110396	428	0,39	500,6	96,30
gel 2	113309	441	0,39	500,2	98,92
gel 3	116517	828	0,71	501,4	101,47
gel 4	110309	1867	1,69	494,3	97,45
gel 5	111560	430	0,38	499,4	97,55

(n=3)

### 3.4.4 Verificação da eficiência de extração de substâncias de géis de base de hidroxietilcelulose

#### 3.4.4.1 Verificação da eficiência de extração de estradiol

Tabela 13 Áreas e percentuais de extração (PE) de estradiol (E2) de géis de hidroxietilcelulose (n=3)

amostra	área média(mV.s)	s	CV %	massa (mg)	PE (%)
padrão E2	441140	2361	0,54	---	100
gel 1	425275	4399	1,03	489,2	98,53
gel 2	451267	1986	0,44	504,4	101,40
gel 3	431925	796	0,18	495,5	98,80
gel 4	434130	1325	0,31	498,7	98,67
gel 5	412068	2704	0,66	493,6	94,62

## 3.4.4.2 Verificação da eficiência de extração de metilparabeno

Tabela 14 Áreas e percentuais de extração (PE) de metilparabeno de géis de hidroxietilcelulose (n=3)

amostra	área média(mV.s)	s	CV %	massa (mg)	PE(%)
padrão	1149745	2580	0,22	---	100,00
gel 1	1151391	6301	0,55	501,6	99,82
gel 2	1206804	1552	0,13	502,2	104,50
gel 3	1150257	4736	0,41	502,6	99,55
gel 4	1167934	963	0,08	502,6	101,06
gel 5	1042840	2790	0,27	497,2	91,21

## 3.4.4.3 Verificação de eficiência de extração de propilparabeno

Tabela 15 Áreas e percentuais de extração (PE) de propilparabeno de géis de hidroxietilcelulose

amostra	área média(mV.s)	s	CV %	massa (mg)	PE(%)
padrão	237727	1640	0,69	---	100,00
gel 1	242080	1172	0,48	501,6	101,51
gel 2	252116	5991	2,38	502,2	104,75
gel 3	236138	3324	1,41	502,6	98,82
gel 4	213923	2086	0,97	497,2	90,49
gel 5	240612	1689	0,70	502,6	100,69

(n=3)



### 3.5 DETERMINAÇÃO DA CONSISTÊNCIA

TABELA 16 Consistência das bases de hidroxietilcelulose 2 % e carbômero 0,5 %, determinadas com penetrômetro à temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C)

Amostra	Penetração (mm)		
	n	Pmédio $\pm$ s	CV%
Base hidroxietilcelulose 2 %	8	370,8 $\pm$ 8,39	2,26
Base carbômero 0,5 %	8	396,8 $\pm$ 8,66	2,18

TABELA 17 Consistência dos géis de estradiol (E2) com as diferentes bases

Amostra	Penetração (mm)		
	n	Pmédio $\pm$ s	CV%
Gel E2 hidroxietilcelulose	8	382,9 $\pm$ 8,17	2,13
Gel E2 carbômero	8	388,7 $\pm$ 5,90	1,52

### 3.6 - DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE.

TABELA 18 Valores de espalhabilidade (EI) da base de carbômero em função do peso adicionado

Peso (g)	diâmetro $\pm$ s (mm)	CV %	EI (mm <sup>2</sup> )
46,78	38,0 $\pm$ 1,80	4,74	1134,11
100,87	46,0 $\pm$ 1,32	2,88	1661,90
148,33	51,8 $\pm$ 0,58	1,11	2107,41
195,26	56,3 $\pm$ 0,58	1,02	2489,69
263,10	59,5 $\pm$ 0,50	0,84	2780,51
330,14	62,7 $\pm$ 0,29	0,46	3087,63
378,09	65,2 $\pm$ 0,76	1,17	3338,76
426,60	67,3 $\pm$ 0,58	0,86	3557,30
496,87	69,2 $\pm$ 0,76	1,10	3760,99
566,64	71,3 $\pm$ 0,29	0,40	3992,72
637,64	72,7 $\pm$ 0,29	0,40	4151,06
710,00	74,7 $\pm$ 0,76	1,02	4382,59
759,19	76,0 $\pm$ 0,50	0,66	4536,46
828,93	78,2 $\pm$ 1,26	1,61	4802,90
878,33	79,9 $\pm$ 1,13	1,25	5013,99
930,22	81,0 $\pm$ 1,00	1,23	5153,00

(n=3)

TABELA 19 Valores de espalhabilidade (EI) de gel de carbômero (formulação 2.3.1.7, p. 41) em função do peso adicionado

Peso (g)	diâmetro $\pm$ s (mm)	CV%	EI (mm <sup>2</sup> )
46,78	37,5 $\pm$ 0,0	0,0	1104,47
10,87	45,2 $\pm$ 1,25	2,79	1604,60
148,33	50,2 $\pm$ 1,53	3,04	1979,23
195,26	54,5 $\pm$ 1,32	2,43	2332,83
263,10	58,2 $\pm$ 0,29	0,50	2660,33
330,14	61,0 $\pm$ 0,87	1,42	2922,46
378,09	63,2 $\pm$ 0,58	0,91	3137,07
426,60	65,5 $\pm$ 0,50	0,76	3369,55
496,87	67,0 $\pm$ 0,50	0,75	3525,65
566,64	69,2 $\pm$ 0,29	0,42	3760,99
637,64	71,3 $\pm$ 0,29	0,40	3992,72
710,00	72,3 $\pm$ 1,89	2,02	4105,50
759,19	74,2 $\pm$ 0,29	0,39	4324,12
828,93	75,0 $\pm$ 0,50	0,67	4417,86
878,33	76,0 $\pm$ 0,87	1,14	4536,46
930,22	76,7 $\pm$ 0,76	1,00	4620,41

(n=3)

TABELA 20 Valores de espalhabilidade (EI) obtidos com a base hidroxietilcelulose 2 % em função do peso adicionado

Peso (g)	diâmetro $\pm$ s (mm)	CV%	EI (mm <sup>2</sup> )
46,78	28,8 $\pm$ 0,29	1,00	651,44
100,87	33,7 $\pm$ 0,76	2,27	891,97
148,33	36,5 $\pm$ 0,87	2,37	1046,35
195,26	38,4 $\pm$ 0,80	2,09	1158,12
263,10	40,2 $\pm$ 0,46	1,90	1269,23
330,14	42,2 $\pm$ 0,95	2,24	1398,67
378,09	43,4 $\pm$ 0,72	1,66	1479,34
426,60	45,0 $\pm$ 0,50	1,11	1590,43
496,87	46,1 $\pm$ 0,76	1,66	1669,14
566,64	47,3 $\pm$ 0,38	0,81	1757,16
637,64	48,3 $\pm$ 0,90	1,87	1832,25
710,00	49,0 $\pm$ 1,00	2,04	1885,74
759,19	50,2 $\pm$ 0,76	1,52	1979,23
828,93	50,9 $\pm$ 1,01	1,98	2034,82
878,33	51,8 $\pm$ 1,25	2,42	2107,41
930,22	52,7 $\pm$ 1,26	2,39	2181,28
999,58	53,9 $\pm$ 1,01	1,87	2281,75

(n=3)

TABELA 21 Valores de espalhabilidade (EI) de gel de hidroxietilcelulose 2 % (formulação 2.3.4.4, p. 45) em função do peso adicionado

Peso (g)	diâmetro $\pm$ s (mm)	CV%	EI (mm <sup>2</sup> )
46,78	30,5 $\pm$ 0,0	0,00	730,62
100,87	35,5 $\pm$ 0,25	0,70	989,80
148,33	38,8 $\pm$ 0,38	0,98	1182,37
195,26	41,2 $\pm$ 0,38	0,93	1333,17
263,10	43,7 $\pm$ 0,14	0,33	1499,87
330,14	46,1 $\pm$ 0,14	0,31	1669,14
378,09	47,7 $\pm$ 0,14	0,30	1787,01
426,60	49,2 $\pm$ 0,63	1,28	1901,17
496,87	50,7 $\pm$ 0,29	0,57	2018,86
566,64	52,3 $\pm$ 0,25	0,48	2148,29
637,64	53,5 $\pm$ 0,43	0,81	2248,01
710,00	54,8 $\pm$ 0,14	0,26	2358,59
759,19	55,9 $\pm$ 0,38	0,68	2454,22
828,93	57,3 $\pm$ 0,29	0,50	2578,69
878,33	58,3 $\pm$ 0,38	0,65	2669,48
930,22	59,0 $\pm$ 0,43	0,73	2733,97

(n=3)

### 3.7 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Tabela 22 Microrganismos viáveis totais (m.v.t.) e *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) nos géis de carbômero e hidroxietilcelulose (n=3)

Item	Requisito	Gel	
		carbômero	hidroxietilcelulose
<b>m.v.t.</b>			
bactérias	<10 <sup>2</sup> UFC/g*	<10 UFC/g*	<10 UFC/g*
fungos	ausente	ausente	ausente
<b><i>S. aureus</i></b>	ausente	ausente	ausente

\* Unidades Formadoras de Colônias por grama de produto.

### 3.8 AVALIAÇÃO DA LIODISPONIBILIDADE

As amostras submetidas ao ensaio de cedência *in vitro* (géis de carbômero, hidroxietilcelulose e Oestrogel®), com as membranas de acetato de celulose, colódio + dodecanol e papel de filtro, não apresentaram quantidades detectáveis de estradiol por espectrofotometria no ultravioleta no líquido acceptor mesmo após decorrido 15 h de circulação do líquido acceptor.

### 3.9 PRÉ-TESTE DE ABSORÇÃO DE ESTRADIOL EM MEMBRANAS DE COLÓDIO COM DODECANOL

3.9.1 Doseamento de estradiol em membranas de colódio após 3 h em contato com géis de hidroxietilcelulose

Tabela 23 Quantidades de estradiol (Q) nas membranas de colódio em contato durante 3 h com gel de hidroxietilcelulose

membrana	área média(mV.s)	s	CV %	Q( $\mu$ g)
1	72392	2917	4,03	21,84
2	93892	578	0,62	28,36
3	113342	6621	5,84	33,52
4	96395	195	0,20	29,08
5	58646	2060	3,51	17,04

Tabela 24 Relação  $\Delta E$  entre a quantidade aplicada de gel de hidroxietilcelulose (Ga) e a quantidade absorvida de estradiol (Qa), para contato de 3 h.

membrana	massa (mg)	Ga (mg)	massa abs.. (mg)	Qa( $\mu$ g)	E
1	50,0	87,1	2,6	21,84	3.99
2	59,1	70,2	1,4	28,23	2.49
3	49,2	99,5	1,4	33,52	2.97
4	57,8	63,1	1,5	29,08	2.17
5	59,3	95,3	1,3	17,04	2.59

### 3.9.2 Doseamento de estradiol em membranas de colódio após 4 h em contato com géis de hidroxietilcelulose

Tabela 25 Quantidade de estradiol (Q) em membranas de colódio em contato com géis de hidroxietilcelulose durante 4 h

membrana	área média(mV.s)	s	CV %	Q (µg)
1	73999	2688	3,63	22,32
2	136609	14110	10,32	41,24
3	139164	4757	3,42	42,0
4	92504	2759	2,98	27,92
5	69593	1023	1,47	21,00

Tabela 26 Relação  $\Delta E$  entre a quantidade aplicada de gel de hidroxietilcelulose (Ga) e a quantidade absorvida de estradiol (Qa), para 4 h de contato.

membrana	massa (mg)	Ga (mg)	massa abs. (mg)	Qa(µg)	E
1	36,6	53,2	3,8	22,32	2.38
2	42,8	90,9	0,6	41,24	2.20
3	57,7	95,9	3,2	42,00	2.28
4	58,8	64,4	1,1	27,92	2.31
5	57,2	55,4	1,9	21,00	2.64



### 3.9.3 Doseamento de estradiol em membranas de colódio após 3 h de contato com géis de carbômero

Tabela 27 Quantidade de estradiol (Q) em membranas de colódio em contato com géis de carbômero durante 3 h

membrana	área média(mV.s)	s	CV %	Q (µg)
1	66677	3102	4.65	16,28
2	97012	3210	3.31	23,68
3	65511	2900	4.43	15,96
4	135902	5200	3.82	33,16
5	98799	7560	7.65	24,12

Tabela 28 Relação  $\Delta E$  entre a quantidade aplicada de gel de carbômero (Ga) e a quantidade absorvida de estradiol (Qa), para 3 h de contato

membrana	massa (mg)	Ga (mg)	massa abs. (mg)	Qa(µg)	E
1	61,5	56,8	3,3	16,28	3,49
2	57,7	76,0	3,7	23,68	3,21
3	55,7	57,4	1,6	15,96	3,60
4	56,4	95,2	2,9	33,16	2,87
5	33,7	57,0	1,8	24,12	2,36

3.9.4 Doseamento de estradiol em membranas de colódio após 4 h em contato com géis de carbômero

Tabela 29 Quantidade de estradiol (Q) em membranas de colódio em contato com géis de carbômero durante 4 h.

membrana	área média(mV/s)	s	CV %	Q (µg)
1	59031	1298	2,20	14,40
2	67946	1432	2,11	16,56
3	103927	2422	2,33	25,36
4	79038	3316	4,20	19,28
5	103897	4109	3,95	25,36

Tabela 30 Relação  $\Delta E$  entre a quantidade aplicada de gel de carbômero (Ga) e a quantidade absorvida de estradiol (Qa), para 4 h de contato

membrana	massa (mg)	Ga (mg)	massa abs. (mg)	Qa(µg)	E
1	17,2	71,5	2,3	14,40	4,97
2	22,9	68,7	1,5	16,56	4,15
3	30,4	82,2	7,2	25,36	3,24
4	24,6	75,6	3,6	19,28	3,92
5	31,0	64,2	6,7	25,36	2,53

### 3.9.5 Doseamento de estradiol em membranas de colódio 3 h em contato com Oestrogel®

Tabela 31 Quantidade de estradiol (Q) em membranas de colódio em contato com Oestrogel® durante 3 h

membrana	área média (mV.s)	s	CV %	Q( $\mu$ g)
1	98198	2646	2,69	23,96
2	112292	7464	6,65	27,40
3	95681	2952	3,08	23,36
4	94167	4525	4,81	22,96
5	119670	4859	4,06	29,20

Tabela 32 Relação  $\Delta E$  entre a quantidade aplicada de Oestrogel® (Ga) e a quantidade absorvida de estradiol (Qa), para 3 h de contato

membrana	massa (mg)	Ga (mg)	massa abs. (mg)	Qa( $\mu$ g)	E
1	26,7	137,4	1,8	23,96	5,73
2	23,9	81,4	2,3	27,40	2,97
3	27,4	64,6	1,3	23,36	2,77
4	31,1	63,4	3,9	22,96	2,76
5	32,6	61,2	2,8	29,20	2,10

### 3.9.6 Doseamento de estradiol em membranas de colódio 4 h em contato com Oestrogel<sup>®</sup>

Tabela 33 Quantidade de estradiol (Q) em membranas de colódio em contato com oestrogel<sup>®</sup> após 4 h

membrana	área média (mV.s)	s	CV %	Q (µg)
1	107571	2555	2,37	26,24
2	85370	3727	4,37	20,84
3	76731	1348	1,76	18,72
4	71681	1259	1,76	17,48
5	84431	3240	3,84	20,60

Tabela 34 Relação  $\Delta E$  entre a quantidade aplicada de Oestrogel<sup>®</sup> (Ga) e a quantidade absorvida de estradiol (Qa), para 4h de contato

membrana	massa (mg)	Ga (mg)	massa abs. (mg)	Qa(µg)	E
1	27,1	63,3	0,8	26,24	2,41
2	33,2	44,8	2,9	20,84	2,15
3	28,5	40,5	2,1	18,72	2,16
4	32,4	43,3	1,4	17,48	2,48
5	25,9	48,5	2,8	20,60	2,35

### 3.10 ANÁLISE TÉRMICA

#### 3.10.1 Análise de substâncias isoladas(matérias-primas)

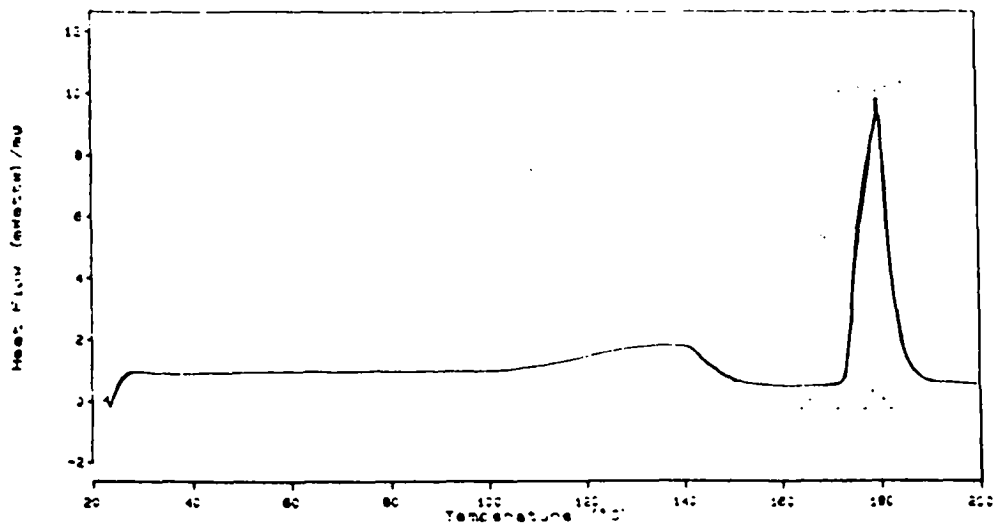


Figura 14 Termograma do estradiol. (20-200 °C, velocidade de varredura = 20,0 °C min<sup>-1</sup>, amostra = 5,0 mg)

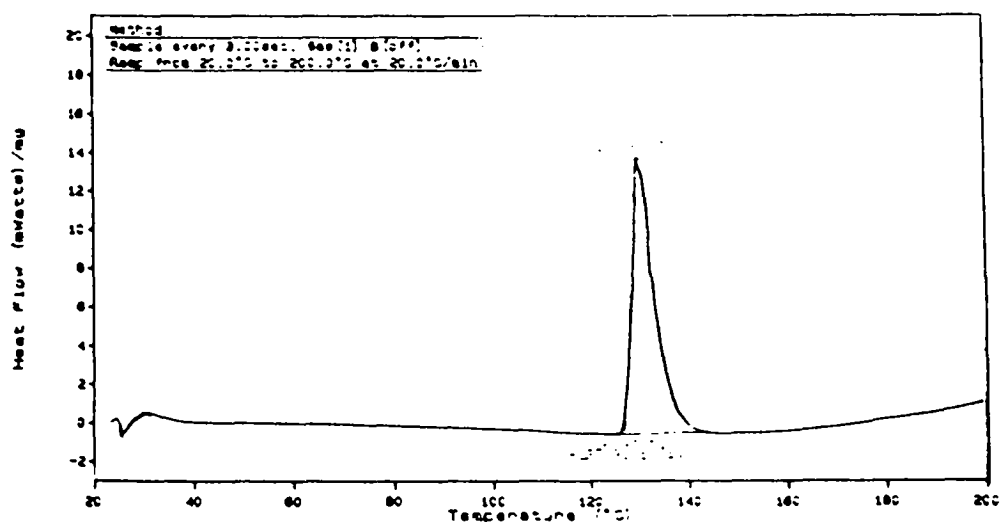


Figura 15 Termograma do metilparabeno. (20-200 °C, velocidade de varredura = 20,0 °C min<sup>-1</sup>, amostra = 5,0 mg)

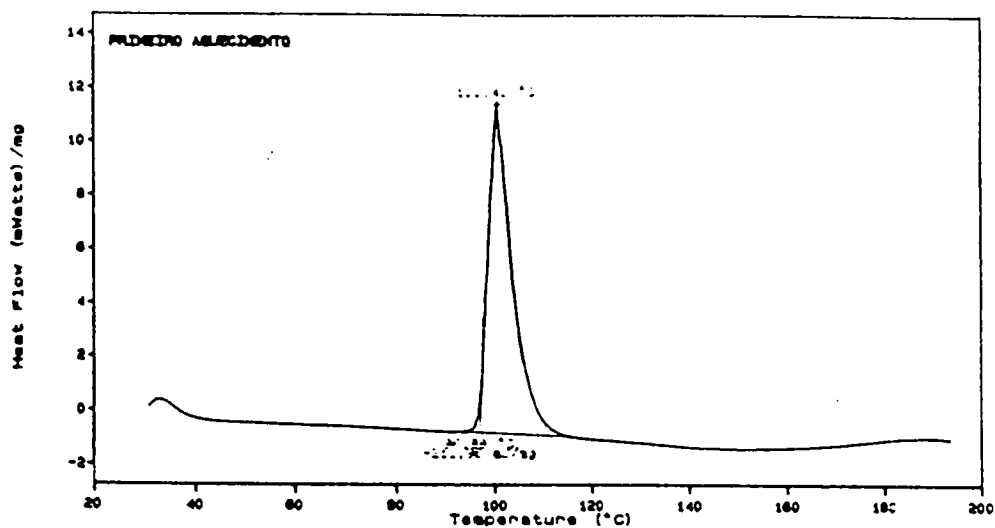


Figura 16 Termograma de propilparabeno (20-200 °C, velocidade de varredura = 20,0 °C min<sup>-1</sup>, amostra = 5,0 mg)

### 3.10.2 Análise de misturas das matérias-primas

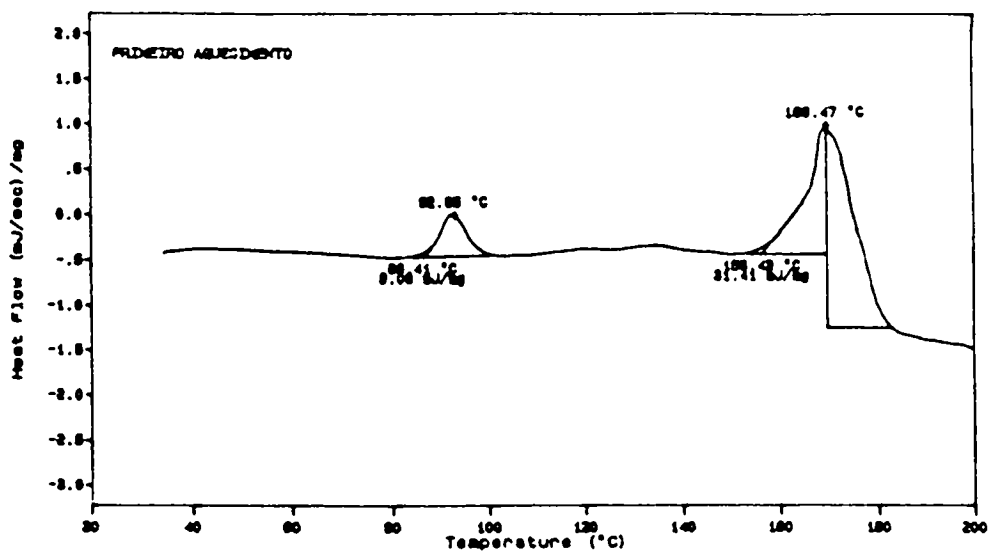


Figura 17 Termograma de mistura de estradiol e metilparabeno. (20-200 °C, velocidade de varredura = 20,0 °C min<sup>-1</sup>, amostra = 5,0 mg)

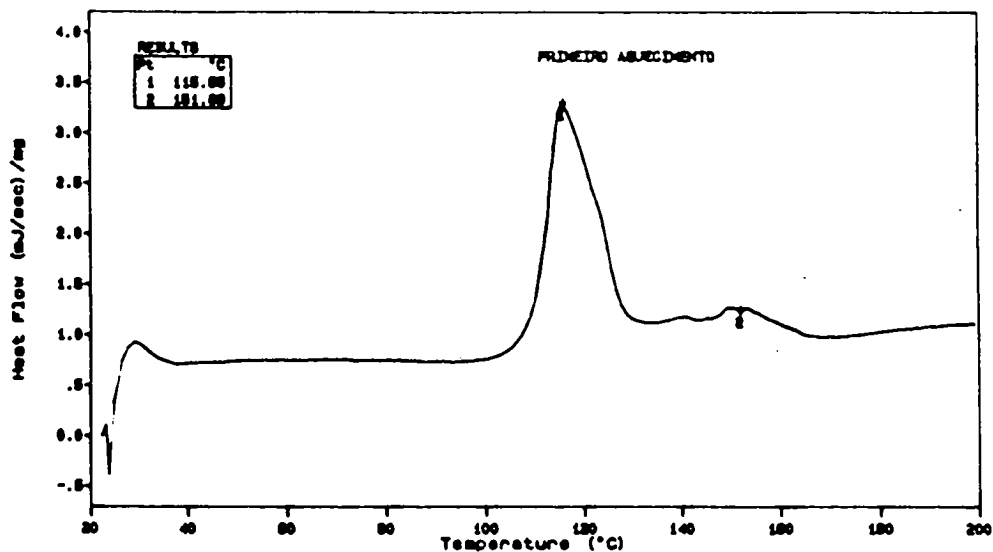


Figura 18 Termograma da mistura de estradiol e propilparabeno. (20-200°C, velocidade de varredura = 20,0 °C min<sup>-1</sup>, amostra = 5,0 mg)

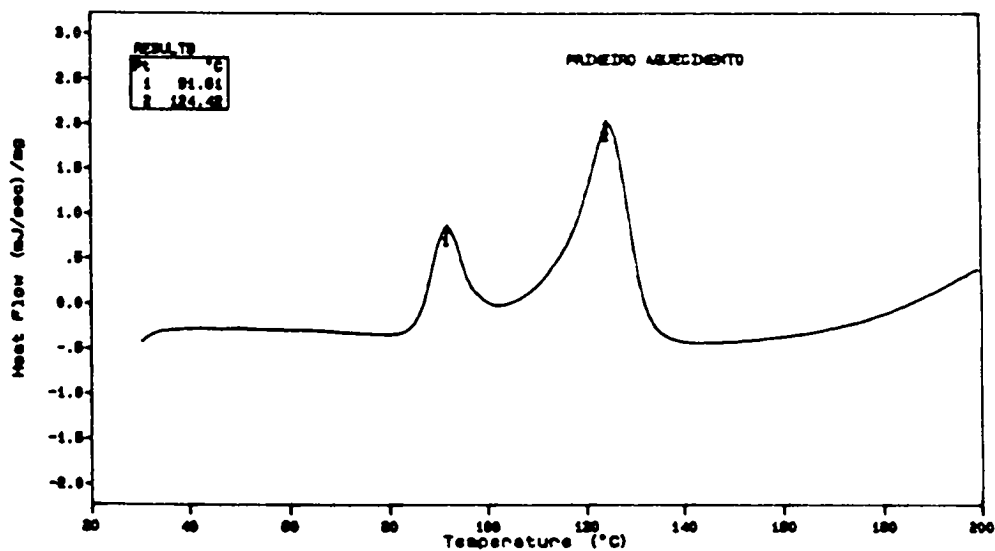


Figura 19 Termograma de mistura de metilparabeno e propilparabeno. (20-200 °C, velocidade de varredura = 20,0 °C min<sup>-1</sup>, amostra = 5,0 mg)

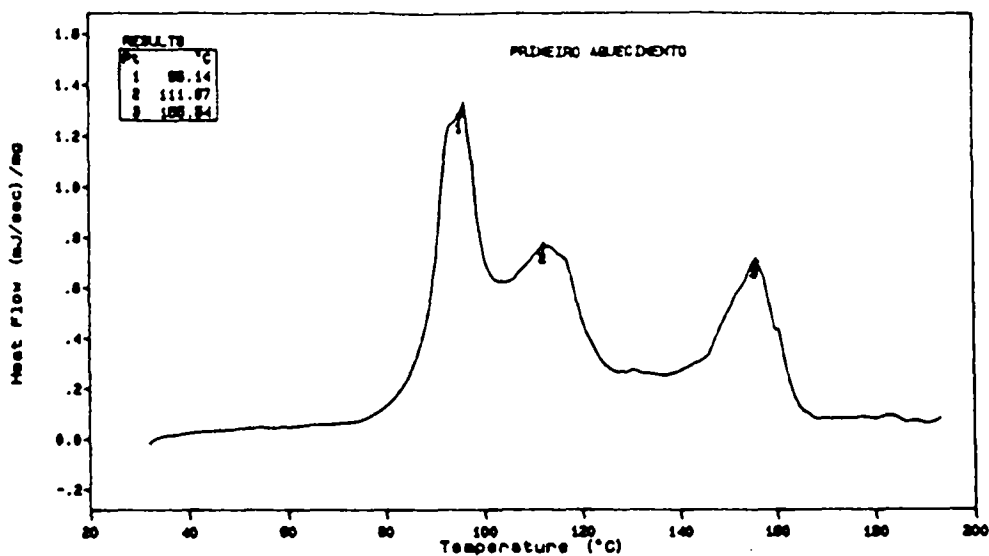


Figura 20 Termograma da mistura de estradiol, metilparabeno e propilparabeno (20-200 °C, velocidade de varredura = 20,0 °C min<sup>-1</sup>, amostra = 5,0 mg)

### 3.10.3 Análise de géis de base de carbômero e hidroxietilcelulose

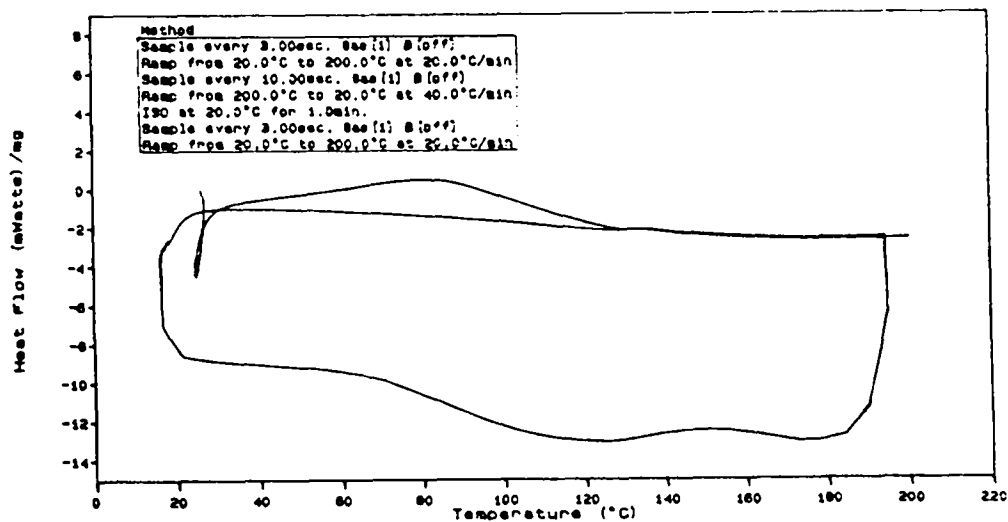


Figura 21 Termograma de gel contendo estradiol com base de carbômero. (20 - 200 °C, velocidade de varredura = 20,0 °C min<sup>-1</sup>, amostra = 5,0 mg)



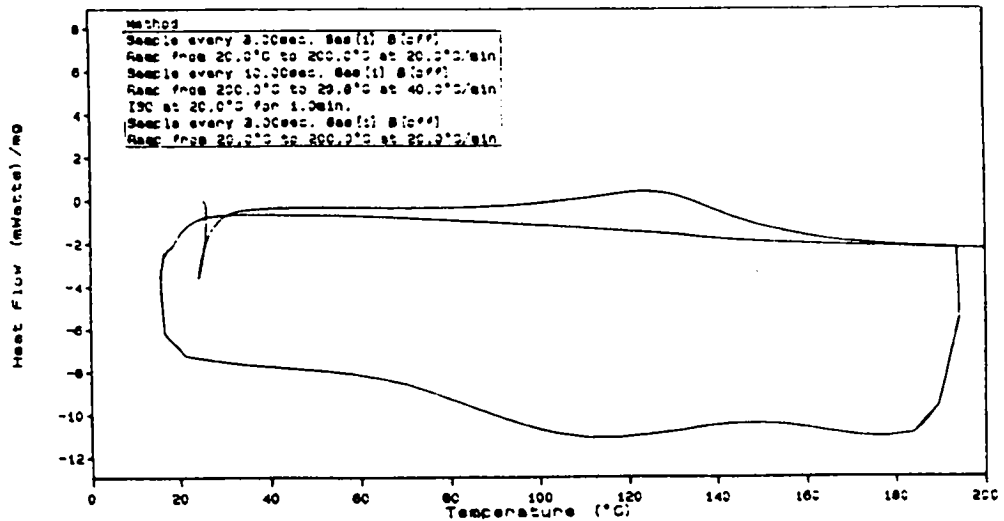


Figura 22 Termograma de gel contendo estradiol com base de hidroxietilcelulose. (20 - 200 °C, velocidade de varredura = 20,0 °C min<sup>-1</sup>, amostra = 5,0 mg)

### 3.11 PRÉ-TESTE DE ESTABILIDADE

#### 3.11.1 Avaliação organoléptica

Os géis foram analisados quanto a cor, odor e aparência, onde verificou-se que ambos os géis apresentaram amarelecimento quando estocados a 35 e 45 °C a partir dos 4 dias de armazenamento.

3.11.2 Quantificação de estradiol, metilparabeno e propilparabeno em géis com base de carbômero

Tabela 35 Percentual de estradiol em géis de carbômero em relação ao gel de carbômero no tempo zero

Temperatura (°C)	tempo (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
10	97,46	102,44	103,31	103,11	100,29	100,09	101,34
25	100,39	103,71	102,30	97,62	100,31	100,18	101,28
35	99,26	101,43	97,62	93,94	98,80	101,65	100,85
45	102,34	100,62	99,02	100,69	99,56	97,09	93,49

(n=3)

Tabela 36 Percentual de metilparabeno em géis de carbômero em relação ao gel de carbopol no tempo zero

temperatura (°C)	tempo (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
10	95,33	103,42	97,69	99,83	101,82	100,67	102,80
25	95,33	103,42	97,69	99,83	101,82	100,67	102,80
35	97,44	98,56	99,50	102,60	100,50	100,41	100,72
45	97,87	96,13	97,81	97,04	103,41	100,47	100,67

(n=3)

Tabela 37 Percentual de propilparabeno em géis de carbômero em relação ao gel de carbômero no tempo zero

Temperatura (°C)	tempo (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
10	95,83	99,37	102,39	95,19	95,11	98,89	100,64
25	91,90	105,33	97,22	98,42	102,29	104,16	102,93
35	95,83	99,37	102,39	95,19	95,11	98,89	100,64
45	93,93	99,49	96,78	91,01	99,05	100,34	100,40

(n=3)

### 3.11.3 Quantificação de estradiol, metilparabeno e propilparabeno em géis de hidroxietilcelulose

Tabela 38 Percentual de estradiol em géis de hidroxietilcelulose em relação ao gel de hidroxietilcelulose no tempo zero

Temperatura (°C)	tempo (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
10	100,59	100,87	98,84	100,39	98,94	97,11	95,61
25	100,37	98,96	101,97	100,95	97,20	98,38	100,90
35	100,87	99,11	99,20	102,64	100,84	100,30	98,66
45	100,25	91,72	90,35	71,45	72,78	51,08	36,98

(n=3)

Tabela 39 Percentual de metilparabeno em géis de hidroxietilcelulose em relação ao gel de hidroxietilcelulose no tempo zero

Temperatura (°C)	tempo (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
10	101,29	101,42	100,50	95,15	104,16	104,18	98,51
25	95,86	106,33	100,74	98,12	98,94	99,92	99,42
35	93,85	99,05	92,29	105,22	99,54	100,20	92,82
45	96,52	99,02	86,83	89,37	96,23	97,19	89,48

(n=3)

Tabela 40 Percentual de propilparabeno em géis de hidroxietilcelulose, em relação ao gel de hidroxietilcelulose no tempo zero

Temperatura (°C)	tempo (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
10	99,43	98,63	98,67	99,31	101,39	98,83	101,54
25	101,34	102,94	98,09	99,06	95,16	96,71	100,48
35	95,59	106,24	96,67	100,05	99,90	105,37	100,72
45	97,47	103,69	95,07	97,89	96,30	102,45	98,31

(n=3)

## 3.11.4 Espalhabilidade de géis de carbômero

Tabela 41 Valores de espalhabilidade (Ei) de gel de carbômero em função do peso adicionado no tempo zero

Peso (g)	diâmetro $\pm$ s (mm)	CV %	Ei (mm <sup>2</sup> )
46,78	39,67 $\pm$ 0,63	1,59	1236
100,87	46,75 $\pm$ 0,66	1,41	1717
148,33	51,50 $\pm$ 0,25	0,48	2083
195,26	55,92 $\pm$ 1,18	2,11	2456
263,10	59,42 $\pm$ 0,88	1,48	2773
330,14	62,33 $\pm$ 0,73	1,22	3051
378,09	64,83 $\pm$ 1,15	1,78	3301
426,60	66,67 $\pm$ 1,04	1,56	3491
496,87	68,33 $\pm$ 1,26	1,84	3667
566,64	69,75 $\pm$ 1,52	2,18	3821
637,64	71,42 $\pm$ 0,88	1,23	4006
710,00	72,67 $\pm$ 1,13	1,55	4147
759,19	73,58 $\pm$ 0,95	1,29	4252
828,93	74,08 $\pm$ 1,18	1,59	4310
878,33	74,75 $\pm$ 1,09	1,46	4388
930,22	75,83 $\pm$ 1,38	1,82	4516
999,58	76,25 $\pm$ 1,39	1,82	4214

(n=3)

## 3.11.5 Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose

Tabela 42 Valores de espalhabilidade (Ei) de gel de hidroxietilcelulose em função do peso adicionado no tempo zero

Peso (g)	diâmetro $\pm$ s (mm)	CV %	Ei (mm <sup>2</sup> )
46,78	29,17 $\pm$ 0,52	1,78	668,29
100,87	33,00 $\pm$ 0,87	2,62	855,30
148,33	36,00 $\pm$ 0,50	1,39	1017,88
195,26	37,83 $\pm$ 0,38	1,01	1123,99
263,10	40,08 $\pm$ 0,52	1,30	1261,67
330,14	41,75 $\pm$ 0,25	0,60	1369,00
378,09	43,42 $\pm$ 0,38	0,88	1480,71
426,60	44,75 $\pm$ 0,25	0,56	1572,81
496,87	46,12 $\pm$ 0,18	0,38	1670,58
566,64	47,50 $\pm$ 0,50	1,05	1772,05
637,64	48,33 $\pm$ 0,63	1,30	1834,52
710,00	49,50 $\pm$ 0,43	0,87	1924,42
759,19	50,67 $\pm$ 0,14	0,28	2016,47
828,93	51,42 $\pm$ 0,38	0,74	2076,61
878,33	52,33 $\pm$ 0,29	0,55	2150,76
930,22	53,17 $\pm$ 0,52	0,98	2220,36
999,58	54,06 $\pm$ 0,38	0,71	2297,08

(n=3)

Tabela 43 Espalhabilidade de géis de carbômero armazenados durante 4 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
46,78	35,75±2,22	6,22	1004	38,42±0,95	2,46	1159	41,50±2,50	6,02	1353	40,92±0,88	2,15	1315
100,87	43,42±0,94	2,18	1481	46,00±0,00	0,00	1662	49,67±2,52	5,06	1938	48,83±1,46	3,00	1873
148,33	48,33±0,76	1,58	1835	50,33±0,76	1,52	1990	55,33±2,25	4,07	2404	55,00±2,18	3,96	2376
195,26	52,75±1,15	2,17	2185	53,92±1,01	1,87	2283	59,50±1,32	2,22	2781	59,42±2,15	3,63	2773
263,10	58,83±1,13	1,98	2718	57,75±1,39	2,41	2619	63,33±0,58	0,91	3150	63,25±2,22	3,51	3142
330,14	59,50±1,32	2,22	2780	60,83±2,08	3,42	2906	65,66±0,76	1,16	3386	66,00±1,98	3,01	3421
378,09	62,00±1,73	2,79	3019	62,83±1,81	2,88	3100	67,75±0,43	0,64	3605	68,08±1,46	2,15	3640
426,60	64,00±1,80	2,82	3217	64,08±1,61	2,51	3225	69,33±0,76	1,10	3775	69,92±0,88	1,25	3840
496,87	65,25±2,14	3,27	3344	66,25±1,89	2,85	3447	70,92±0,38	0,54	3950	71,75±0,66	0,92	4043
566,64	66,50±2,29	3,45	3473	67,58±1,63	2,41	3587	72,08±0,52	0,72	4081	72,75±0,90	1,24	4157
637,64	67,58±3,15	4,65	3587	68,75±1,15	1,67	3712	73,83±1,04	1,41	4281	73,67±0,88	1,19	4263
710,00	68,67±2,75	4,01	3704	69,75±1,15	1,64	3821	75,08±0,80	1,07	4427	74,67±1,01	1,35	4379
759,19	40,00±2,05	2,92	3848	70,92±1,01	1,42	3950	75,75±0,75	0,99	4507	75,50±1,32	1,75	4477
828,93	71,42±1,59	2,22	4006	71,92±1,01	1,40	4065	76,92±1,26	1,64	4647	75,83±1,42	1,87	4516
878,33	72,42±1,59	2,19	4119	72,58±1,01	1,39	4137	78,08±1,04	1,33	4788	76,42±128	1,68	4587
930,22	73,08±1,66	2,28	4195	73,50±1,15	1,56	4243	78,50±0,90	1,15	4840	77,00±1,39	1,81	4657
999,58	74,33±2,31	3,11	4339	74,25±1,39	1,87	4330	79,00±0,87	1,10	4902	77,42±1,01	1,30	4708

(n=3)

Tabela 44 Espalhabilidade de géis de carbômero armazenados durante 8 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
46,78	41,50±0,75	1,81	1353	41,58±1,63	3,91	1358	37,075±1,09	2,89	1119	37,83±1,44	3,82	1124
100,87	49,50±0,50	1,01	1924	51,42±2,00	3,90	2077	45,33±1,15	2,55	1614	46,58±2,53	5,43	1704
148,33	55,38±1,38	2,49	2409	58,00±2,54	4,37	2642	50,25±2,38	4,75	1983	52,42±3,05	5,83	2158
195,26	59,50±1,75	2,94	2781	62,58±3,08	4,93	3076	55,50±1,00	1,80	2419	56,67±3,00	5,30	2522
263,10	63,50±2,38	3,75	3293	67,16±2,40	3,58	3543	59,33±0,29	0,49	2765	60,92±2,92	4,79	2915
330,14	66,83±2,47	3,69	3508	70,67±2,08	2,94	3922	62,67±1,04	1,66	3085	63,25±2,78	4,40	3142
378,09	69,33±2,24	3,23	3775	73,00±1,73	2,37	4185	64,67±1,04	1,61	3285	65,33±2,40	3,68	3352
426,60	71,33±2,24	3,14	3996	75,00±1,00	1,33	4418	66,83±1,76	2,63	3508	66,33±1,84	2,78	3455
496,87	72,25±2,38	3,30	4100	76,33±0,57	0,76	4576	68,42±1,77	2,59	3677	67,92±1,46	2,16	3623
566,64	73,92±2,13	2,88	4292	77,50±0,50	0,65	4717	70,08±2,00	2,86	3857	69,00±1,50	2,17	3739
637,64	75,33±2,24	2,97	4457	78,58±0,52	0,66	4850	71,75±2,25	3,14	4043	69,97±1,60	2,31	3812
710,00	76,75±2,61	3,40	4626	79,75±0,66	0,83	4995	73,00±1,75	2,40	4185	70,50±2,16	3,07	3904
759,19	77,58±2,70	3,48	4727	80,75±0,25	0,31	5121	74,08±2,02	2,73	4310	71,00±2,61	3,68	3959
828,93	78,42±2,60	3,32	4830	81,58±0,29	0,35	5227	74,67±2,25	3,02	4379	71,50±3,27	4,57	4015
878,33	79,17±2,43	3,07	4923	82,25±0,50	0,61	5313	75,25±2,38	3,17	4447	72,17±3,54	4,90	4091
930,22	79,83±2,25	2,82	5005	82,75±0,50	0,60	5378	75,67±2,38	3,14	4497	73,33±3,69	5,03	4223
999,58	80,50±2,14	2,65	5090	83,33±0,29	0,35	5454	76,00±2,50	3,29	4536	74,33±3,26	4,39	4339

(n=3)



Tabela 45 Espalhabilidade de géis de carbômero armazenadas durante 12 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
46,78	36,58±1,46	4,00	1051	40,00±1,50	3,75	1257	36,75±1,75	4,76	1061	35,00±1,00	2,86	962
100,87	45,08±1,12	2,50	1596	48,67±2,27	4,66	1860	44,67±1,53	3,42	1567	43,16±0,80	1,86	1463
148,33	50,42±1,01	2,00	1997	54,58±2,75	5,04	2340	49,08±2,56	5,23	1892	47,75±0,43	0,91	1791
195,26	54,42±1,01	1,86	8326	58,42±2,90	4,96	2680	53,33±2,56	4,99	2234	51,33±0,58	1,12	2069
263,10	58,62±1,23	2,11	2699	62,17±3,25	5,23	3036	57,58±2,50	4,35	2604	54,83±1,13	2,05	2361
330,14	61,75±0,66	1,07	2995	65,42±2,90	4,43	3361	60,42±2,25	3,73	2867	57,33±1,53	2,66	2581
378,09	64,50±0,66	1,03	3267	67,58±2,50	3,70	3587	62,75±2,70	4,31	3092	59,67±1,76	2,94	2796
426,60	66,39±0,76	1,15	3455	69,25±2,00	2,89	3766	64,58±2,60	4,03	3276	61,75±1,89	3,06	2995
496,87	68,08±1,01	1,48	3640	70,67±1,88	2,66	3922	66,58±2,10	3,15	3482	63,42±2,00	3,16	3159
566,64	69,75±1,14	1,64	3821	72,25±1,64	2,27	4100	68,00±2,18	3,20	3632	65,17±1,76	2,69	3336
637,64	70,67±1,26	1,78	3924	73,42±1,70	2,32	4234	69,17±2,32	3,36	3758	97,08±1,77	2,64	3534
710,00	71,83±1,44	2,01	4052	74,33±2,00	2,70	4339	71,75±3,54	4,94	4043	68,75±1,09	1,58	3712
759,19	72,67±1,18	1,63	4148	74,96±1,66	2,22	4408	71,00±2,75	3,87	3959	70,17±1,15	1,64	3867
828,93	73,17±1,59	2,17	4205	75,67±1,84	2,44	4497	71,58±3,13	4,37	4024	70,92±1,18	1,66	3950
878,33	73,91±1,38	1,86	4290	76,08±2,13	2,79	4546	72,58±2,92	4,02	4137	71,75±1,09	1,52	4043
930,22	74,58±1,23	1,65	4368	76,33±1,88	2,46	4576	73,08±3,08	4,22	4195	72,42±1,18	1,63	4119
999,58	75,00±1,29	1,73	4418	77,08±2,10	2,72	4666	73,42±3,22	4,39	4234	72,92±1,38	1,89	4176

(n=3)

Tabela 46 Espalhabilidade de géis de carbômero armazenados durante 16 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
54,09	44,25±1,50	3,39	1538	35,83±2,32	6,48	1008	38,17±0,58	1,51	1144	37,83±1,46	3,87	1124
101,55	50,58±0,80	1,59	2009	42,67±2,27	5,32	1430	44,00±0,90	2,05	1520	44,17±1,81	4,09	1532
148,48	55,67±0,14	0,26	2434	47,58±2,40	5,05	1778	48,58±1,42	2,93	1854	49,25±2,46	5,00	1905
216,32	59,83±0,63	1,05	2811	52,33±2,13	4,06	2151	52,08±2,00	3,85	2130	52,42±2,08	3,97	2158
283,36	62,50±1,26	2,50	3068	56,33±2,18	3,87	2492	55,92±2,38	4,25	2456	55,33±3,01	5,45	2404
331,31	65,33±2,02	3,09	3352	58,67±1,63	2,77	2703	58,50±2,00	3,42	2688	58,17±2,88	4,94	2658
379,82	67,58±2,18	3,23	3587	60,50±1,75	2,89	2875	60,67±2,25	3,72	2891	59,67±2,38	3,25	2796
450,09	69,42±2,08	3,00	3785	62,58±1,94	3,10	3076	62,58±2,25	3,60	3076	61,83±2,50	4,05	3002
519,86	72,08±2,40	3,33	4080	64,83±1,53	2,35	3301	64,33±2,50	3,89	3250	63,25±2,14	3,38	3142
590,86	73,92±1,77	2,40	4292	66,08±1,52	2,52	3429	66,00±2,05	3,10	3421	64,25±1,73	2,70	3242
663,22	75,42±1,77	2,35	4467	67,75±1,52	2,24	3605	67,67±2,08	3,08	3596	65,17±1,15	1,77	3336
712,41	76,42±2,00	2,62	4587	69,00±1,75	2,54	3739	69,75±1,64	2,35	3821	66,42±1,26	1,89	3465
781,51	77,50±2,00	2,58	4717	70,08±1,46	2,09	3857	70,50±2,00	2,84	4128	67,58±0,72	4,51	3587
831,55	78,58±2,00	2,55	4850	70,75±1,30	1,84	3931	71,83±2,40	3,34	4052	68,50±0,50	0,73	3687
883,44	79,17±2,02	2,55	4923	71,58±1,23	1,72	4024	72,67±2,75	3,79	4148	69,67±0,80	1,15	3812
952,80	79,92±2,13	2,66	5016	72,58±0,80	1,11	4137	73,42±2,81	3,83	4234	71,42±1,28	1,80	4006

(n=3)

Tabela 47 Espalhabilidade de géis de carbômero armazenados durante 20 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
54,09	40,25±0,90	2,24	1272	40,42±1,46	3,62	1283	40,17±1,66	4,14	1267	27,92±0,29	1,03	612
101,55	45,42±2,63	5,78	1620	49,75±0,25	0,50	1944	47,17±1,53	3,24	1747	34,25±1,64	4,79	921
148,48	50,83±1,89	3,72	2029	55,17±0,80	1,46	2390	52,75±1,09	2,07	2185	38,00±1,50	3,95	1134
216,32	54,83±3,25	5,93	2361	59,83±0,76	1,28	2811	57,17±1,23	2,16	2567	42,00±1,32	3,15	1385
283,36	59,58±1,77	2,98	2788	63,83±0,52	0,82	3200	59,92±1,46	2,44	2820	45,67±1,18	2,59	1638
331,31	63,08±1,63	2,58	3125	66,83±0,14	0,22	3508	63,02±2,05	3,25	3117	48,42±0,38	0,79	1841
379,82	64,92±1,81	2,79	3310	69,75±0,66	0,95	3821	65,17±1,89	2,90	3336	50,08±0,14	0,29	1970
450,09	66,33±1,53	2,30	3455	71,83±0,58	0,80	4052	67,08±1,84	2,75	3534	52,58±0,29	0,55	2171
519,86	68,00±1,09	1,60	3632	73,67±1,01	1,37	4263	68,42±1,88	2,74	3677	55,00±0,00	0,00	2376
590,86	70,50±0,50	0,71	3904	75,00±1,50	2,00	4418	69,50±1,52	2,19	3794	57,33±0,14	0,25	2581
663,22	72,67±0,14	0,20	4148	76,50±1,39	1,82	4596	70,75±1,64	2,32	3931	59,00±0,50	0,85	2734
712,41	73,83±1,04	1,41	4281	77,33±1,53	1,98	4697	72,25±1,15	1,59	4100	60,33±0,29	0,48	2859
781,51	75,33±1,04	1,38	4457	78,08±1,66	2,13	4788	73,33±0,72	0,98	4223	61,75±0,25	0,40	2995
831,55	76,58±1,38	1,80	4606	78,83±1,89	2,40	4881	74,33±0,14	0,19	4339	63,00±0,00	0,00	3117
883,44	78,00±1,32	1,70	4778	79,17±2,02	2,55	4923	75,00±0,50	0,67	4418	64,33±0,38	0,59	3250
952,80	79,08±1,59	2,01	4912	79,83±1,89	2,37	5005	75,67±0,63	0,83	4497	64,92±0,14	0,22	3310

(n=3)

Tabela 48 Espalhabilidade de géis de carbômero armazenados durante 24 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
54,09	41,67±1,18	2,84	1364	37,07±1,98	5,26	1119	40,92±1,01	2,47	1315	40,08±0,52	1,30	1262
101,55	49,67±1,61	3,24	1938	44,75±1,75	3,91	1573	48,67±1,61	3,30	1960	47,42±0,38	0,80	1766
148,48	55,92±1,53	2,73	2460	49,58±1,84	3,72	1931	53,67±0,72	1,34	2262	52,25±1,39	2,66	2144
216,32	60,33±2,09	3,48	2859	54,00±2,16	4,01	2290	58,25±0,25	0,43	2665	56,17±2,25	4,01	2478
283,36	64,58±2,98	4,62	3276	57,83±2,45	4,24	2627	61,58±0,14	0,23	2987	58,17±3,08	5,30	2658
331,31	67,33±2,75	4,09	3560	60,58±2,24	3,70	2882	64,58±0,29	0,45	3276	60,75±2,75	4,53	2899
379,82	69,92±3,12	4,47	3840	62,83±2,90	4,61	3100	66,83±0,38	0,57	3508	62,92±1,84	2,93	3109
450,09	71,92±2,74	3,81	4062	64,75±3,25	5,02	3293	68,67±0,28	0,42	3704	64,28±1,70	2,63	3276
519,86	74,25±2,88	3,88	4330	66,42±3,39	5,11	3465	70,58±0,28	0,82	3912	66,42±1,87	2,82	3465
590,86	76,17±2,50	3,29	4557	68,17±3,17	4,66	3650	72,17±1,01	1,40	4091	68,50±1,80	2,63	3685
663,22	77,25±2,41	3,12	4687	69,83±2,90	4,15	3830	73,25±1,09	1,49	4214	70,50±0,90	1,28	3904
712,41	78,50±2,41	3,07	4840	71,08±2,90	1,08	3968	74,08±1,38	1,86	4310	72,33±0,76	1,06	4109
781,51	79,50±2,64	3,33	4964	72,50±2,18	3,01	4128	75,50±1,80	2,39	4477	76,83±0,63	0,85	4281
831,55	80,42±2,56	3,19	5079	73,75±1,52	2,06	4272	76,42±1,710	2,23	4587	75,33±0,52	0,69	4457
883,44	80,83±2,52	3,11	5131	74,58±0,95	1,27	4368	77,5±01,32	1,71	4717	76,33±0,88	1,15	4576
952,80	81,50±2,38	2,93	5217	75,00±1,09	1,45	4418	78,0±81,42	1,82	4788	77,17±1,01	1,31	4677

(n=3)

Tabela 49 Espalhabilidade de géis de carbômero armazenadas durante 28 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
54,09	40,25±0,90	2,24	11272	38,67±1,44	3,73	1174	43,17±0,62	1,44	1464	39,83±0,29	0,72	1246
101,55	48,08±1,76	3,65	1816	45,58±2,04	4,47	1632	52,00±1,02	1,96	2124	43,50±0,00	0,00	1486
148,48	54,33±2,25	4,15	2318	50,58±2,27	4,48	2009	56,50±1,06	1,88	2507	52,67±0,38	0,73	2179
216,32	57,00±1,32	2,32	2552	55,00±1,39	2,53	2376	60,42±1,24	1,86	2967	57,50±0,50	0,87	2597
283,36	60,75±0,90	1,48	2899	58,42±1,01	1,73	2680	63,75±1,02	0,60	3192	61,25±0,75	1,22	2946
331,31	64,08±0,63	0,98	3225	60,92±0,80	1,32	2915	66,17±0,62	0,94	3439	64,17±1,23	1,92	3234
379,82	66,58±0,76	1,15	3482	63,75±1,09	1,71	3192	67,67±0,82	1,22	3597	66,25±1,32	2,00	3447
450,09	68,67±0,76	1,11	3704	65,92±1,51	2,29	3413	69,17±0,82	1,23	3758	68,25±1,95	2,86	3658
519,86	70,58±0,76	1,08	3912	67,92±1,18	1,74	3623	70,67±0,82	1,17	3922	70,17±2,32	3,31	3867
590,86	72,58±0,38	0,53	4137	69,92±1,81	2,59	3840	71,50±0,74	1,03	4015	72,33±3,10	4,29	4109
663,22	74,92±0,52	0,69	4408	71,67±2,04	2,84	4034	73,17±0,66	0,90	4205	74,00±2,81	3,81	4301
712,41	76,08±0,38	0,50	4546	73,08±1,70	2,33	4195	75,42±0,85	1,13	4467	75,33±3,11	4,12	4457
781,51	77,58±0,29	0,37	4727	74,42±2,27	3,05	4350	76,58±0,92	1,20	4606	76,75±3,26	4,26	4626
831,55	79,00±1,09	1,38	4902	75,33±2,13	2,82	4457	77,83±1,25	1,60	4758	77,75±3,36	4,33	4746
883,44	79,83±1,01	1,26	5505	76,58±2,13	2,78	4606	78,83±0,92	1,17	4881	78,92±3,50	4,44	4892
952,80	80,17±1,13	1,41	5048	77,42±1,84	2,38	4708	79,42±0,82	1,04	4954	79,83±3,40	4,26	5005

(n=3)

Tabela 50 Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 4 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
46,78	27,25±0,43	1,59	583	29,55±1,556	2,25	681	27,33±6,63	2,30	587	29,00±0,50	1,72	701
100,87	31,33±0,80	2,56	771	32,50±0,66	2,04	830	31,83±0,76	2,40	796	32,5±0,50	1,54	908
148,33	33,00±0,00	0,00	855	35,33±0,58	1,63	980	34,58±0,88	2,54	990	35,00±0,50	1,43	1061
195,26	35,50±0,43	1,22	990	37,17±0,76	2,05	1085	38,58±0,72	1,97	1051	37,42±0,38	1,02	1199
263,10	37,67±0,58	1,53	1114	39,00±1,00	2,56	1195	39,00±0,87	2,22	1195	38,58±0,14	0,37	1262
330,14	39,25±0,66	1,69	1210	41,17±1,04	2,53	1331	40,75±0,90	2,21	1304	40,08±0,38	0,95	1452
378,09	40,42±1,01	2,50	1283	43,00±0,87	2,01	1452	42,33±0,95	2,24	1407	41,83±0,29	0,69	1567
426,60	42,33±0,52	1,23	1407	44,33±0,58	1,30	1543	43,83±0,76	1,74	1509	43,00±0,50	1,16	1662
496,87	43,50±1,00	2,30	1486	45,83±0,88	1,92	1650	45,08±0,72	1,60	1596	44,33±0,29	0,65	1841
566,64	44,83±0,76	1,70	1578	47,00±0,90	1,92	1735	46,25±0,90	1,95	1680	45,58±0,14	0,32	1905
637,64	45,75±1,30	2,84	1644	48,83±1,52	3,13	1843	47,42±1,04	2,20	1766	46,92±0,14	0,31	1989
710,00	47,00±0,67	1,84	1735	49,17±1,52	3,11	1899	48,67±0,88	1,80	1860	48,25±0,25	0,52	2083
759,19	48,00±0,87	1,80	1809	50,33±1,18	2,35	1989	49,50±1,09	2,20	1942	49,50±0,25	0,51	2158
828,93	48,83±1,15	2,36	1973	51,17±1,53	2,99	2056	50,58±1,18	2,28	2009	50,21±0,86	1,71	2248
878,33	49,83±0,72	1,45	1950	51,92±1,77	3,42	2117	51,33±1,18	2,30	2069	51,67±0,29	0,56	2318
930,22	50,33±0,72	1,43	1989	52,83±1,76	3,32	2192	52,00±1,25	2,40	2124	52,50±0,25	0,48	2383
999,58	51,25±1,09	2,13	2063	53,75±1,50	2,79	2269	52,75±1,39	2,64	2185	53,75±0,25	0,46	2470

(n=3)

Tabela 51 Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 8 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
46,78	28,27±0,29	1,02	623	26,58±0,38	1,44	555	26,42±0,38	1,44	548	28,2±50,66	2,34	627
100,87	31,50±1,14	3,64	779	29,83±0,14	0,48	699	29,92±0,76	2,55	703	32,88±31,01	3,08	846
148,33	34,67±0,88	2,53	944	35,58±0,38	1,17	834	32,33±0,63	1,94	821	35,67±1,53	4,288	999
195,26	36,50±1,00	2,74	1046	34,42±0,14	0,42	930	34,42±0,63	1,83	930	38,00±1,56	4,10	1134
263,10	39,17±2,25	5,75	1205	36,75±0,25	0,68	1061	36,50±0,50	1,37	1046	40,33±1,59	3,94	1277
330,14	41,17±2,02	4,91	1331	38,33±0,52	1,36	1154	38,25±0,75	1,96	1149	42,17±1,89	4,49	1397
378,09	43,17±1,77	4,11	1464	39,92±0,29	0,72	1252	39,67±0,76	1,92	1236	43,75±2,41	5,51	1503
426,60	44,08±2,00	4,55	1526	40,29±0,52	1,27	1315	40,92±0,63	1,54	1315	45,25±1,98	4,38	1908
496,87	45,58±1,88	4,12	1632	42,08±0,63	1,50	1391	42,33±1,04	2,46	1047	47,00±2,05	4,35	1735
566,64	46,92±2,27	4,84	1729	43,42±0,88	2,02	1481	43,25±0,90	2,08	1469	48,67±1,38	2,83	1860
637,64	48,25±1,80	3,74	1828	44,50±1,00	2,25	1555	44,50±0,90	2,02	1555	50,08±1,13	2,25	1970
710,00	49,17±2,02	4,11	1899	45,67±0,88	1,92	1638	45,58±0,63	1,38	1632	51,58±1,04	2,02	2065
759,19	50,42±2,02	4,01	1997	46,42±1,13	2,43	1692	46,50±0,90	1,94	1698	52,42±1,51	2,87	2151
828,93	51,08±2,16	4,22	2049	47,33±1,13	2,38	1759	47,42±0,76	1,61	1766	53,25±1,89	3,54	2227
878,33	52,00±2,14	4,11	2174	48,25±1,25	2,59	1828	48,33±0±,88	1,82	1834	54,00±1,89	3,50	2290
930,22	52,83±2,16	4,08	2192	49,08±1,38	2,80	1892	49,00±0±,75	1,53	1886	54,50±1,89	3,46	2333
999,58	53,33±2,25	4,23	2235	49,75±1,39	2,80	1944	50,00±0±,90	1,80	1963	55,0±0±2,29	4,16	2376

(n=3)

Tabela 52 Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 12 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
46,78	27,67±0,29	1,04	601	27,83±0,29	1,04	608	27,58±0,52	1,89	597	26,83±0,58	2,15	565
100,87	31,50±0,50	1,59	779	32,33±0,29	0,88	821	30,67±1,04	3,29	788	30,42±0,76	2,51	727
148,33	34,42±0,38	1,11	930	35,50±0,50	1,41	990	34,42±0,88	2,55	930	33,25±0,66	1,99	868
195,26	36,92±0,80	2,18	1057	37,67±0,56	1,53	1114	36,58±1,38	3,76	1050	35,17±0,76	2,17	971
263,10	39,08±0,63	1,61	1195	40,08±0,88	2,19	1262	38,83±0,76	1,97	1184	37,17±0,72	1,94	1035
330,14	40,67±0,29	0,71	1299	42,08±0,88	2,09	1391	40,58±1,18	2,91	1293	39,00±0,87	2,22	1195
378,09	42,17±0,38	0,91	1397	43,83±1,13	2,57	1509	42,33±1,38	3,25	1407	40,33±0,80	1,99	1277
426,60	43,33±0,63	1,45	1475	45,25±1,25	1,00	1608	43,58±1,15	2,65	1492	41,58±0,80	1,93	1358
496,87	44,50±0,66	1,49	1555	46,75±1,39	1,00	1716	44,75±1,29	2,90	1573	42,92±0,76	1,78	1447
566,64	46,00±0,66	1,44	1662	48,00±1,56	3,25	1810	46,17±1,23	2,67	1674	44,17±0,95	2,14	1532
637,64	47,00±0,90	1,92	1735	49,33±1,46	2,97	1911	47,33±1,38	2,91	1759	45,17±0,95	2,10	1747
710,00	48,00±1,09	2,27	1910	50,50±1,52	3,01	2003	48,25±1,32	2,74	1828	46,25±0,90	1,95	1680
759,19	49,75±1,09	2,24	1867	51,42±1,55	2,25	2077	49,33±1,18	2,39	1911	47,58±0,63	1,32	1778
828,93	49,83±1,04	2,09	1950	52,33±1,01	1,93	2151	50,00±1,09	2,18	1963	48,33±1,23	2,55	1834
878,33	50,75±1,09	2,15	2022	53,42±0,95	1,77	2241	51,00±1,15	2,25	2043	49,00±1,32	2,70	1886
930,22	51,50±1,30	2,52	2083	53,75±0,66	1,23	2269	51,75±1,32	2,56	2103	50,42±0,76	1,51	1997
999,58	52,17±1,38	2,64	2138	54,67±0,95	1,73	2347	52,42±1,46	2,79	2158	50,58±1,04	2,06	2009

(n=3)



Tabela 53 Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 16 dias

	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
peso (g)	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
54,09	28,08±0,72	2,57	619	27,92±1,46	5,25	612	28,08±0,80	2,86	619	27,92±1,46	5,25	612
101,55	31,17±0,29	0,92	763	31,08±0,14	0,46	759	31,42±0,95	3,01	775	31,08±0,14	0,46	759
148,48	33,25±0,50	1,50	868	33,75±0,25	0,74	895	33,75±1,52	4,50	895	33,75±0,25	0,74	895
216,32	35,75±0,66	1,85	1004	36,00±0,86	2,40	1018	36,08±2,10	5,81	1022	36,00±0,86	2,40	1018
283,36	37,75±0,75	1,99	1119	38,08±0,58	1,52	1139	38,25±1,95	5,10	1149	38,08±0,58	1,52	1139
331,31	39,42±0,88	2,23	1220	39,33±0,14	0,37	1215	40,00±1,95	4,88	1257	39,33±0,14	0,37	1215
379,82	40,67±0,88	2,16	1299	40,83±0,14	0,35	1309	41,25±1,95	4,73	1336	40,83±0,14	0,35	1309
450,09	41,92±0,80	1,92	1380	42,16±0,14	0,34	1396	42,75±2,16	5,06	1435	42,16±0,14	0,34	1396
519,86	43,50±1,32	3,04	1486	43,50±0,00	0,00	1486	43,83±2,10	4,78	1509	43,50±0,00	0,00	1486
590,86	44,58±1,18	2,65	1561	44,58±0,38	0,86	1561	45,25±2,18	4,82	1608	44,58±0,38	0,86	1561
663,22	45,67±1,28	2,81	16388	45,50±0,43	0,95	1625	46,17±2,04	4,41	1674	45,50±0,43	0,95	1626
712,41	46,58±1,42	3,05	1704	46,50±0,25	0,54	1698	47,17±2,24	4,75	1747	46,50±0,25	0,54	1698
781,51	47,75±1,32	2,77	1791	47,58±0,52	1,09	1778	48,08±2,31	4,80	1816	47,58±0,52	1,09	1778
831,55	48,50±1,52	3,13	1847	48,75±0,87	1,78	1866	49,17±2,32	4,72	1899	48,75±0,87	1,78	1866
883,44	49,33±1,61	3,26	1911	49,17±0,38	0,78	1899	49,92±2,08	4,17	1957	49,17±0,38	0,78	1899
952,80	50,25±1,56	3,11	1983	49,92±0,63	1,26	1957	50,92±2,40	4,72	2036	49,92±0,63	1,26	1957

(n=3)

Tabela 54 Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 20 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
54,09	29,33±0,76	2,60	676	27,67±0,58	2,09	601	28,33±0,52	1,84	630	29,92±1,01	3,38	703
101,55	33,67±1,13	3,35	890	30,38±0,95	3,07	746	32,33±0,52	1,61	821	35,50±0,50	1,41	990
148,48	36,67±1,28	3,50	1056	33,92±1,13	3,32	904	35,08±0,95	2,70	966	39,08±1,01	2,59	1199
216,32	39,42±1,63	4,13	1220	36,25±1,64	4,52	1032	37,83±1,26	3,33	1123	41,75±1,00	2,40	1369
283,36	42,25±1,75	4,14	1402	38,50±1,75	4,55	1164	39,67±1,04	2,62	1236	43,67±0,63	1,44	1498
331,31	44,08±2,00	4,55	1526	40,17±1,76	4,37	1267	41,42±1,26	3,04	1347	46,00±1,00	2,17	1662
379,82	45,50±1,80	3,96	1626	41,58±1,88	4,51	1358	42,75±1,39	3,26	1435	47,75±1,25	2,62	1791
450,09	46,92±1,94	4,14	1729	43,00±2,29	5,33	1452	44,25±1,00	2,26	1538	49,75±1,25	2,51	1944
519,86	48,50±1,95	4,02	1847	44,50±2,29	5,15	1555	45,67±1,01	2,21	1638	51,42±0,87	1,71	2077
590,86	50,00±2,16	4,33	1963	45,92±2,25	4,91	1656	46,83±1,01	2,16	1722	52,03±1,01	1,91	2126
663,22	51,17±2,10	4,10	2056	47,00±2,54	5,40	1734	49,08±0,88	1,83	1816	54,08±1,28	2,37	2297
712,41	52,00±2,41	4,64	2124	48,08±2,63	5,46	1816	49,08±0,76	1,56	1892	55,42±0,76	1,38	2412
781,51	52,83±2,02	3,82	2192	49,00±2,88	5,88	1886	50,33±1,15	2,29	1989	56,58±0,80	1,42	2514
831,55	53,67±1,89	3,53	2262	50,17±2,75	5,49	1977	51,42±1,28	2,50	2077	57,68±0,76	1,32	2613
883,44	54,33±1,61	2,96	2318	50,92±3,00	5,90	2036	52,08±1,18	2,27	2130	58,58±0,80	1,37	2695
952,80	54,83±1,61	2,93	2361	51,58±2,88	5,58	2089	52,83±1,18	2,24	2192	58,58±0,58	0,97	2788

(n=3)

Tabela 55 Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 24 dias

peso (g)	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
54,09	29,92±0,14	0,54	703	27,33±0,14	0,53	587	28,67±0,29	1,01	646	28,50±0,00	0,00	638
101,55	30,83±1,66	5,39	746	30,25±0,90	2,98	719	32,58±0,52	1,60	834	31,83±0,58	1,81	796
148,48	33,33±1,28	3,84	872	32,50±0,66	2,04	830	35,75±0,66	1,85	1004	34,42±0,58	1,68	930
216,32	35,83±1,70	4,74	1008	34,58±0,63	1,82	939	38,33±0,76	1,99	1154	36,33±1,38	3,79	1037
283,36	37,83±1,53	4,04	1124	36,75±0,66	1,80	1061	40,75±1,25	3,07	1304	38,92±1,01	2,59	1190
331,31	39,25±1,56	3,98	1210	38,25±0,43	1,13	1149	42,92±1,13	2,63	1447	40,75±1,14	2,81	1304
379,82	40,83±1,77	4,34	1309	39,67±0,63	1,59	1236	44,42±1,28	2,89	1550	42,33±1,13	2,66	1407
450,09	40,00±1,80	4,29	1385	40,92±0,76	1,87	1315	45,67±1,53	3,34	1638	43,50±1,14	2,63	1486
519,86	43,50±1,80	4,14	1486	42,25±0,66	1,56	1402	47,08±1,18	2,51	1741	45,00±1,14	2,54	1590
590,86	44,75±1,98	4,43	1573	43,42±0,76	1,76	1481	48,25±1,09	2,26	1828	46,42±0,88	1,89	1692
663,22	45,83±2,12	4,64	1650	44,50±0,75	1,68	1555	49,75±1,32	2,66	1944	47,42±1,13	2,38	1766
712,41	46,67±2,27	4,86	1711	45,50±0,90	1,98	1626	50,83±1,18	2,32	2029	48,33±1,26	2,60	1834
781,51	47,50±2,22	4,68	1772	46,50±1,09	2,34	1998	51,92±1,28	2,47	2117	49,33±1,26	2,55	1911
831,55	48,58±2,32	4,78	1854	47,00±4,09	2,32	1735	52,92±1,04	1,97	2199	50,25±1,25	2,49	1983
883,44	49,17±2,47	5,02	1890	47,92±1,18	2,46	1803	53,58±0,95	1,77	2255	50,92±1,38	2,70	2036
952,80	50,08±2,32	4,64	1970	48,58±1,28	2,64	1854	54,50±0,87	1,59	2333	51,75±1,14	2,21	2103

(n=3)

Tabela 56 Espalhabilidade de géis de hidroxietilcelulose armazenados durante 28 dias

	10 ± 1 °C			25 ± 2 °C			35 ± 2 °C			45 ± 2 °C		
peso (g)	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )	diâmetro ± s (mm)	CV (%)	Ei (mm <sup>2</sup> )
54,09	28,17±0,95	3,36	623	28,08±0,63	2,24	619	28,67±0,95	3,30	646	28,67±1,44	5,03	646
101,55	32,17±1,18	3,67	813	31,17±0,95	3,04	763	31,42±0,52	1,66	775	34,08±1,76	5,15	912
148,48	35,08±1,66	4,74	966	33,58±0,80	2,39	886	34,08±0,63	1,84	912	34,75±0,87	2,49	948
216,32	37,67±1,61	4,27	1114	35,67±0,95	2,65	999	36,75±0,25	0,68	1064	37,42±0,95	2,53	1100
283,36	40,25±1,80	4,48	1272	37,75±0,66	1,75	1119	39,00±0,66	1,69	1195	39,83±0,80	2,02	1246
331,31	42,08±2,27	5,39	1391	39,25±1,09	2,78	1210	40,50±0,66	1,63	1288	41,75±1,00	2,40	1369
379,82	43,50±2,00	4,60	1486	40,83±0,80	1,97	1309	42,00±0,90	2,15	1385	43,42±0,88	2,02	1481
450,09	44,75±1,64	3,66	1573	41,92±1,42	3,39	1380	43,25±0,75	1,73	1469	45,33±1,42	3,14	1614
519,86	45,92±1,23	2,68	1656	43,17±1,18	2,74	1464	44,58±0,76	1,71	1561	46,25±1,32	2,86	1680
590,86	47,33±1,01	2,13	1759	44,50±1,39	3,13	1555	45,92±0,88	1,91	1656	47,58±1,38	2,89	1778
663,22	48,33±1,01	2,09	1834	45,58±1,53	3,35	1632	46,92±0,88	1,87	1729	48,92±1,44	2,95	1880
712,41	49,17±0,63	1,28	1899	46,58±1,53	3,28	1704	47,75±0,75	1,57	1791	50,08±1,84	3,68	1970
781,51	49,83±0,58	1,16	1950	47,67±1,42	2,98	1785	48,75±0,90	1,85	1867	51,17±1,89	3,70	2056
831,55	50,83±0,58	1,14	2029	48,50±1,39	2,87	1847	49,75±0,87	1,74	1944	52,17±2,13	4,08	2138
883,44	51,92±0,52	1,00	2117	49,17±1,51	3,06	1899	50,42±0,80	1,59	1997	53,25±1,98	3,73	2227
952,80	53,08±0,63	1,18	2213	50,25±1,75	3,48	1983	51,33±0,76	1,49	2069	54,08±2,04	3,76	2297

(n=3)

## **4. DISCUSSÃO**

Uma das características essenciais dos medicamentos é a sua qualidade, que pode ser definida como condição de uniformidade e concordância a especificações determinadas, apropriadas ao uso pretendido (OMS, 1992).

No setor produtivo, por sua vez, a qualidade total deve ser vista como o somatório das qualidades dos insumos, do ciclo de processamento e do produto acabado. Desta forma o atendimento aos requisitos de qualidade dos insumos e, entre estes, das matérias-primas é essencial para a qualidade do produto.

A qualidade das matérias-primas farmacêuticas exige sua adequação às características ligadas ao seu íntimo contato com um organismo vivo, vistas aqui como eficácia e segurança terapêuticas, e ao ciclo de transformação ao qual serão submetidos.

Como ponto de referência para a qualidade das matérias-primas empregaram-se preferencialmente as monografias de códigos oficiais. Estas, no entanto, não contemplam aspectos concernentes às necessidades do ciclo de processamento ou a quesitos biofarmacêuticos. Na inexistência de normas descritas em farmacopéias, foram empregadas as especificações arroladas na literatura científica ou fornecidas pelos próprios produtores. Outro critério empregado na opção entre as técnicas de avaliação foi o da disponibilidade de materiais e de equipamentos.

Assim, além da comprovação da identidade e da determinação da pureza das matérias-primas, sejam substância ativa ou adjuvantes, foram

analisados alguns parâmetros considerados relevantes para a definição da qualidade do produto

A identificação do estradiol e dos conservantes foi realizada por espectroscopia na região do ultravioleta e do infravermelho. Os espectros obtidos foram comparados com os descritos na literatura e comprovaram a identidade desta matéria-prima (DIBBERN, 1978), especialmente pela sobreposição das bandas em 1060, 1680, 1720 e 3200,  $\text{cm}^{-1}$ , característicos para esta substância (figura 8, p. 67) no IR.

Os testes de pureza demonstraram que a substância atende às especificações da monografia oficial.

Como característica adicional foi avaliada a distribuição granulométrica das duas amostras de fornecedores diferentes desta substância ativa.

A avaliação granulométrica do estradiol, tem particular importância no sentido de indicar o tamanho médio das partícula da substância em questão, já que esta característica está diretamente relacionada com os perfis de dissolução e de absorção nos tecidos. Ao diminuir o tamanho das partículas tem-se um aumento da superfície específica, em consequência aumentam também as forças superficiais de adesão e de coesão, que superam a força gravitacional, promovendo a formação de aglomerados, dificultando o fluxo e dissolução (HELMAN, 1982 V2).

Para o estradiol adquirido da firma Sigma a determinação da distribuição granulométrica foi realizada por microscopia ótica. Dos dados representados sob a forma gráfica da frequência em função da dimensão das partículas (figura 23) pode-se verificar que o tamanho médio das partículas fica em torno de 150  $\mu\text{m}$ , com um predomínio de partículas

menores do que 120  $\mu\text{m}$ , que pode ser visualizado através da inclinação da curva formada. Não foram encontradas partículas maiores do que 1900  $\mu\text{m}$ .

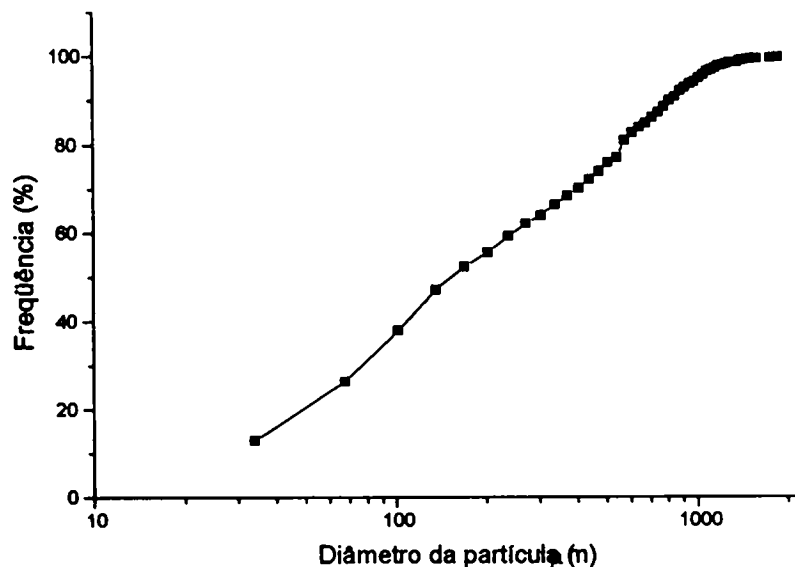


Figura 23 - Distribuição granulométrica do estradiol Sigma®.

A determinação granulométrica do estradiol micronizado informa que o tamanho médio das partículas fica em torno de 4,20  $\mu\text{m}$  apresentando uma área superficial de 2,38  $\text{m}^2 / \text{cm}^3$ . Não houve predominância de nenhuma das classes granulométricas o que pode ser descrito pela inclinação da reta da distribuição granulométrica.. Também não foram encontradas partículas com dimensão superior a 36  $\mu\text{m}$  (figura 24).



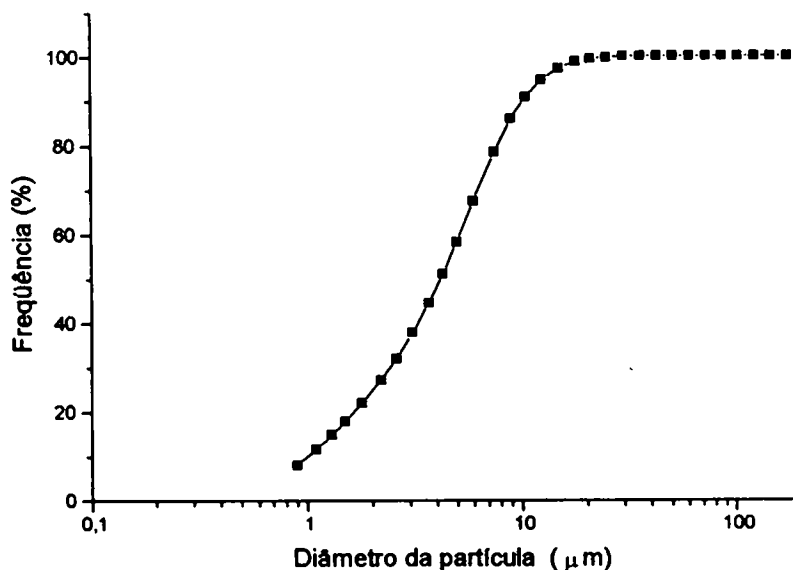


Figura 24 - Distribuição granulométrica do estradiol micronizado.

Na fase de escolha das condições de realização da análise granulométrica por difração de raios laser foi notada a influência do tempo de sonicação sobre a distribuição dos diâmetros das partículas, especialmente no que diz respeito a uma maior concentração de partículas de maior dimensão.

Os testes de identificação e de pureza das demais matérias-primas forneceram resultados positivos qualificando-as para as finalidades propostas.

Tendo em vista todas as características abordadas anteriormente quanto à adequação do uso da reposição estrogênica pela via percutânea e à existência de uma formulação no mercado farmacêutico europeu (Oestrogel®) partiu-se para o desenvolvimento de formulações de géis hidroalcoólicos contendo 0,060 % (m/v) de 17β-estradiol.

Nesta fase de pré-desenvolvimento foram testadas bases que apresentam universalidade de uso e disponíveis no laboratório. As bases inicialmente formulados foram de ácido poliacrílico, carboximetilcelulose, metilcelulose e hidroxietilcelulose. A formulação com carbômero descrita no formulário farmacêutico alemão (DAC)(BUNDESVEREINIGUNG, 1986a) é constituída de 0,5 % de carbomer, 1 % de solução de hidróxido de sódio a 5 %, 25 % de álcool isopropílico e 72,5 % de água. Nas tentativas preliminares de desenvolvimento promoveu-se a substituição do álcool isopropílico por etanol e a conseqüente incorporação de estradiol ao álcool. A primeiras tentativas de incorporação da substância ativa à formulação ofereceram produtos turvos, ao contrário do Oestrogel<sup>®</sup> que apresenta-se límpido. Esta turvação foi atribuída à precipitação do estradiol que tem conhecidos problemas de solubilidade em água (aproximadamente 0,44 mg/ml) (SALOLE, 1986). A introdução de um tensoativo foi a alternativa escolhida para contornar este problema. Entre os tensoativos utilizados optou-se por um não-iônico, como polissorbato 20, por não apresentar incompatibilidades com bases sensíveis a íons. Além da ação solubilizante desta substância, o polissorbato 20, como os outros tensoativos, através da diminuição da perda transepidermal de água, conduz ao aumento da hidratação do estrato córneo, promovendo, conseqüentemente, o aumento da absorção (ZATZ, 1991a; ASHTON, 1992; DURANDEAU e col., 1992; WILLIAMS, 1992).

Dentre os diferentes mecanismos de gelificação de resinas carboméricas, neutralização, adição de tensoativo, formação de pontes de hidrogênio, etc. (PRISTA, 1975; BFGOODRICH, 1987), optou-se pela neutralização com álcalis. O método de neutralização é dos mais difundidos pela facilidade de realização e baixo custo. Dentre as bases utilizadas para

promover a alcalinização e conseqüente gelificação optou-se pela solução de hidróxido de sódio a 5 %.

O tipo de resina polimérica (Carbopol 940®) e o neutralizante foram escolhidos em função da eficácia espessante de ambos e da faixa ótima de pH, bem como a aparência final límpida e brilhante buscada nas formulações.

Apesar das boas características de resistência à proliferação de microrganismos inerentes à formulação com resinas carboméricas e à presença de 25 % de etanol na formulação, optou-se pela adição da mistura de conservantes metilparabeno e propilparabeno, de uso consagrado devido às suas disponibilidades e à conhecida eficácia (HELMAN, 1982).

Sabe-se que a utilização de parabenos em formulações de uso tópico pode apresentar problemas de reações cutâneas (VOIGT, 1982) e que reações de complexação entre tensoativos e parabenos ocorrem, acarretando a diminuição da eficácia conservante. Em função destes dados foram avaliadas as concentrações dos conservantes nas formulações recém preparadas e após submetidas à condições drásticas de armazenamento. Os resultados obtidos através destes ensaios estão apresentados nas tabelas 32, 33, 35 e 36 (p. 100-102) e serão comentados posteriormente.

A escolha do etanol fundamenta-se ainda nas observações de KNUTSON e col. (1987) que observaram um maior coeficiente de permeabilidade de estradiol em soluções com 25 % de álcool. Concentrações acima de 50 % apresentaram efeitos inibidores da absorção dérmica.

A presença de etanol e polissorbato 20 nas formulações apresenta portanto, além do importante papel tecnológico, promovendo a solubilização de estradiol nos géis, substancial atuação na promoção da absorção do estradiol pela pele (IDSON, 1975).

Como alternativas para o uso de tensoativos foram testados ainda polietilenoglicol e éter nonilfenolpoligólico (Makon 10<sup>®</sup>), visando a possibilidade de substituição caso fosse constatada alguma incompatibilidade com conservantes ou material gelificante. Porém, estes tensoativos testados não se mostraram eficientes na solubilização do estradiol nas formulações.

As primeiras formulações foram desenvolvidas com estradiol adquirido da firma Sigma, que apresentava um tamanho de partícula da ordem de 120  $\mu$ m, conforme verificou-se na avaliação granulométrica. Posteriormente, esta substância foi substituída por produto micronizado fornecido pelo Prof. Dr. Hartmut Derendorf da Universidade da Flórida. Com esta substituição notaram-se alterações na solubilidade do estradiol no gel que até então vinha sendo formulado como no item (2.3.1.1 p. 38). A turvação observada após a troca da substância pode ser explicada pela diminuição do tamanho de partícula, com o conseqüente aumento de forças de adesão e de coesão, promovendo a formação de aglomerados e dificultando a dissolução do estradiol. Adicionou-se então polissorbato 20 resolvendo o problema de solubilidade.

Em contrapartida ao efeito negativo na solubilização do estradiol na formulação, a redução das partículas promove substanciais alterações no que diz respeito à absorção através dos tecidos, aumentando assim o desempenho biofarmacêutico do produto.

Os géis formulados com carboximetilcelulose sódica (CMC Na), formulados conforme PRISTA (1975) não se mostraram apropriados por apresentarem intensa turvação ou por problemas na consistência, isto é, com viscosidade muito elevada, e formação de grumos.

As formulações desenvolvidas com base de metilcelulose (MC) demonstraram comportamento semelhante às formulações com CMC Na,

inicialmente com problemas na solubilização do hormônio e posterior problemática na consistência do produto, onde obteve-se dispersões com viscosidade reduzida e com aspecto muito mais dúctil.

No desenvolvimento de formulações com base de hidroxietilcelulose (HEC), foram utilizados praticamente os mesmos adjuvantes que nos géis de base de carbômero. No primeiro momento tentou-se a formulação com uma composição de 3 % de HEC, obtendo-se um produto bastante consistente mas com problemas de dissolução de estradiol. Com o ajuste da quantidade do gelificante e a adição de polissorbato obteve-se uma formulação com aspecto semelhante a do produto elaborado com base de carbômero.

Através de uma análise preliminar das características organolépticas e de consistência das formulações, optou-se por dar prosseguimento ao trabalho com as formulações de base de carbômero apresentadas no item 2.3.1.7 (p. 41) e de HEC preparada como no item 2.3.4.4 (p. 45).

Com o intuito de verificar o potencial de utilização das formulações eleitas na fase de desenvolvimento, realizou-se um teste de caráter preliminar, que visava a observação dos efeitos da administração de estradiol nos níveis plasmáticos deste hormônio e no peso uterino de ratas castradas e submetidas a diferentes tratamentos. Inicialmente, estabeleceu-se a equivalência entre as doses de valerato de estradiol, administrado por via subcutânea, das formulações desenvolvidas e do similar comercializado na Europa. A aplicação dos géis sobre o dorso depilado das ratas numa área de cerca de 6 cm<sup>2</sup> e o isolamento de cada animal após a aplicação, visava contornar problemas de perda das amostras por contato com os outros animais, uniformização das aplicações, bem como a busca de um modelo o mais próximo possível da pele humana.

Apesar de conhecidas as diferenças dos modelos de absorção entre os homens e ratos (WESTER, 1992), optou-se por este modelo devido à disponibilidade dos animais e ao caráter preliminar que o teste apresenta. Neste momento do trabalho desejou-se caracterizar se os produtos desenvolvidos apresentariam características de penetração e se seria possível fazer uma distinção entre as formulações.

A utilização de um grupo tratado com valerato de estradiol pela via subcutânea dá a dimensão da reposição estrogênica livre da barreira epidérmica e o outro grupo tratado com Oestrogel<sup>®</sup>, fornece informações a respeito da penetração através da pele de uma forma farmacêutica estudada.

Os resultados obtidos em relação ao peso uterino e nível plasmático de estradiol podem ser visualizados nas figuras 25 e 26 e demonstram que os tratamentos com valerato de estradiol, gel de HEC, gel de carbômero e Oestrogel<sup>®</sup> não apresentaram diferenças significativas, porém todos diferem significativamente do grupo controle (ratas castradas livres de qualquer tratamento) quando analisados por ANOVA em nível de significância de 0,05 %, indicando que as formulações desenvolvidas são absorvidas em razões semelhantes ao produto comercializado na Europa e que a via percutânea apresenta equivalência com a via subcutânea, nas condições de realização deste teste.

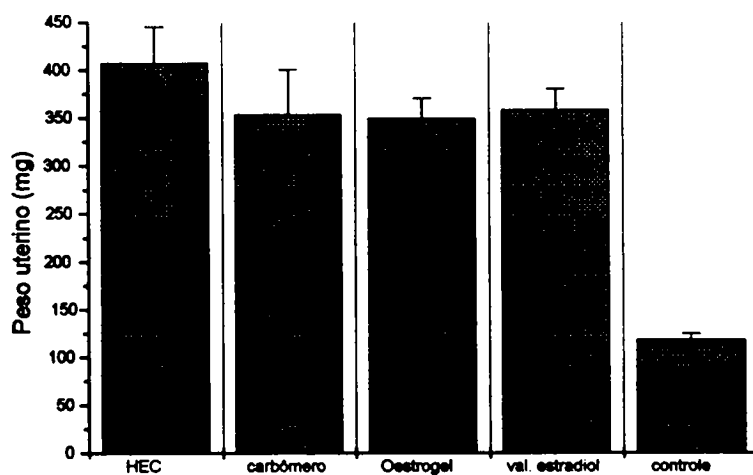


Figura 25 Peso uterino (mg) de ratas castradas submetidas a tratamentos com géis contendo estradiol de hidroxietilcelulose, carbômero e Oestrogel<sup>®</sup> com aplicação tópica, injeção subcutânea de valerato de estradiol e grupo controle.

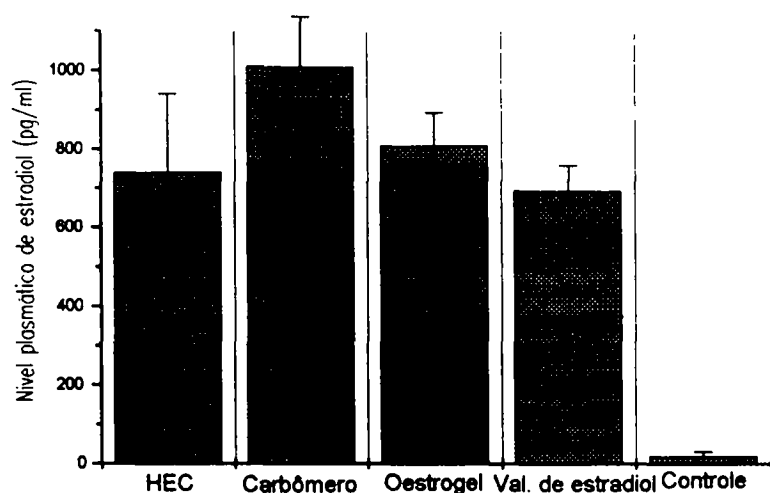


Figura 26 Níveis plasmáticos de estradiol (pg/ml) determinados por fluorimunoensaio em ratas castradas submetidas a tratamentos com géis contendo estradiol de hidroxietilcelulose, carbômero e Oestrogel® com aplicação tópica, injeção subcutânea de valerato de estradiol e grupo controle.

É importante salientar que deve-se realizar estudos em relação à farmacocinética e à biodisponibilidade das formulações desenvolvidas, utilizando-se modelos animais mais apropriados e com maior número de indivíduos em cada grupo.

O desenvolvimento de metodologia para determinações qualitativas e quantitativas de estradiol por CLAE, teve como ponto de partida o trabalho apresentado por LIU e col. (1991b) que alia simplicidade e disponibilidade de materiais e equipamentos. Os testes iniciais realizados com o objetivo de verificar a reprodutibilidade do sistema apresentaram o pico de estradiol com tempo de retenção de aproximadamente 7,6 min e



coeficiente de variação de 0,88 % entre as áreas de três injeções. O fator de simetria  $As_{10}$  de 1,02, indica uma boa interação entre a substância e o sistema, assim como sugere sua adequação para uma análise quantitativa. A eficiência do sistema, representado pelo valor do número de pratos teóricos (N), calculado para estas condições cromatográficas, foi de 2150, com altura equivalente de um prato teórico a aproximadamente 96, demonstrando ser apropriado para a determinação da substância neste sistema.

De posse de um sistema apropriado partiu-se para a verificação do limite de detecção, faixa ideal de trabalho e linearidade de detecção em função da concentração da amostra. As concentrações de 1 a 32  $\mu\text{g} / \text{ml}$  foram escolhidas em função das concentrações esperadas de estradiol no doseamento dos géis submetidos ao pré-teste de estabilidade, nos ensaios de biodisponibilidade e no pré-teste de penetração em membranas artificiais. As médias das áreas foram plotadas em gráfico contra as concentrações. Os pontos referentes a cada par ordenado foram utilizados para estabelecer o coeficiente de correlação linear, bem como a equação da reta gerada através de regressão linear.

Os resultados estão apresentados na figura 27 e indicam que o sistema apresenta uma correlação muito significativa ( $r=0,99946$ ), com linearidade dentro da faixa selecionada e com pequena variação entre as áreas numa mesma concentração.

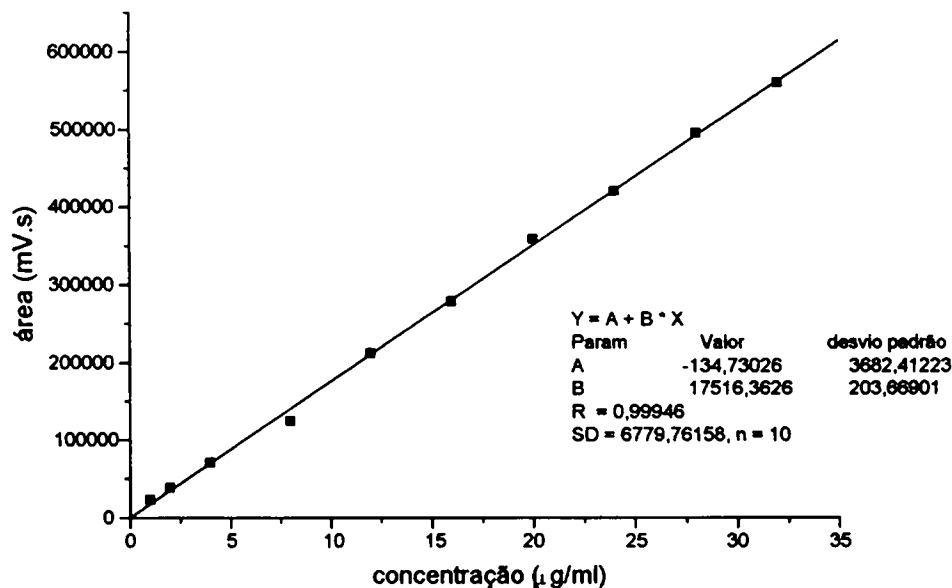


Figura 27 Curva padrão de estradiol obtida por CLAE

Os pontos de menor concentração (1, 2 e 4 µg / ml) apresentam maior variação nas áreas (figura 28), indicando que a sensibilidade nesta faixa de concentração está prejudicada. SCHLABACH e col. (1991) e BURKE e col. (1991) trabalharam no estabelecimento de condições para melhoria da detecção de peptídeos e estabeleceram que a diminuição no diâmetro interno da coluna e o aumento do fluxo da fase móvel podem promover a ampliação do sinal do detector. Talvez a alteração destes parâmetros possa levar a uma detecção mais pronunciada do estradiol nas concentrações mais reduzidas.

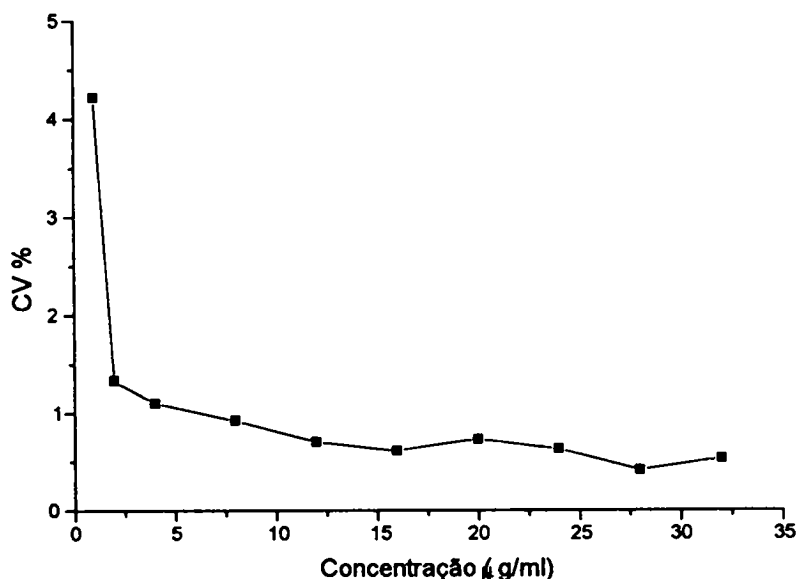


Figura 28 Coeficiente de variação das áreas dos picos de estradiol em função da concentração

A elevada dispersão dos valores das áreas dos picos de estradiol na menor concentração utilizada indica que a diferenciação deste com a concentração seguinte, de 2 µg/ml, não pode ser estatisticamente assegurada num  $\alpha \pm 0,05$ . Já uma diferença de concentração de 2 µg/ml pode ser estatisticamente reconhecida. De acordo com o coeficiente médio de variação percentual do método, nas condições aqui desenvolvidas, pode-se aceitar como diferença mínima significativa para três amostras o valor de 1,12% o que confere uma grande segurança na avaliação dos resultados

A necessidade de determinação quantitativa de estradiol na presença de adjuvantes, como conservantes e o próprio material gelificante, exigiu um tratamento prévio das amostras, fazendo-se no mínimo o isolamento ou eliminação da base polimérica dos demais constituintes das formulações. A presença de substâncias de tal natureza inviabilizaria a

preparação das amostras no que diz respeito à operação de filtração, fazendo com que fossem injetadas no sistema amostras altamente viscosas e de grande peso molecular, levando a possíveis problemas de entupimento do sistema.

LEROY e col. (1986) determinaram a estabilidade de benzoato de estradiol em pomadas através da utilização de técnica de CLAE, para tanto realizaram a extração de estradiol com uma mistura de diclorometano-etanol (20:80 v / v). Os procedimentos testados no sentido de preparação das amostras basearam-se em diluições simples dos géis em água e solventes orgânicos, ultrafiltração e precipitação seletiva. As tentativas de diluição simples utilizando água como solvente não se mostraram adequadas. As amostras preparadas com água continuaram com problemas de filtração, onde ocorria imediatamente a colmatação das membranas. Alguns solventes orgânicos conduziram à formação de grumos insolúveis, resultando na oclusão do estradiol e conservantes no interior do grumos acarretando na diminuição da eficiência de extração, verificada em ensaios preliminares realizados para estabelecer as condições de preparação das amostras.

Baseado na solubilidade do carbômero em solventes orgânicos, testou-se a precipitação do polímero em acetonitrila, clorofórmio, éter etílico e metanol. A diluição em acetonitrila apresentou a precipitação imediata do carbômero sob a forma de pequenos grumos que, ao se proceder com agitação mecânica e sonicação, produziram uma suspensão de partículas finamente divididas.

A eficiência de extração do estradiol e dos conservantes dos géis e base de carbômero, foi avaliada mediante o doseamento destas substâncias a partir dos géis preparados como descrito em 2.3.1.7 (p. 41) formulados, entretanto, em relação ponderal, eliminando assim a

necessidade de ajuste na tomada de amostra, feita por pesagem, devido às diferenças de densidade dos constituintes da formulação. Os géis assim preparados foram analisados quanto ao teor de estradiol, metilparabeno e propilparabeno. O processo de extração apresentou taxas de recuperação de entre 98,26 e 101,40 % para as três substâncias, com dispersão de valores entre 1,44 e 2,12 %, indicando a eficácia do método (tabelas 10 a 12, p. 80,81).

Os cromatogramas das substâncias isoladas e contidas no gel de carbômero podem ser visualizados na figura 29, onde se pode notar que a presença dos conservantes não interfere na detecção do pico do estradiol. A ausência de picos adicionais na amostra advinda do gel corrobora a eficácia do método de preparação da amostra empregado. Os fatores de resolução, e seletividade do sistema em relação aos três picos (tabela 57) demonstram claramente sua adequação para a avaliação quantitativa simultânea dos mesmos.

Tabela 57 Características entre os picos no sistema cromatográfico utilizado para a determinação quantitativa em géis de carbômero

Picos	Rs	$\alpha$
estradiol-propilparabeno	1,78	1,19
metilparabeno-metilparabeno	6,57	2,15

Os géis de hidroxietilcelulose foram submetidos a diferentes tratamentos visando a extração de estradiol e conservantes de maneira semelhante aos géis de carbômero, porém, as metodologias testadas não se mostraram apropriadas.

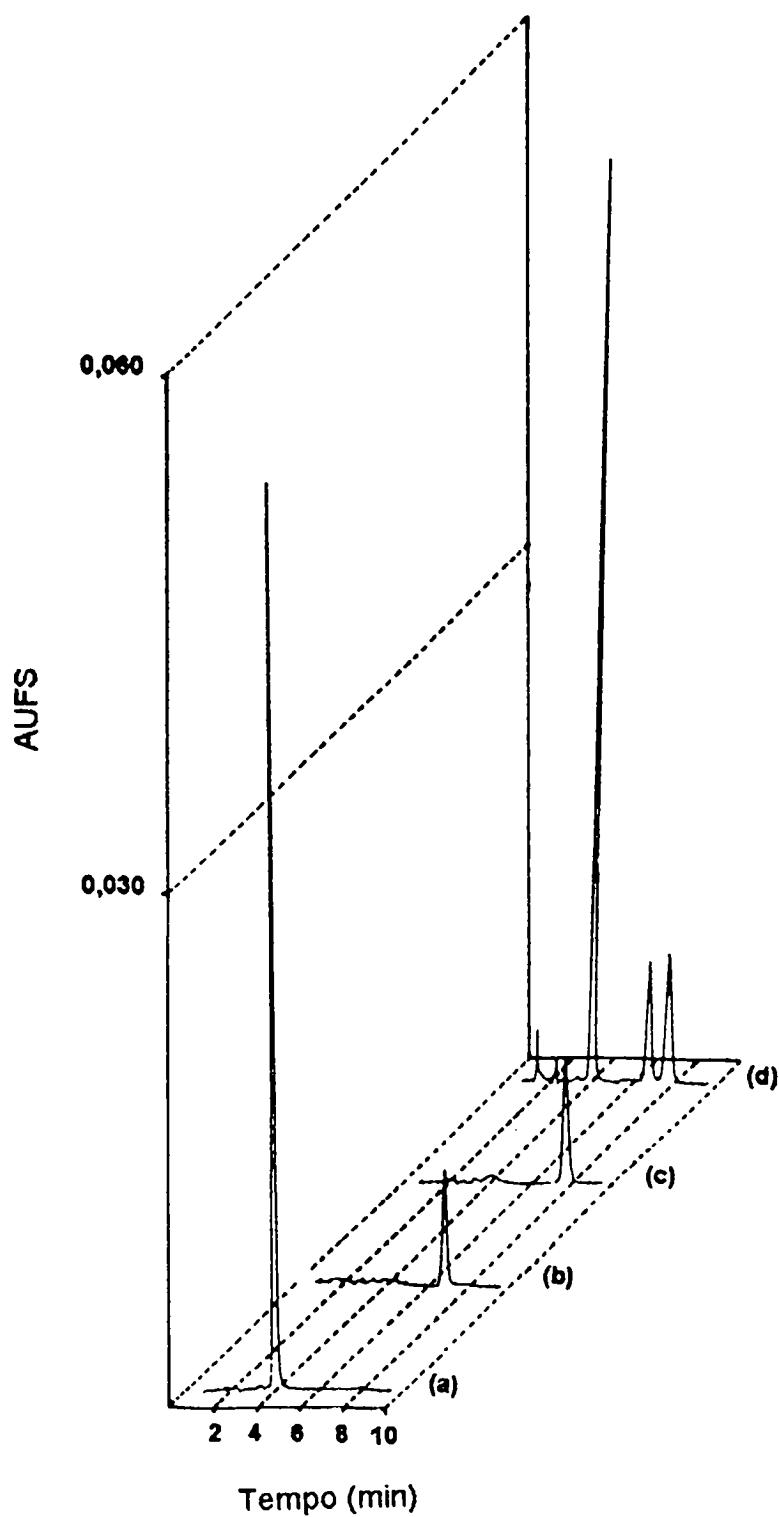


Figura 29 Cromatogramas de padrões de estradiol (c), metilparabeno (a), propilparabeno (b) e gel de carbômero (d) em acetonitrila

A adição de solventes orgânicos diretamente sobre amostras do gel provocava a precipitação da camada mais externa da amostra, ocorrendo a oclusão de praticamente todas as substâncias no interior dos grumos. Foram realizadas tentativas de ultrafiltração em unidades filtrantes constituídas de membranas de polissulfona com capacidade filtrante da ordem de 10.000 daltons (Ultrafree PF<sup>®</sup> Millipore) nas amostras diluídas em água e em misturas acetonitrila-água, porém, devido ao caráter descartável das membranas e ao alto custo das mesmas a utilização deste sistema foi inviabilizada apesar do método ter apresentado bons rendimentos de extração, conforme observado nos ensaios preliminares de desenvolvimento de metodologia para preparação das amostras de base de hidroxietilcelulose.

O sistema empregado para a eliminação de hidroxietilcelulose foi desenvolvido a partir de testes preliminares, onde observou-se que a adição de solventes orgânicos a acetonitrila promovia a precipitação do derivado celulósico somente na superfície de contato, provavelmente devido à alta consistência das amostras. Com base nesta observação procedeu-se com a dispersão das amostras em diferentes quantidades de água aquecida e posterior adição de acetonitrila, seguida de agitação mecânica, sonificação e posterior centrifugação, eliminando-se totalmente a hidroxietilcelulose das amostras.

Da mesma forma que os géis de carbômero, foram preparados géis de hidroxietilcelulose como em 2.3.4.4 ( p. 45) em relação ponderal. A taxa de recuperação obtida oscilou entre 98,40 e 99,25 para as três substâncias (tabelas 13, 14 e 15, p. 81, 82). No entanto, observou-se um aumento da dispersão dos dados, expresso pelos coeficientes de variação percentual dos resultados, alcançando um valor médio de 4,23 %. Este fato traduz a existência de fatores metodológicos.

Os cromatogramas das substâncias isoladas e contidas no gel de hidroxietilcelulose podem ser visualizados na figura 30, onde se pode notar que a presença dos conservantes não interfere na detecção do pico do estradiol. A ausência de picos adicionais na amostra advinda do gel confirma a eficácia do método de preparação da amostra empregado. Os fatores de resolução, e seletividade do sistema em relação aos três picos (tabela 58) demonstram claramente sua adequação para a avaliação quantitativa simultânea dos mesmos.

Tabela 58 - Características entre os picos no sistema cromatográfico utilizado para a determinação quantitativa em géis de carbômero

Picos	Rs	$\alpha$
estradiol-propilparabeno	2,25	1,00
metilparabeno-metilparabeno	25,61	2,67

Na avaliação microbiológica, os géis de carbômero e hidroxietilcelulose, apresentam resultados de acordo com as especificações farmacopeicas, que incluem as formulações tópicas como classe microbiológica II (FARMACOPÉIA, 1988)



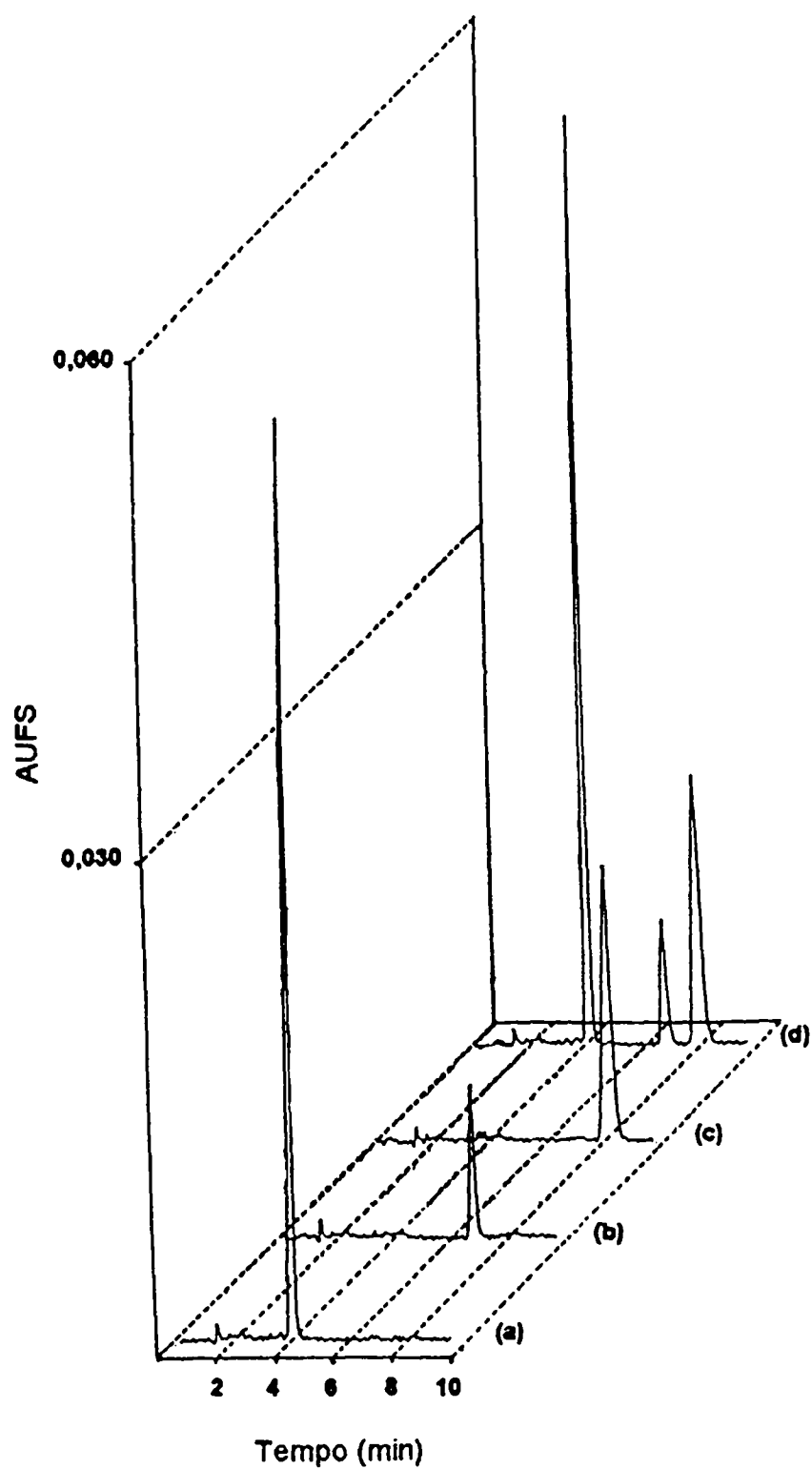


Figura 30 Cromatogramas de padrões de estradiol (c), metilparabeno (b), propilparabeno (a) e gel de hidroxietilcelulose (d) dissolvidos em acetonitrila / água (6:4)

A consistência de formas farmacêuticas semi-sólidas pode ser determinada por penetrômetro de cone, e apresenta dados a respeito da ductibilidade do produto. Os resultados das tabelas 16 e 17 (p. 83) não demonstraram diferenças significativas ( $\alpha = 0,05$ ) entre as bases utilizadas, e nem entre os géis contendo estradiol.

Como a consistência traduz os relacionamentos da estrutura tridimensional do gel entre si e com a estrutura fluída circundante, a inexistência de alterações deste valor entre as mesmas bases, antes e após a inclusão do estradiol, pode ser interpretada como não havendo interações sensíveis entre a substância ativa e os componentes do sistema disperso.

A espalhabilidade também constitui um importante parâmetro a ser avaliado, pois esta pode antecipar o comportamento do produto no momento da aplicação sobre a pele e até mesmo sobre a força necessária para promover o fluxo do material no momento do envase e está relacionada com o grau de mobilidade da fase líquida e com a maleabilidade da fase estruturadora tridimensional (VOIGT, 1982). As tabelas 18 a 21 (p. 84 a 87) representam os valores de espalhabilidade de bases e géis em relação ao peso adicionado. A figura 31 demonstra o comportamento de cada um dos géis com bases de carbômero e hidroxietilcelulose (HEC).

O gel de hidroxietilcelulose apresenta menor espalhabilidade do que o gel de carbômero, indicando maior resistência ao cisalhamento para este último sistema. A adição do estradiol, também neste ensaio, não causou alterações estatisticamente significativas, em ambas as bases estudadas, indicando a inexistência de interações físicas marcantes quando da obtenção dos produtos.

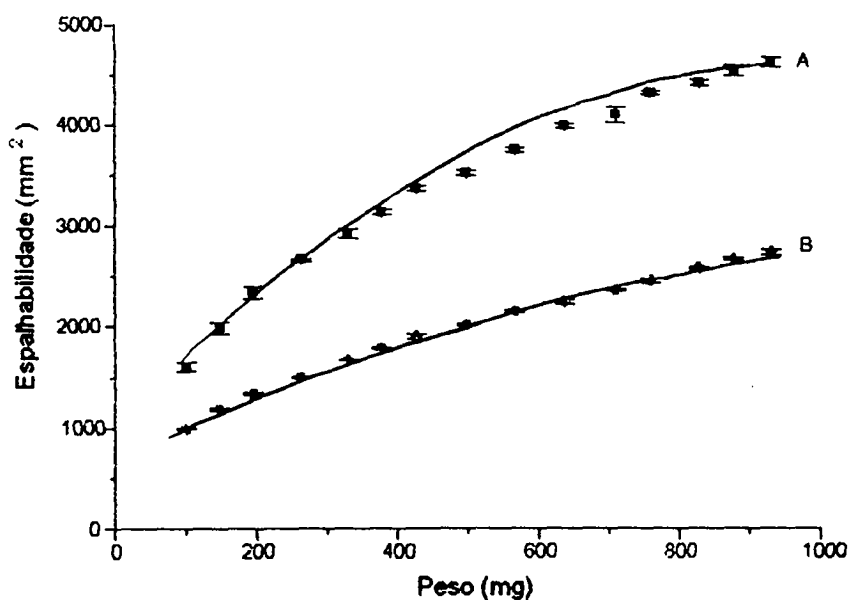


Figura 31 Espalhabilidade de géis de carbômero (A) e HEC (B) em função do peso adicionado

Com a intenção de estabelecer um índice ou índices que expressassem o perfil de espalhabilidade dos géis, foi realizada a regressão polinomial de segunda ordem para cada um dos perfis obtidos. As curvas geradas bem como as equações que regem estas curvas estão expressas na figura 31.

A regressão polinomial de segunda ordem foi escolhida em função de expressar de forma conveniente o perfil de espalhabilidade das amostras. Outros índices, como por exemplo a inclinação de retas tangenciando a curva, espalhabilidade final ou área sobre a curva, forneceriam dados incompletos a respeito do comportamento dos géis frente ao peso adicionado, podendo conduzir a conclusões equivocadas. As curvas e equações polinomiais foram obtidas através de programa de

computador "Origin for Windows" da Microsoft, e as análises de um ou mais índices permite avaliar a existência de diferenças estatísticas entre os comportamentos das amostras.

A comparação de um ou mais destes índices obtidos através da equação que rege a curva criada pela regressão polinomial de segunda ordem entre géis de bases diferentes através do teste t de Student, com um nível de significância de 0,05, indica não haver diferença significativa entre bases e géis de mesma natureza. A comparação entre os dados dos géis formulados com as bases de carbômero e hidroxietilcelulose apresentam uma diferença significativa confirmando observações anteriores.

Uma das mais importantes características físicas de formulações farmacêuticas semi-sólidas é a viscosidade e todos os parâmetros referentes ao comportamento reológico. Embora que, por questões operacionais não tenha sido possível a realização da mesma, a junção dos ensaios de consistência e espalhabilidade permitiu inferir observações sobre o comportamento reológico geral das amostras aqui estudadas. Todavia, deve-se, em momento oportuno, avaliar mais especificamente estas características, contribuindo nas fases de controle de qualidade e verificação da estabilidade das formulações.

A determinação da biodisponibilidade de formulações farmacêuticas é um parâmetro de extrema importância no desenvolvimento das mesmas, fornecendo subsídios para a determinação da qualidade dos produtos. As formas farmacêuticas semi-sólidas, ao contrário das outras formulações clássicas, não apresentam métodos de liberação *in vitro* preconizados nos códigos oficiais. KNORST (1991) salienta que apesar de intensas pesquisas realizadas neste sentido, os requisitos para a padronização, reprodutibilidade, validação e reconhecimento internacional não foram totalmente preenchidos.

O desenvolvimento de uma nova célula de cedência, dotada de câmara aceptora dupla (figura 6, p. 56) representa uma modificação dos modelos propostos por BARRY e col. (1977), ORBE e col. (1988), KNORST (1991) e MACEDO e col. (1993). Com a presença de duas interfaces entre o compartimento doador e os compartimentos aceptores procurou-se obter maior superfície de permeação e equalização da pressão hidrodinâmica em ambas as faces da câmara doadora. Os ensaios realizados com membranas de acetato de celulose, colódio com dodecanol e com papel de filtro não conduziram à detecção do estradiol no líquido acceptor, nem mesmo após 15 h de contato. Embora o volume do meio acceptor fosse mantido o menor possível (50 ml), a baixa concentração de estradiol nas formulações (0,06 % m / v), aliada ao baixo coeficiente de absorvidade molar desta substância ( $\epsilon = 2040$  em metanol a 280 nm) não permitiram a detecção da mesma, embora a cromatografia líquida de alta eficiência tenha demonstrado ser capaz de detectar até quantidades inferiores a 2  $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

Algumas alternativas a serem utilizadas no sentido de melhorar a detecção de estradiol consistem no aumento da área superficial das membranas, diminuição do volume de líquido acceptor e/ ou derivatização do estradiol, visando obter produtos com maior absorvidade molar.

Como teste alternativo para a determinação da biodisponibilidade empregou-se o modelo de absorção em membranas desenvolvido pelo grupo de trabalho de Neubert (NEUBERT e PARTYKA (1990); NEUBERT, e WOHLRAB(1990, 1990a); NEUBERT e BENDAS (1991)). O sistema que consiste na superposição de uma ou mais membranas de colódio adicionadas ou não de material lipofílico, como, por exemplo, dodecanol (figura 5, p. 25), foi empregado por aquele grupo, na avaliação da penetração de várias substâncias, permitindo, através da

comparação dos perfis de penetração nas membranas e nas camadas do estrato córneo, o estabelecimento de relações, que conduzem à avaliação do grau de equivalência entre diferentes formulações. Deste modo, o modelo pode possibilitar a avaliação do efeito dos diversos componentes da formulação sobre a penetração da substância ativa. A disponibilidade de um número limitado de membranas e de câmaras de amostras, a impossibilidade de realização de testes em paralelo com pele excisada e a relativa complexidade da metodologia analítica para quantificação de estradiol, fizeram com que os testes fossem conduzidos sob caráter preliminar, exploratório. Optou-se por modelo unilamelar, reduzindo-se as tomadas de amostra e as repetições dos experimentos. Foi observada a quantidade de estradiol absorvido nos intervalos de 3 e 4 h.

Os dados contidos nas tabelas 23, 25, 27, 29, 31 e 33 (p. 89 a 94) demonstram através da dispersão dos valores, as dificuldades metodológicas na execução dos ensaios. Considerando-se como variável dos mesmos a quantidade de gel aplicado, foi demonstrada por análise de correlação, a interdependência direta entre esta e a quantidade absorvida de estradiol, o que por sua vez, sugere que a absorção é dependente da concentração de estradiol disponível no gel. Não foi observada, correlação entre a quantidade de gel absorvido e a concentração de estradiol na membrana. Isto reforça inicialmente a observação anterior, de que a penetração é dependente da quantidade de estradiol aplicado, ou, em outras palavras, da quantidade da substância disponível. O gel teria então um papel secundário, servindo apenas como veículo de aplicação da substância ativa e não conduzindo consideravelmente o fenômeno de absorção.

A afinidade da substância com a membrana e, conseqüentemente, o gradiente de concentração do estradiol entre os dois sistemas, gel e membrana, regulariam o grau de absorção.

Empregando-se como valor de comparação o índice  $\Delta E$ , obtido através da razão entre a quantidade aplicada de gel (mg) e a quantidade absorvida de estradiol ( $\mu\text{g}$ ), representados nas tabelas 24, 26, 28, 30, 32 e 34 (p. 89 a 94). Observa-se inicialmente que, para os géis analisados, não houve diferença significativa entre os diferentes tempos de exposição. Verifica-se que as diferenças causadas pelos tempos de exposição sobre o índice de absorção ( $\Delta E$ ) para cada um dos géis analisados são devidas às variações do método, não permitindo inferir relacionamento deste fator (figura 32).

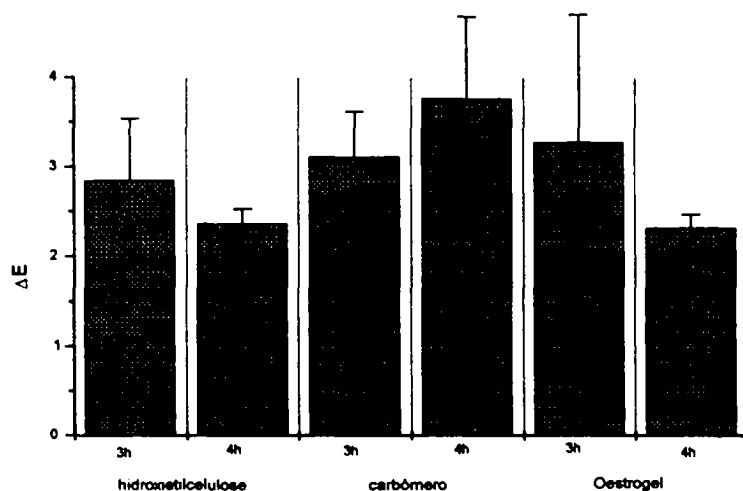


Figura 32 - Índices de absorção de estradiol em relação à quantidade aplicada de gel nos diferentes tempos de exposição.

Tabela 59 Testes utilizados e resultados do tratamento estatístico do percentual de absorção de estradiol HEC, de carbômero e de Oestrogel® submetidos ao pré-teste de absorção em membranas de dodecanol.

Amostra	Teste	Bartlet t	ANOVA	Teste t	Tuke y	K - W	M-W-W
Carbômero	Qa / tempo	+	NR	-	NR	NR	-
	Qa / membrana	+	NR	NR	NR	-	NR
HEC	Qa / tempo	-	NR	-	NR	NR	NR
	Qa / membrana	-	-	NR	-	NR	NR
Oestrogel	Qa / tempo	-	NR	-	NR	NR	NR
	Qa / membrana	-	-	NR	-	NR	NR

Conforme descrito no item 2.12 (p. 62), onde foram explicados todos os passos do procedimento estatístico. A tabela 59 e todas as outras que seguirão, referentes ao tratamento estatístico, apresentam os mesmos testes, siglas e símbolos. O teste de Bartlett, foi utilizado para verificar se existia homogeneidade entre as variâncias e, portanto, se deveria ser utilizado um teste paramétrico ou não. O sinal positivo representa diferença significativa nos testes comparativos e heterogeneidade no teste de Bartlett, ao passo que, o sinal negativo indica não haver diferença significativa entre os grupos analisados para um nível de significância de 5 %, ou no teste de Bartlett, que as variâncias são homogêneas. A sigla NR, indica que os testes não foram realizados e as siglas K-W e M-W-W representam respectivamente os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney-Wilcoxon

A análise estatística não apresentou diferença significativa dos comportamentos dos géis analisados.

A análise dos dados de absorção do estradiol, conforme visto até o momento, tem indicado fortemente para a prevalência do fenômeno de difusão ativa ao meio acceptor. Isto vem de encontro à lei de Fick, que rege o transporte por difusão em géis intumescidos (equação 2)

$$J_i = D_i \times \nabla C_i \quad (2)$$



Onde  $J_i$  é o fluxo do permeante ( $g / cm^2 / s$ ),  $D_i$  é o coeficiente de difusão e  $\nabla C_i$  é o gradiente de concentração do soluto no gel (KORSMEYER, 1991).

Decisivo para a descrição deste fenômeno é o conhecimento do coeficiente de difusão ( $D$ ), que está diretamente relacionado com o tamanho da molécula do soluto e com a viscosidade microscópica do meio de difusão.

MACEDO (1993) avaliando a literatura sublinha a importância da contribuição de Higuchi quanto ao modelo que expressa o mecanismo de liberação em géis, representado pela equação 3.

$$Q = 2C_o \times (Dt / \pi)^{1/2} \quad (3)$$

Onde  $Q$  é a quantidade de droga liberada por unidade de área de aplicação,  $C_o$  é a quantidade inicial de droga no gel,  $D$  o coeficiente de difusão da droga no gel e o tempo após a aplicação.

De acordo com esta equação calculou-se o coeficiente de difusão do estradiol em cada uma das membranas (tabela 60).

Tabela 60 Coeficientes de difusão do estradiol nos géis de carbômero, HEC e Oestrogel<sup>®</sup>, em contato com membranas durante 3 e 4 h

Amostra	Tempo de exposição (h)	D médio( $\times 10^{-3}$ ) $\pm$ s (CV%)
Carbômero	3	5,06 $\pm$ 1,89(37,29)
	4	3,77 $\pm$ 2,06(54,64)
HEC	3	5,31 $\pm$ 3,34(62,64)
	4	8,23 $\pm$ 1,07(12,95)
Oestrogel <sup>®</sup>	3	5,76 $\pm$ 3,19(55,38)
	4	8,59 $\pm$ 1,11(12,96)

A análise estatística dos coeficientes de difusão não apresentou diferença significativa entre as três formulações nos dois tempos testados nem nas formulações de carbômero e hidroxietilcelulose, porém, os coeficientes de difusão do Oestrogel® apresentaram diferenças significativas entre dois tempos de exposição conforme pode-se verificar na tabela 61 que demonstra os testes e resultados do tratamento estatístico. A discrepância encontrada nos coeficientes de difusão do estradiol no Oestrogel® pode ser atribuída a execução dos experimentos ou ainda à metodologia empregada e não à características de liberação da substância.

Tabela 61 Testes utilizados e resultados do tratamento estatístico dos coeficientes de difusão (D) de estradiol nos géis de carbômero, hidroxietilcelulose e Oestrogel®

Amostra	Teste	Bartlett	ANOVA	Teste t	Tukey
carbômero	D / Tempo	-	NR	-	NR
	D / membrana	-	-	NR	-
HEC	D / Tempo	-	NR	-	NR
	D / membrana	-	-	NR	-
Oestrogel®	D / Tempo	-	NR	+	NR
	D / membrana	-	-	NR	-

Os mecanismos que envolvem a liberação de estradiol dos géis estudados provavelmente estão relacionados com os coeficientes de partição entre estradiol / formulação e estradiol / membrana. Possivelmente o coeficiente de partição do estradiol pelas membranas é superior do que o coeficiente de partição nas formulações, fazendo com que seja desenvolvida uma tendência de difusão de estradiol do veículo para as membranas.

Com a finalidade de analisar possíveis interações entre os componentes da formulação foram efetuadas análises térmicas por calorimetria diferencial (DSC).

As análises realizadas em relação às matérias-primas estradiol, metilparabeno e propilparabeno caracterizam as substâncias quanto à pureza e identidade, podendo ser utilizadas como metodologias de rotina para controle de qualidade de matérias-primas.

As varreduras realizadas demonstram apenas isotermas de fusão para as três substâncias (100.4 °C, 129.6 °C e 179.2 °C respectivamente para propilparabeno, metilparabeno e estradiol) quando submetidos ao primeiro aquecimento. As amostras de propilparabeno e estradiol apresentaram os mesmos comportamentos quando submetidas a um segundo aquecimento, indicando que ambos não sofrem alterações como decomposição ou volatilização. A amostra de metilparabeno quando submetida a um segundo aquecimento apresenta uma transição térmica na mesma temperatura, porém com uma intensidade menor, indicando a ocorrência de volatilização da amostra ( alteração de intensidade de -236,91 para -120,50 mJ / mg).

As análises realizadas com misturas físicas das substâncias buscavam estabelecer quais seriam as isotermas de cada substância quando em mistura complexa. Sabe-se que misturas sólido - sólido podem apresentar deslocamentos nos pontos de fusão devido a fenômenos de solubilidade completa, parcial ou nula dos sólidos, formação de compostos congruentes, incongruentes ou complexos e formação de misturas eutéticas (METZ, 1979).

Foram analisadas misturas binárias entre estradiol, metilparabeno e propilparabeno e a mistura ternária. Para as misturas binárias observa-se inicialmente um deslocamento dos pontos de fusão em

todos os pares ( Tabela 62) indicando a existência de interação entre as mesmas. O propilparabeno apresentou um comportamento similar frente aos demais pares da mistura, enquanto que o metilparabeno mostrou um abaixamento mais acentuado do ponto de fusão quando na presença do estradiol. A intensidade de deslocamento desta grandeza para o estradiol foi cerca de três vezes maior quando associado ao metilparabeno do que em conjunto com o outro conservante. A mesma relação é observada para o desvio do ponto de fusão relativa do metilparabeno, que sendo mais acentuada quando acompanhado do estradiol. Como a diferença entre os dois adjuvantes reside somente na dimensão da cadeia alquilada, é de se esperar que as interações sejam provocadas pelos efeitos físicos que as mesmas ocasionam na molécula e que podem se espelhar na alteração da disponibilidade do átomo de hidrogênio fenólico, na polarização do grupamento carbonílico do éster, na movimentação eletrônica no anel aromático ou na hidrofobicidade do radical alifático do éster.

Tabela 62 Deslocamento dos pontos de fusão ( $\Delta$ PF) e suas variações percentuais ( $\Delta$  %) para as misturas binárias de propilparabeno (PP), metilparabeno (MP) e estradiol (E2)

mistura	PP $\Delta$ PF ( $\Delta$ %)	MP $\Delta$ PF ( $\Delta$ %)	E2 $\Delta$ PF ( $\Delta$ %)
PP+MP	-8.89 °C (8.85)	-5.118 °C (3.99)	---
PP+E2	-7.55 °C (7.52)	---	-9.73 °C (5.43)
MP+E2	---	-14.05 °C (10.84)	-27.31 °C (15.24)
PP+MP+E2	-5.26 °C (5.24)	-18.41 °C (14.20)	63.7 °C (35.55)

Também o termograma da mistura ternária mostra três picos deslocados quando correlacionados com os respectivos registros gráficos das substâncias isoladas. As intensidades destes desvios foram as mais acentuadas dentre os experimentos para o metilparabeno e estradiol, enquanto que, para o propilparabeno, foi encontrado o menor abaixamento do ponto de fusão.

Os termogramas referentes às amostras dos géis estão representados nas figuras 21 e 22 (p. 98 e 99). A idéia inicial de realização da análise térmica era determinar possíveis interações de cada uma das substâncias quando submetidas ao teste de estabilidade, porém, devido ao caráter físico da formulação, a diluição das substâncias a serem analisadas e a constante presença do tensoativo nas amostras com a conseqüente solubilização das substâncias, não foi possível observar as isotermas de cada uma das substâncias em ambos os géis analisados, não permitindo, portanto, determiná-las quantitativamente.

A análise das possíveis causas das interações observadas exigiriam o emprego de metodologias especiais e fogem ao propósito deste trabalho.

Quanto ao aspecto metodológico da avaliação dos géis seriam necessários estudos específicos que permitissem verificar o comportamento das substâncias, ora dificultados pela baixa concentração dos componentes da formulação (CANOTILHO, 1992).

As condições de armazenamento podem conduzir a alterações físicas e químicas em formulações semi sólidas que, por sua vez podem afetar, entre outros parâmetros, a uniformidade de dosagem, a biodisponibilidade e a reologia (DAVIS, 1987).

Com o intuito de verificar a integridade da qualidade foi realizado teste de estabilidade sob condições controladas de armazenamento. A primeira característica avaliada foi o perfil de espalhabilidade das formulações. Para tanto, analisou-se o comportamento dos índices das equações polinomiais de 2ª ordem que descrevem este fenômeno (equação 4).

$$y = A0 + A1X + A2^2 \quad (4)$$

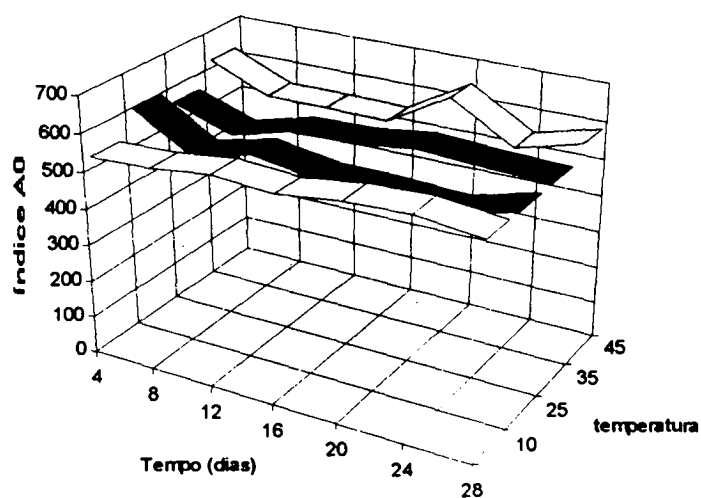


Figura 33 Índices A0 em géis de hidroxietilcelulose em relação à temperatura e tempo de armazenamento

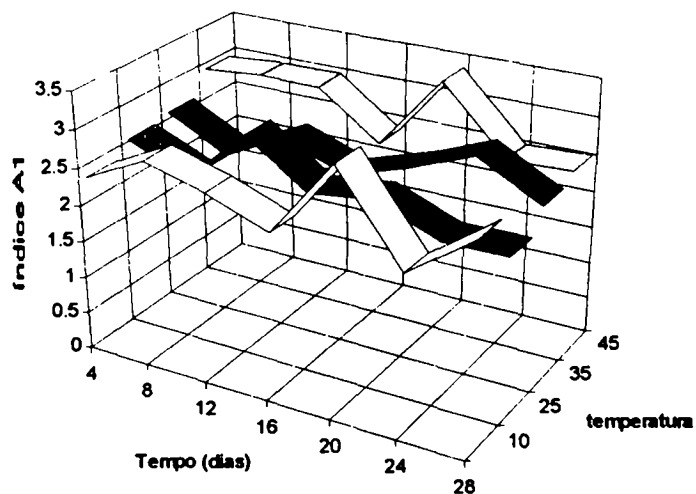


Figura 34 Índices A1 em géis de hidroxietilcelulose em relação à temperatura e tempo de armazenamento

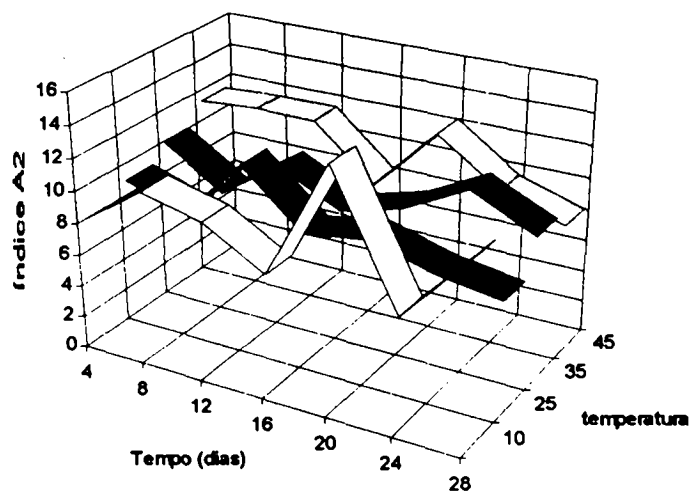


Figura 35 Índices A2 em géis de hidroxietilcelulose em relação à temperatura e tempo de armazenamento

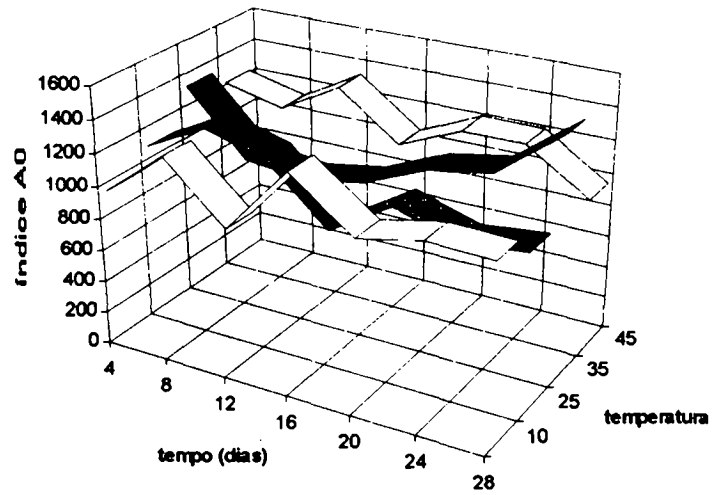


Figura 36 Índices A0 em géis de carbômero em relação à temperatura e tempo de armazenamento

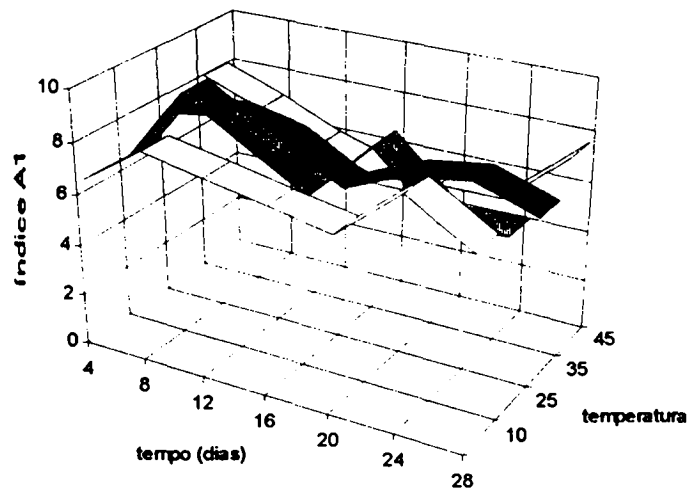


Figura 37 Índices A1 em géis de carbômero em relação à temperatura e tempo de armazenamento



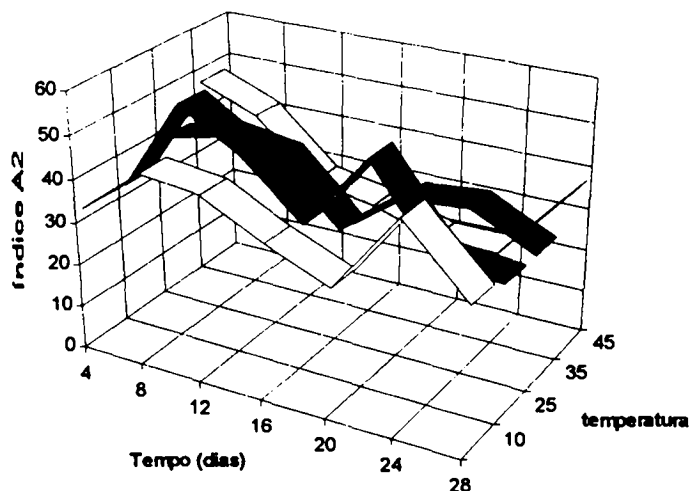


Figura 38 Índices A2 em géis de carbômero em relação à temperatura e tempo de armazenamento

As tabelas 43 a 56 (p. 105 a 118) apresentam os valores de espalhabilidade dos géis de carbômero e de HEC armazenados a 10, 25, 35 e 45 °C. Os valores de espalhabilidade de cada um dos géis armazenados nas diferentes temperaturas durante os 28 dias do ensaio foram utilizados para estabelecer as equações através da regressão polinomial de segunda ordem, das quais foram retirados os índices A0, A1 e A2, que representam a curva que expressa o perfil de espalhabilidade das amostras. O procedimento estatístico descrito no item 2.2.12 (p. 63) foi utilizado para estabelecer se o tempo ou a temperatura influem nos perfis de espalhabilidade. Os testes utilizados e os resultados do tratamento estatístico estão representados na tabela 63.

Tabela 63 Testes utilizados e resultados do tratamento estatístico dos índices criados com a regressão polinomial de segunda ordem com os valores de espalhabilidade dos géis submetidos ao pré-teste de estabilidade

Amostra	Teste	Bartlett	ANOVA	Tukey
carbômero	A0/temperatura	-	-	-
	A1/temperatura	-	-	-
	A2/temperatura	-	-	-
	A0/tempo	-	-	-
	A1/tempo	-	-	-
	A2/tempo	-	-	-
	HEC	A0/temperatura	-	-
	A1/temperatura	-	-	-
	A2/temperatura	-	-	-
	A0/tempo	-	-	-
	A1/tempo	-	-	-
	A2/tempo	-	-	-

Pode-se observar através da tabela 63 e das figuras 33 a 38 (p. 149 a 152) que apesar dos gráficos apresentarem variações dos índices nos diferentes tempos e temperaturas, estas, não são significativas, indicando que nenhuma das variáveis afeta significativamente as características físicas que regem o comportamento dos géis analisados.

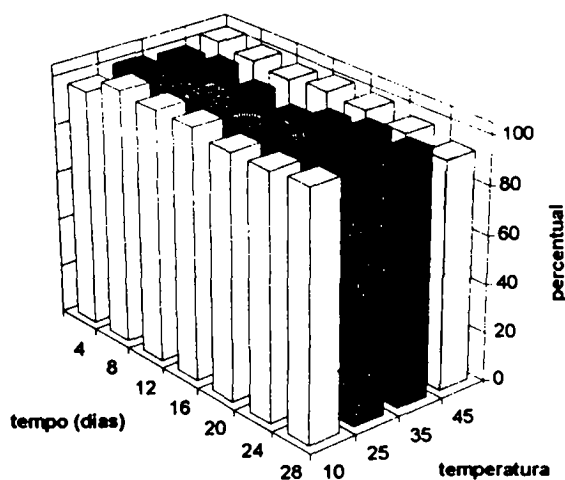


Figura 39 Teóres de estradiol em gel de carbômero armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas

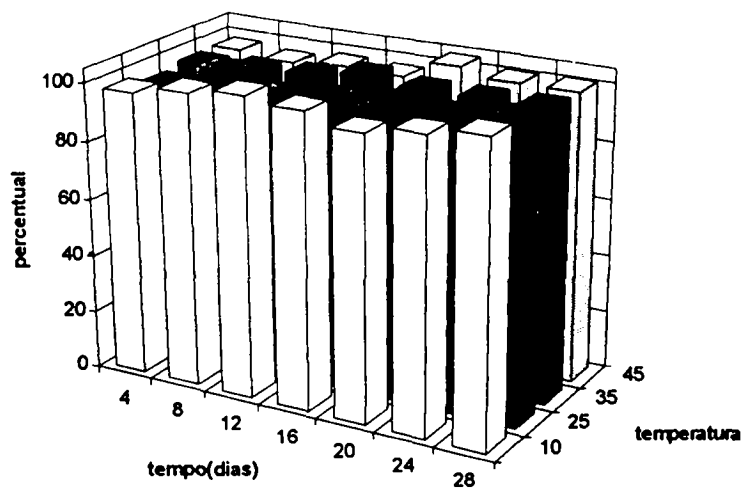


Figura 40 Teores de metilparabeno em gel de carbômero armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas

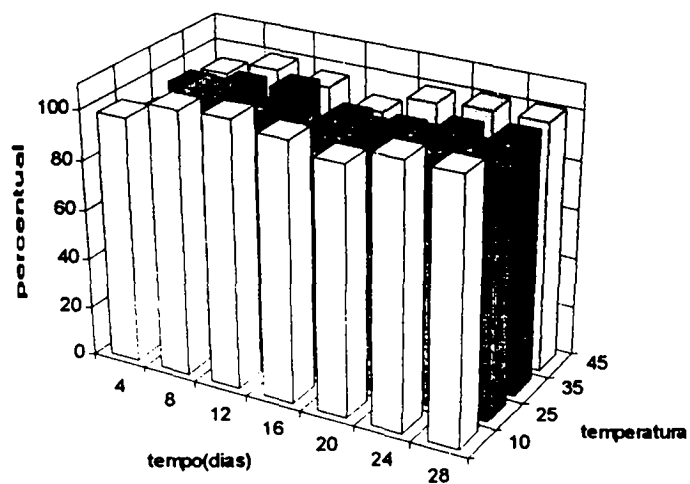


Figura 41 Teores de propilparabeno em gel de carbômero armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas

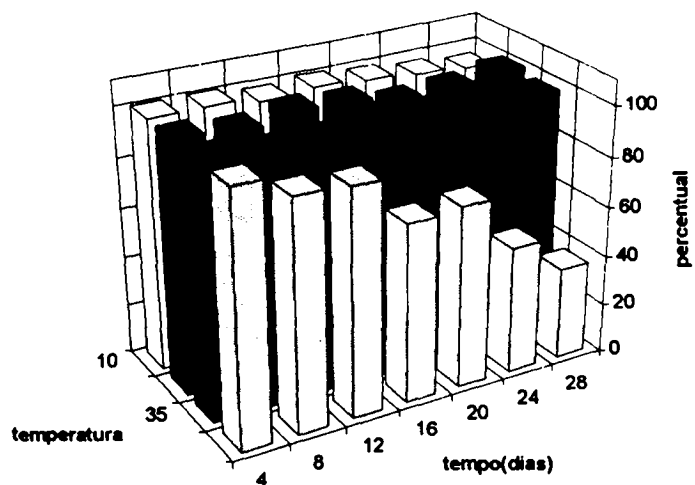


Figura 42 Teores de estradiol em gel de hidroxietilcelulose armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas

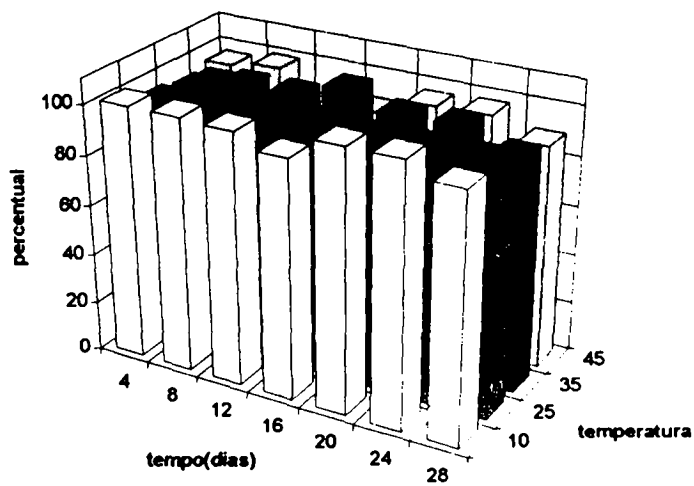


Figura 43 Teores de metilparabeno em gel de hidroxietilcelulose armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas

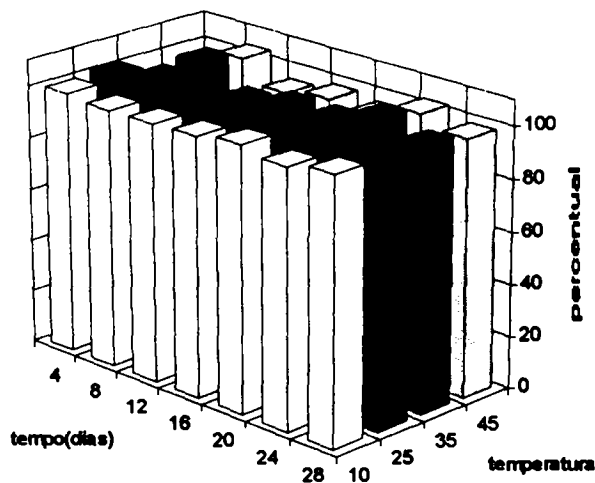


Figura 44 Teores de propilparabeno em gel de hidroxietilcelulose armazenado durante diferentes tempos a diferentes temperaturas

As figuras 39 a 44 demonstram a influência da temperatura e tempo de armazenamento sobre o teor de estradiol metilparabeno e propilparabeno nos géis de HEC e carbômero. Verificou-se através da análise estatística (tabela 64) que a concentração de metilparabeno manteve-se inalterada, não sofrendo nenhum tipo de degradação nas condições analisadas.

Tabela 64 Testes utilizados e resultados do tratamento estatístico dos teores de estradiol metilparabeno e propilparabeno em géis de HEC e carbômero submetidos ao pré-teste de estabilidade

Amostra	Teste	Bartlett	ANOVA	Tukey	K - W	M - W - W
	metilparabeno /temperatura	-	-	-	NR	NR
	propilparabeno /temperatura	-	+	10 °C≠45 °C	NR	NR
HEC	estradiol /temperatura	+	NR	NR	+	45 °C≠10, 25 e 35 °C
	metilparabeno /tempo	-	-	-	NR	NR
	propilparabeno /tempo	-	-	-	NR	NR
	estradiol/tempo	+	NR	NR	-	NR
	metilparabeno /temperatura	-	-	-	NR	NR
	propilparabeno /temperatura	-	+	10 °C≠35 e 45 °C	NR	NR
HEC	estradiol /temperatura	-	-	-	NR	NR
	metilparabeno /tempo	-	-	-	NR	NR
	propilparabeno /tempo	-	-	-	NR	NR
	estradiol/tempo	+	NR	NR	-	NR

Os géis de carbômero e HEC demonstraram um decréscimo das concentrações de propilparabeno com o aumento da temperatura de estocagem, entretanto, não foi observado nenhuma alteração influenciada pelo tempo de armazenamento. Segundo NUDELMAN (1975) pode-se atribuir a degradação do propilparabeno uma reação de hidrólise no grupamento éster da molécula.

A análise das figuras 45, 46 e 47 permite estabelecer que a degradação do estradiol observada nos géis de hidroxietilcelulose armazenados a 45 °C, observado na figura 42 (p. 156), obedece uma cinética de reação de ordem zero, indicado pela reta descendente resultante da regressão entre a concentração pelo tempo (figura 45), e curvas com

concavidades voltadas para baixo, obtidas nos gráficos do logaritmo decimal da concentração em função do tempo (figura 44) e do inverso da concentração em função do tempo (figura 47).

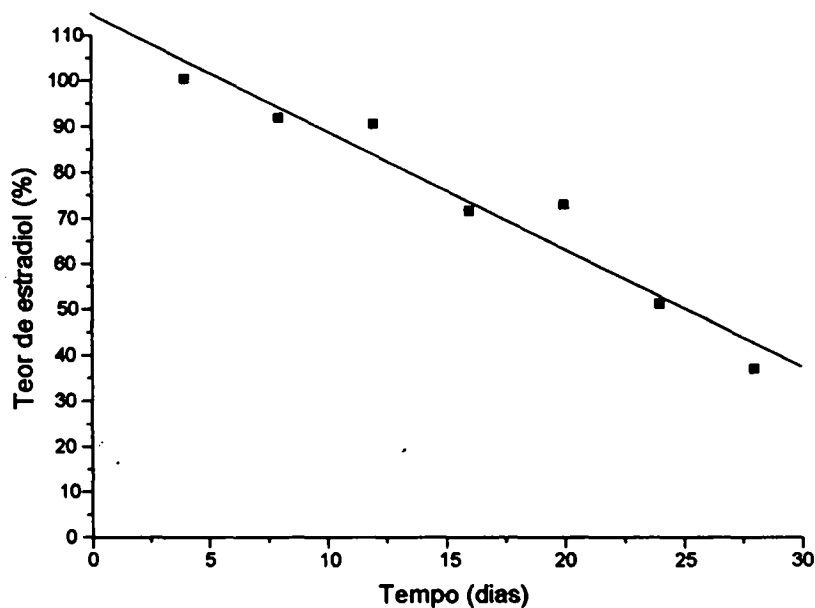


Figura 45 Teor de estradiol em função do tempo de estocagem de géis de hidroxietilcelulose armazenados a 45 °C

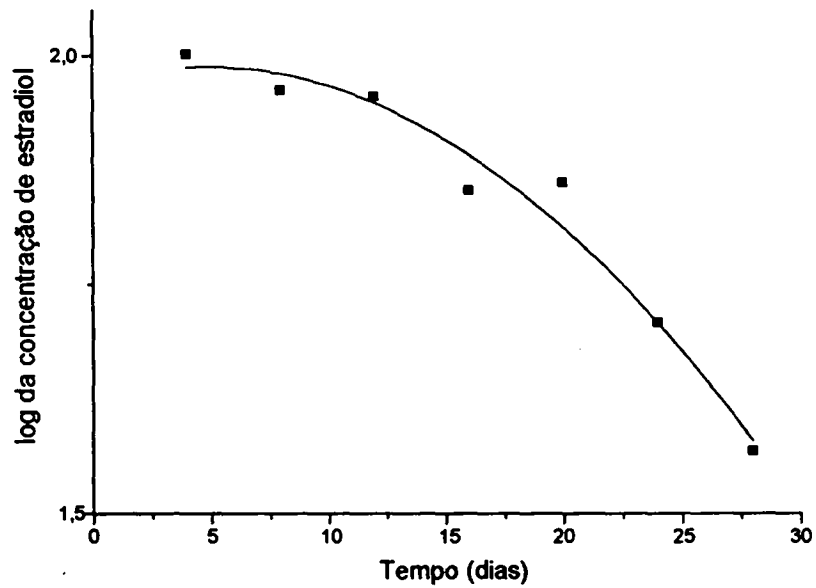


Figura 46 Logaritmo decimal do teor de estradiol em função do tempo de estocagem de géis de hidroxietilcelulose armazenados a 45 °C

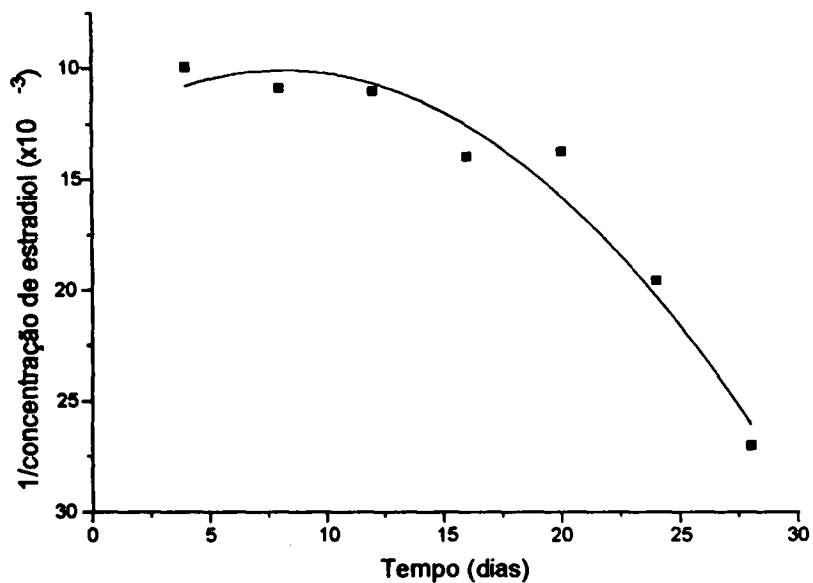


Figura 47 Inverso do teor de estradiol em função do tempo de estocagem de géis de hidroxietilcelulose armazenados a 45 °C



Admitindo-se que a reação segue uma cinética de ordem zero, pode-se calcular a constante da velocidade de reação através da equação 5.

$$K = \frac{C - C_0}{t} \quad (5)$$

Onde K é a constante da velocidade de reação e expressa a inclinação da reta gerada através da regressão entre a concentração e tempo, C é a concentração final,  $C_0$  a concentração inicial e t o tempo .

A constante da velocidade de degradação de estradiol nos géis de hidroxietilcelulose, armazenados a 45 °C, foi calculada através da equação 4 e corresponde a 2,251 dia<sup>-1</sup>.

As amostras estocadas a 10, 25 e 35 °C não apresentaram degradações significativas, impossibilitando o estabelecimento da ordem da reação de degradação do estradiol nestas condições, em nível de significância de 0,05 %. Conforme afirma NUDELMAN (1975), as reações de degradação devem evoluir no mínimo 30 % para poder-se estimar a ordem de uma reação. Usualmente, quando uma reação tenha avançado em menos de 30 %, e outra reação decorrente de outro tratamento tenha decorrido de forma mais intensa (acima de 30 % de degradação), admite-se que, as duas sigam a mesma cinética de reação. Desta forma pode-se admitir que as reações de degradação de estradiol em géis de hidroxietilcelulose armazenadas a 10, 25 e 35 °C seguem uma cinética de reação de ordem zero. Ao admitir-se isto, pode-se calcular a constante de velocidade de reação em cada temperatura, e conseqüentemente, estabelecer prazos de validade nas diferentes condições de armazenamento.

Calculou-se o prazo de validade dos géis de carboximetilcelulose armazenados a 25 °C, admitindo-se uma degradação de no máximo 10 % de estradiol, obtendo-se um valor de aproximadamente 5 dias. Experimentalmente, verificou-se que os géis estocados a 25 °C mantiveram-se inalterados quanto à concentração de estradiol, contrariando as conclusões obtidas com os cálculos do prazo de validade descritos anteriormente. Frente a estes fatos, imagina-se que o estradiol contido nos géis de hidroxietilcelulose e armazenados a 10, 25 e 35 °C apresente uma cinética de degradação com ordem de reação diferente da reação de degradação do estradiol armazenado a 45 °C.

A elucidação dos mecanismos que envolvem a degradação do estradiol em géis de hidroxietilcelulose não foi objetivo deste trabalho, porém, a observação da estrutura da molécula de estradiol, da presença dos outros constituintes da formulação e das características físico-químicas da mesma, sugerem que a degradação possivelmente seja atribuível à oxidação da hidroxila fenólica do anel A e / ou desidratação, conforme indicam NUDELMAN (1975), CONNORS (1986) e SALOLE (1986).

## **5. CONCLUSÕES**

- As formulações propostas, constituídas de carbômero ou de hidroxietilcelulose com 25 % de etanol e 20 % de polissorbato 20, mostraram-se satisfatórias no que diz respeito às características tecnológicas.

- As metodologias desenvolvidas para a eliminação de interferentes para as análises qualitativas e quantitativas das formulações permitiram o doseamento do estradiol e dos conservantes, como matérias-primas e nas formulações, conferindo resultados reprodutíveis.

- A cromatografia líquida de alta eficiência, utilizada para a determinação quantitativa da substância ativa, apresentou-se como método adequado.

- As formulações propostas demonstraram características de penetração através da pele de ratos, demonstrando perfis de absorção semelhantes entre si, em relação à via subcutânea e ao produto Oestrogel<sup>®</sup>, comercializado na Europa.

- O sistema desenvolvido para a avaliação da biodisponibilidade mostrou-se inadequado, devido à características da formulação e da substância ativa.

- O ensaio de absorção de estradiol em membranas artificiais, sugere que as bases formadoras do gel apresentam apenas um papel secundário na penetração, atuando principalmente como veículo e não na promoção da absorção.

- O teste preliminar de estabilidade, utilizando temperaturas elevadas, conduziu a uma degradação significativa do estradiol no gel constituído de base de hidroxietilcelulose, enquanto que a formulação constituída de base de carbômero, mostrou-se estável durante todo o decorrer do teste de estabilidade, sendo necessária a realização de estudos para avaliar os efeitos da formulação sobre a substância ativa degradada.

## **5. BIBLIOGRAFIA**

1. ALAIN, M.; BARDET, L.. Etude énergétique de la gélification du carbopol 934®. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 12, p. 173-183, 1982.
2. ALBERS, E.; MÜLLER, B. W.. Complexation of steroid hormones with cyclodextrin derivatives: Substituent effects of the guest molecule on solubility and stability in aqueous solution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 8, p.756-761, 1992.
3. AMJAD, Z.; HEMKER, W.J.; MAIDEN, C. A.; ROUSE 3, W. M.; SAUER C. E.. Carbomer Resins: Past, present and future. **Cosmetics & Toiletries**, v. 107, p. 81-86, 1992.
4. AMLACHER, R.; HÄRTL, A.; NEUBERT, R.; STÖCKEL, U.; WENZEL, K.. Influence of ion-pair formation on the pharmacokinetic properties of drug, Pharmacokinetic interactions of Bretylium and hexilsalicylic acid in rabbits. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** , v. 43, p. 794-797, 1991.
5. ANTUNES, G. S.. **Manual de Diagnóstico Bacteriológico**. Porto Alegre:Ed. da Universidade, 1991, p.14.
6. ASHTON, P.; WALTERS, K. N.; BRAIN, K. R.; HADGRAFT, J.. Surfactant effects in percutaneous absorption. I. Effects on the transdermal flux of methyl nicotinate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 87, p. 261-264, 1992a.
7. ASHTON, P.; WALTERS K. N.; BRAIN, K. R.; HADGRAFT, J.. Surfactant effects in percutaneous absorption. II. Effects on protein and lipid structure of the *stratum corneum*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 87, p. 265-269, 1992b.

8. BALFOUR, J. A.; RENNIE, H. C.. Transdermal estradiol a review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the treatment of menopausal complaints. **Drugs**, v. 40, n. 4, p. 561-582, 1990.
9. BARDETT-CONNOR, E.. Estrogen and estrogen replacement: Therapy and cardiovascular diseases. **The American Journal of Medicine**, v. 95, n. 54, p. 40-43, 1993.
10. BARRY, B.W.. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 6, p. 85-97, 1987.
11. BARRY, B. W.; BRACE, A. R.. Permeation of oestrone, oestradiol, oestriol and dexametasone across cellulose acetate membrane. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 29, n. 10, p. 397-400, 1977.
12. BASDEVANT, A.. Administration extradigestive des estrogènes: Intérêt dans le traitement de la ménopause. **La Revue de Médecine Interne**, v. 9, p. 355-358, 1988.
13. BERBA, J. & BANAKAR, U.. Clinical efficacy of current transdermal drug delivery systems: A retrospective evaluation, **American Pharmacy**, v. 30, n.11, p. 33-41, 1990.
14. BF GOODRICH. Carbopol Water Soluble Resins. Cleveland, 1987.
15. BIDMOND, H. J.; PITTS, J. D.; SOLOMON, M. F.; BONDI, J. V.; STUMPF, W. E.. Estradiol distribution and penetration in rat skin after topical application, studied by resolution autoradiography. **Histochemistry**, v. 95, p. 43-54, 1990.
16. BONINA, F. P.; CARELLI, V.; COLO, G. Di.; MONTENEGRO, L.; NANNIPERI, E.. Vehicle effects on *in vitro* skin permeation of *stratum corneum* affinity for model drugs caffeine and testosterone, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 100, p. 41-47, 1993.

17. BUCKS, D. A. W.; MAIBACH, H. I.; GUY, R. H.. Percutaneous absorption of steroids: Effect of repeated application. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 12, p. 1337-1339, 1985.
18. **BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBAENDE** (Hrsg.). *Deutscher Arzneimittel - Codex*. 1986. Frankfurt:Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1986a. v. 1: Codex-Probe.
19. **BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBAENDE** (Hrsg.). *Deutscher Arzneimittel - Codex*. 1986. Frankfurt:Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1986b. v.2: Holunderblüten.
20. BURKE, T. W. L.; MANT, C. T.; HODGES, R. S.. The effect of varying flow-rate, gradient-rate, and detection wavelength on peptide elution profiles in reversed-phase chromatography. In: MANT, C. T.; HODGES, R. S. (Eds). **HPLC of peptides and proteins and conformation**, CRC: Boca Raton, 1991, p. 307-317.
21. CANOTILHO, J.; SOUSA, A. T. B.; PINTO, J. A. M. C.. Análise térmica. Interesse em tecnologia farmacéutica. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 42, n. 4, p. 5-12, 1992.
22. CAPITANO, G.; TSCHERNE, R.. Separation and quantitation of esterified estrogens in bulk mixtures and combination drug preparations using High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 3, p. 311-314, 1979.
23. CARTWRIGHT, A. C.. Stability tests on active substances and finished products: New European Guideline. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 15, n. 10, p. 1743-1757, 1989.
24. CASTAGNETTA, L. A.; GRANATA, O. M.; LO CASTO, M.; CALABRÓ, M.. Simple approach to measure metabolic pathways of steroids in living cells. **Journal of Chromatography**, v. 572, p. 25-39, 1991.



25. CHETKOWSKI, R. J.; MELDRUM, D. R.; STEINGOLD, K. A.; RANDLE, D.; LU, J. K.; HERSHMAN, J. M.; ALKJAERSIG, N. K.; FLETCHER, A. P.; JUDD, H. L.. Biological effects of transdermal estradiol. **The New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 25, p. 1615-1620, 1988.
26. COCHRAN, R. C.; EWING, L. L.. Celite column chromatography followed by reversed-phase High Performance Liquid Chromatography: A single, two-step method for separating 14 testicular steroids. **Journal of Chromatography**, v. 173, p. 175-181, 1979.
27. CONNORS, K. A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J.. **Chemical Stability of Pharmaceuticals**.. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.
28. CONRATH, G.; FALSON-RIEG, F.; BESNARD, M.; PEPPAS, N. A.. Diffusive characteristics of testosterone in novel gels. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 285-291, 1988.
29. CORTI, P. et alli. Strato sottile e densitometria per la determinazione quantitativa di farmaci-Nota II. Separazione e dossaggi de miscelle compesse de su strati diversi. **Bollettino Chimico Farmaceutico**., v. 123, p. 565-577, 1984.
30. COSTA, P.; FERREIRA, D. C.; SOUSA LOBO, J. M.. Sistemas de libertação transdémica. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 43, n. 3, p. 19-26, 1993a.
31. COSTA, P.; FERREIRA, D. C.; SOUSA LOBO, J. M.. Liodisponibilidade do lorazepan em sistemas de libertação transdémica. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 43, n. 3. p. 47-50, 1993b.
32. DAVIS, S. S.. Physicochemical Criteria for Semi-solid Dosage Forms. In GRIMM, W. (Ed.). **Stability Testing of Drug Products**. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1987. cap. 2, p. 40-55.
33. DIBBELT, L.; KUSS, E.. Isocratic reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of free and sulphoconjugated steroids. **Journal of Chromatography**, v. 322, p. 371-375, 1985.

34. DIBBERN, H.-W. (Ed.). **UV and IR Spectra of some Important Drugs.** Aulendorf: Cantor, 1978a, v. I. p. 1207-1208.
35. DIBBERN, H.-W. (Ed.). **UV and IR Spectra of some Important Drugs.** Aulendorf: Cantor, 1978b, v. II. p. 2202.
36. DUKES, G. R.. General considerations for stability testing of topical pharmaceutical for formulations. In: OSBORNE, D.; AMANN, A. H. (Eds). **Drugs and the pharmaceutical Sciences Topical Drug Delivery Formulations.** New York:Marcel Dekker, 1990, v. 42, cap. 10, p. 197-211.
37. DURANDEAU, C.; GUÉROULT, P.; FAWAZ, F.; AUMONIER, P.. Promoteurs d'absorption cutanée. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 20, p. 68-78, 1992.
38. ETTINER, B. Optimal use of postmenopausal hormone replacement. **Obstetric & Gynecology**, v.72, n. 5, p. 31-36, 1988.
39. **FARMACOPÉIA Brasileira.** 3. ed. São Paulo: Andrei, 1977.
40. **FARMACOPÉIA Brasileira.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1.
41. FORD, J. L.; TIMMINS.. **Pharmaceutical Thermal Analysis Techniques and Applications.** Chichester: John Wiley & Sons, 1989.
42. FOX, C.. Gels and sticks- Review and update. **Cosmetics & Toiletries**, v. 99, p. 19-54, 1984.
43. FRIEND, D.; CATZ, P.; HELLER, J.. Simple alkyl esters as skin permeation enhancers. **Journal of Controlled Release**, v. 9, p. 33-41, 1989.
44. FÜRST, W.; NEUBERT, R.; JURKSCHAT, T.; LÜCKE, L.. Prodrug approach of orotic acid using an absorption model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 43-49, 1990.

45. GEDDE, U. W.. Thermal analysis of polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, p. 2465-2486, 1990.
46. GHANEM, A.-H.; MAHMOUD, H.; HIGUCHI, W. I.; LIU, P.; GOOD, W. R.. The effects of ethanol on the transport of lipophilic and polar permeants across hairless mouse skin: Methods/validation of a novel approach. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 78, p. 137-156, 1992.
47. GHOSH, T. K.; BANGA, A. K. Methods of enhancement of transdermal drug delivery. Part I, physical and biochemical approaches. **Pharmaceutical Technology**, v. 17, n. 3, p. 72-96, 1992.
48. GHOSH, T. K.; BANGA, A. K. Methods of enhancement of transdermal drug delivery. Part IIB, Chemical permeation enhancers. **Pharmaceutical Technology**, v. 17, n. 5, p. 68-74, 1993.
49. GREMINGER, G. K.. Cellulose Derivative Ethers. In: MARK, H. F.; OTHMER, P. F.; OVERBERGER, C. G.; SEABORG, G. T. (EdS.). **KIRK OTHMER Encyclopedia Of Chemical Technology**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1982, v.5, p. 153-163.
50. GUY, R. H.; HADGRAFT, J.. Interpretation and prediction of the kinetics of transdermal drug delivery: Oestradiol, hyoscine and timolol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 32, p. 159-163, 1986.
51. GUYTON, A. C.. **Tratado de Fisiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. cap. 81, p. 766.
52. HARA, S.; HAYASHY, S. Correlation of retention behaviour of steroidal pharmaceuticals in polar and bonded reversed-phase liquid column chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 142, p. 689-703, 1977.
53. HATANAKA, T.; INUMA, M.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y.. Prediction of skin permeability of drugs. I. Comparison with artificial membrane. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 3452-3459, 1990.

54. HELMAN, J.. **Farmacotecnia. Teoria y Pratica**. Mexico:Continental, 1982, v. 2.
55. HUBER, J. F. K.; WELTE, S.; REICH, G.. Prediction of partition coefficients in ternary liquid-liquid system composition by factor analysis for chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 177, p. 1-14, 1985.
56. IDSON, B.. Effects of emulsifiers on skin. **Cosmetics & Toiletries**, v. 106, p. 43-51, 1991.
57. IDSON, B.. Percutaneous absorption. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 6, p. 901-924, 1975.
58. ILLEL, B.; SCHAEFER, H.; WEPIERRE, J.; DOUCET, O.. Follicles play an important role in percutaneous absorption. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 5, p. 424-427, 1991.
59. JANSEN, E. H. J.; BLITTERSWIJK, H. V.; ZOONTJES, P. W.; BOTHMIEDEMA, R.; STEPHANY, R. W.. Seletivity of a diol phase High-Performance Liquid Chromatographic system in trace analysis of anabolic compouds. **Journal of Chromatography**, v. 347, p. 375-378, 1985
60. JASS, H.; ELIAS, P. M.. The living stratum corneum: Implications for cosmetic formulation, **Cosmetic & Toiletries**, v. 106, p. 47-53, 1991.
61. JUDD, H.. Efficacy of transdermal estradiol. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 156, n. 5, p. 1326-1331, 1987.
62. KNORST, M. T.. **Desenvolvimento Tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo estrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. Compositae (marcela)**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 1991. 228f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)

63. KNUTSON, K.; KRILL, S. L.; LAMBERT, W. J.; HIGUCHI, W. I.. Physico chemical aspects of transdermal permeation. **Journal of Controlled Release**, v. 6, p. 59-74, 1987.
64. KORSMEYER, R. W.. Diffusion Controlled Systems: Hydrogels. In: TARCHA, P. J. (Ed.) **Polymers for Controlled Drug Delivery**. Boca Raton: CRC, 1991, cap. 2, p. 15-37.
65. KUBOTA, K.; SZNITOWSKA, M.; MAIBACH, H. I.. Percutaneous Absorption: A single-layer model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 5, p. 450-456, 1993.
66. LAUFER, L. R.; DeFAZIO, J. L.; LU, J. K.; MELDRUM, D. R.; EGGENA, P.; SAMBHI, M. P.; HERSHMAN, J. M.; JUDD, H. L.. Estrogen replacement therapy by transdermal estradiol administration. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 146, n. 5, p. 533- 540, 1983.
67. LEROY, P.; BENOIT, E.; NICOLAS, A.. Determination and stability of eostradiol benzoate in a pharmaceutical oinment by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 367, p. 428-433, 1986.
68. LIGNIERES, B.; BASDEVANT, A.; THOMAS, G.; THALABARD, C.; MERCIER-BODARD, C.; CONARD, J.; GUYENE, T.- T.; MAIRON, N.; CORVOL, P.; GUY-GRAND, B.; MAUVAIS-JARVIS, P.; SITRUK-WARE, R.. Biological effects of estradiol 17  $\beta$  in postmenopausal women: Oral *versus* percutaneous administration. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.62, n. 3, p. 536-541, 1986.
69. LIGNIERES, B.; BOUSSER, M. G.. Migraine, **The Lancet**, v. 340, (jul 4), p. 61,62, 1992.
70. LIMA, G. R. de. Hormônios sexuais femininos. In: VALLE, L. B. de S.; et alli. **Farmacologia Integrada**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991, v. 2, cap. 62, p. 1035-1052.
71. LIU, P.; KURIHARA-BERGSTROM, T.; GOOD, W. R.. Cotransport of estradiol and ethanol through human skin *in vitro*: Understanding the

- permeant/enhancer flux relationship. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 7, p. 938-944, 1991a.
72. LIU, P. HIGUCHI, W. I.; SONG, W.-q.; KURIHARA-BERGSTRON, T.; GOOD, W. R.. Quantitative evaluation of ethanol effects on diffusion and metabolism of  $\beta$ -estradiol in hairless mouse skin. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 7, p. 865-872, 1991b.
73. LIU, P. HIGUCHI, W. I.; GHANEM, A.-H.; KURIHARA-BERGSTRON, T.; GOOD, W. R.. Quantitation of simultaneous diffusion and metabolism of  $\beta$ - estradiol in hairless mouse skin: Enzyme distribution and intrinsic diffusion/metabolism parameters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 64, p. 7-25, 1990.
74. LOBO, R. A.. Absorption and metabolic effects of differnt types of estrogens and progetogens. In: Don GRAMBELL, R. (ed.). **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. The Menopause**. Philadelphia: W. B. Sauders, 1987, v. 14, n. 1, p. 143-167.
75. MACCARTHY, T.; DRAMUSIC, V.; RATNAM, S.. Use of two types of estradiol releasing skin patches for menopausal patients in a tropical climate. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 166, n. 6 part 2, p. 2005-2010, 1992.
76. MACEDO, T.; BLOCK, L. H.; SHUKLA, A. J.. Release of tolmetin from carbomer gel systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, n. 8, p. 887-902, 1993.
77. MACINTYRE, I.; WHITEHEAD, M. I.; BANKS, L. M.; STEVENSON, J. C.; WIMALAWANSA, S. J.; HEALY, M. J. R.. Calcitonin for prevention of postmenopausal bone loss. **The Lancet**, v. 23, p. 900-902, 1988.
78. MACLENNAN, A. H.. Hormone replacement therapy and the menopause. **The Medical Journal of Australia**, v.155, p. 43-44, 1991.
79. METZ, C. R.. **Físico-Química**, 1979, Barueri: MaCGraw Hill, p. 217.

80. MILLER-BASS, K.; ADASHI, E. Y.. Current status and future prospects of transdermal estrogen replacement therapy. **Fertility & Sterility**, v. 53, n. 6, p. 961-974, 1990.
81. MOLLGAARD, B.; HOELGAARD, A.. Permeation of estradiol through the skin - effect of vehicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 185-197, 1983.
82. MOLLGAARD, B.; HOELGAARD, A.. Vehicle effect on topical drug delivery. **Acta Pharmaceutica Suecica**, v. 20, p. 443-450, 1983.
83. MOLLICA, J. A.; AHUJA, S.; COHEN, J.. Stability of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 4, p. 443-465, ano ?.
84. MURAD, F.; KURET, J. A.. Estrogênios e progestogênios. In: GILMAN, A. G.; et alli (eds.). **Goodman e Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 58, p. 921-929.
85. NEEDHAM, G. F.; PFEIFFER, R. R.; ENGEL, G. L.; ALLEN, D. J.. Effect of impurities on estradiol crystalization in a sustained-release implant. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 10, p. 1012-1014, 1992.
86. NEUBERT, R.. Ion pair transport across membranes. **Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 9, p. 743-747, 1989.
87. NEUBERT, R.; BENDAS, C.; WOHLRAB, W.; GIENAU, B.; FÜRST, W.. A multilayer membrane system for modelling drug penetration into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 75, p. 89-94, 1991.
88. NEUBERT, R.; PARTYKA, D.; WOHLRAB, W.; DETTLAFF, B.; FÜRST, T. W.; TAUBE, K. M.. Penetration of salicylic acid and salicylat into the multilayer membrane system and into the human horny layer. **Dermatol. Mon. Schr.**, v. 176, p. 711-716, 1990.

89. NEUBERT, R.; WOHLRAB, W.. *In vitro* methods for the biopharmaceutical evaluation of topical formulations. **Acta Pharmaceutica Technologica**, v. 36, n. 4, p. 197-206, 1990.
90. NUDELMAN, N. S.. **Estabilidade de Medicamentos**. Buenos Aires: Ateneo, 1975.
91. OMS. Comitê de Peritos da OMS em Especificações para Produtos Farmacêuticos. **Trigésimo-segundo Relatório**. Genebra, 1992.
92. ORBE, A.; SUNDELÖF, L.-O.. A new *in vitro* mode for quantitative study of cream permeability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 41, p. 49-53, 1988.
93. OSÓRIO, M. C.; VITOLA, D.; SPRITZER, P.. Uso de gel de estradiol 17 $\beta$  percutâneo no tratamento substitutivo de pacientes pós-menopáusicas hipertensas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 36, n.2, p. 40-43, 1992.
94. PERSHING, L. K.; LAMBERT, L. D.; KNUTSON, K.. Mechanism of ethanol-enhanced estradiol permeation accross human skin *in vivo*. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 2, p. 170-175, 1990.
95. POTTS, J. E.. Plastics, Environmentally Degreable. In: MARK, H. F.; OTHMER, P. F.; OVERBERGER, C. G.; SEABORG, G. T. (EdS.). **KIRK OTHMER Encyclopedia Of Chemical Technology**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1982, v. s, p. 626-668.
96. POTTS, R. O.; FRANCOEUR, M. L.. The influence of *stratum corneum* morphology on water permeability. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 96, n. 4, p. 495-499, 1991.
97. ROSKOS, K. V.; MAIBACH, H. I.; GUY, R. H.. The effect of aging on percutaneous absorption in man. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 17, n. 6, p. 617-630, 1989.



98. RUDY, D. R.. Hormone replacement therapy How select the best preparation and regimen. **Postgraduate Medicine**, v.88, n. 8, p. 157-164, 1990
99. SALOLE, E. G.. Estradiol. In: FLOREY, K.. **Analytical Profiles of Drug Substances**. San Diego: Academic Press. 1986. v.15, p. 283-318.
100. SCHENKEL, L.; BARLEIER, D.; RIERA, M.. Transdermal absorption of estradiol from different body sites is comparable. **Journal of controlled Release**, v. 4, p. 195-201, 1986.
101. SCHLABACH, T. D.; ZIESKE, L. R.; WILSON, K. J.. Micro- HPLC techniques for the purification and analysis of peptides and proteins. In: MANT, C. T.; HODGES, R. S. (Eds.). **HPLC of Peptides and Proteins and Conformation**, Boca Raton: CRC, 1991, p. 661-667.
102. SCHMOLKA, I. R.. Gel Cosmetics. **Cosmetics & Toiletries**, v. 99, p.69-76, 1984.
103. SCOTT, R. T.; ROSS, B.; ANDERSON, C.; ARCHER, D. F.. Pharmacokinetics of percutaneous estradiol: A crossover study using a gel and a transdermal system in comparison with oral micronized estradiol. **Obstetrics & Gynecology**, v. 77, n. 5, p. 758-764, 1991.
104. SHAH, V. P.; FLYNN, G. L.; GUY, R. H.; MAIBACH, H. I.; SCHAEFER, H.; SKELLY, P.; WESTER, R. C.; YACOBI, A.. *In vivo* percutaneous penetration / absorption. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 8, p. 1071-1075, 1991.
105. SHEIKH, S. U.; TOUCHSTONE, J. C.. Effect of subambient temperatures on separation of steroid enantiomers by High-Performance Liquid Chromatography, **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 1472-1473, 1987.
106. SITRUK-WARE, R.. Transdermal delivery of steroids. **Contraception**, v. 39, n. 1, p. 1-20, 1989.

107. SPRITZER, P. M.; GROSS, J. L.; MALLMANN, E.; OPPERMAN, K.  
Hormônios Sexuais. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L..  
**Farmacologia Clínica. Fundamentos da Terapêutica Racional.**  
Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992 , cap. 43, p. 539-553.
108. STEVENSON, J. C.; CUST, M. P.; GANGAR, K. F.; HILLARD, T. C.;  
LEES, B.; WHITEHEAD, M. I.. Effects of transdermal versus oral  
hormone replacement therapy on bone density in spine and proximal  
femur in postmenopausal women. **The Lancet**, v. 336, p. 265-269,  
1990.
109. TEOT, A. S.. Resins, Water-soluble. In: MARK, H. F.; OTHMER, P. F.;  
OVERBERGER, C. G.; SEABORG, G. T. (EdS.). **KIRK OTHMER  
Encyclopedia Of Chemical Technology**. 3. ed. New York: John  
Wiley & Sons, 1982, v. 20, p. 207-230.
110. **THE UNITED States Pharmacopeia**. USP XXII. 22.rev. Rockville:  
United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 1990.
111. TSCHERNE, R. J.; CAPITANO, G.. High-Pressure Liquid  
Chromatography separation of pharmaceutical compounds using a  
mobile phase containing silver nitrate. **Journal of Chromatography**,  
v. 136, p. 337-341, 1977.
112. TYMES, N. W.; SHAH, V. P.; SKELLY, J. P.. *In vitro* release profile of  
estradiol transdermal therapeutic systems. **Journal of  
Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 7, p. 601-602, 1990.
113. VANROOJII, J. G. M.; ROOS, J. H. C. de; BODELIER-BADE, M. M.;  
JONGENELEN, F. J.. Absorption of polycyclic aromatic  
hydrocarbons through human skin: Differences between anatomical  
sites and individual. **Journal of Toxicology and Environmental  
Health**, v. 38, p. 355-368, 1993.
114. VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M.. **Tratado de Tecnologia Farmacêutica**.  
3. ed. Zaragoza:Acribia, 1982.

115. VOLLMER, V.; MÜLLER, B. W.; WILFFERT B.; PETERS, T.. An improved mode for studies on transdermal drug absorption *in vivo* in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 242-245, 1993.
116. WEHBE, S.. Reposição estrogênica em mulheres no climatério. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 36, n. 2, p. 111, 1992.
117. WESTER, R. C.; MAIBACH, H. I.. Percutaneous absorption of drugs. **Clinical Pharmacokinetics** v. 20, n. 4, p. 253-260, 1992.
118. WILL, P. C. et alli. Polyethylene glycols as solvents in implantable osmotic pumps. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 6, p. 747-749, 1980.
119. WILLARD, H. H. et alli.. **Instrumental Methods of Analysis**. 7ed. Belmont: Wadsworth 1987. Thermal Analysis, cap. 25, p. 761-785.
120. WILLIAMS A. C.; BARRY, B. W.. Skin absorption enhancers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 9, n. 3, 4, p. 305-353, 1992.
121. WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W.. The enhancement index concept applied to terpene penetration enhancers for human skin and model lipophilic (oestradiol) and hydrophilic (5-fluorouracil) drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 74, p. 157-168, 1991.
122. YOUNG, W. R.. Accelerated temperature pharmaceutical product stability determination. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 4, p. 551-569, 1990.
123. ZATZ, J. L.. Modification of skin permeation by solvents. **Cosmetics & Toiletries**, v. 106, p. 91-98, 1991a.
124. ZATZ, J. L.. Modification of skin permeation by surfactants. **Cosmetics & Toiletries**, v. 106, p. 89-91, 1991b.