UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da influência de tensoativos na pele de muda de cobra
(*Bothrops jararaca* e *Spilotis pullatus*) por espectroscopia fotoacústica
no infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e
espectroscopia Raman

Aurea Cristina Lemos Lacerda

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Telma Mary Kaneko

São Paulo
2004

Aurea Cristina Lemos Lacerda

Avaliação da influência de tensoativos na pele de muda de cobra (*Bothrops jararaca* e *Spilotis pullatus*) por espectroscopia fotoacústica no infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia Raman

Comissão julgadora
da
Dissertação para a obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
Orientador/ presidente

Prof. Dr. Yoshio Kawano
1°. examinador

Profa. Dra. Maria Elena Santos Taqueda
2°. examinador

São Paulo, 29 de Julho de 2004

DEDICATÓRIA

“Tudo fez Deus formoso no seu devido tempo.” Ecl. 3:11

Aos meus pais Hercílio e Lucy, pelo incentivo, apoio e amor incondicional que sempre estiveram prontos a me dedicar em todos os momentos.

Aos meus irmãos Kim e Mina, pela constante presença na minha vida e no meu coração.

À minha doce sobrinha Sarah e à Vera, minha cunhada, pelo carinho e amizade.

À amiga do coração, Marlene, pelo grande apoio, incentivo e ajuda inestimável na concretização deste trabalho.

À querida tia e madrinha Albertina (in memoriam), pelo amor que sempre me dedicou.

À Telma, sábia orientadora, agradeço pela oportunidade e pela confiança que depositou em mim. Obrigada por dividir seu conhecimento e sua experiência, por mostrar os caminhos mais adequados e pelo incentivo e motivação constantes.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yoshio Kawano, do laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da USP, pela inestimável contribuição na geração e interpretação dos dados apresentados neste trabalho. Agradeço a dedicação e a paciência com as quais esteve sempre pronto a nos ajudar.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Instituto de Química da USP, por disponibilizar os equipamentos necessários para a realização dos experimentos.

À Stepan Química Ltda. por possibilitar a frequência no programa de Mestrado.

Aos colegas da Stepan Química Ltda. que de forma direta ou indireta, contribuíram para o andamento deste trabalho.

Aos funcionários Elaine M. Ychico e Jorge A. de Lima pelos esclarecimentos e ajuda nos assuntos administrativos.

Aos funcionários do laboratório de Controle Microbiológico pela colaboração na realização deste trabalho.

RESUMO

LACERDA, A.C.L.. **Avaliação da influência de tensoativos na pele de muda de cobra (*Bothrops jararaca* e *Spilotis pullatus*) por espectroscopia fotoacústica no infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia Raman.** 2004. 147 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

A influência dos tensoativos lauril sulfato de sódio, cloreto de cetil trimetil amônio e álcool láurico etoxilado com 12 moles de óxido de etileno sobre o *stratum corneum* da pele de muda das cobras *Bothrops jararaca* e *Spilotis pullatus* foi avaliada através das técnicas biofísicas de PAS-FTIR, FT-Raman e DSC. Foram utilizadas soluções dos tensoativos em concentrações acima e abaixo da cmc e tratamentos por 4 e 8 horas (*stratum corneum* íntegro) e por 12 horas (*stratum corneum* após a remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva). A presença do lauril sulfato de sódio e do cloreto de cetil trimetil amônio no *stratum corneum* foi detectada e a principal alteração observada para ambos foi o aumento do conteúdo hídrico do tecido; o álcool láurico etoxilado com 12 moles de óxido de etileno não promoveu aumento do conteúdo hídrico, apresentando ação de extração de lipídeos. A remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva mostrou ser um procedimento útil para tratamento do *stratum corneum* da pele de muda de cobra, tornando a membrana mais adequada para estudos da ação de promotores de permeação.

Palavras-chave: tensoativo, promotor de permeação, pele de muda de cobra.

ABSTRACT

LACERDA, A.C.L. **Evaluation of the influence of surfactants on the *stratum corneum* of shed snake skin (*Bothrops jararaca* and *Spilotis pullatus*) by photoacoustic spectroscopy, differential scanning calorimetry and Raman spectroscopy**. 2004. 147p. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2004.

The influence of the surfactants sodium lauryl sulfate, cetyl trimethyl ammonium chloride and lauryl alcohol ethoxylate (12 moles ethylene oxide) was evaluated on the *stratum corneum* of shed snake skin (*Bothrops jararaca* and *Spilotis pullatus*) through the biophysical techniques PAS-FTIR, FT-Raman and DSC. The surfactants were used in solutions above and below the cmc and the *stratum corneum* samples were pre-treated for periods of 4 and 8 hours (whole *stratum corneum*) and for 12 hours (*stratum corneum* after tape stripping procedure). The presence of the surfactants sodium lauryl sulfate and cetyl trimethyl ammonium chloride could be detected in the *stratum corneum* and the main change promoted by both was the increase of the water content of the membrane; the lauryl alcohol ethoxylate (12 moles ethylene oxide) did not promote increase in the hydration but showed some action as far as lipid extraction. The tape stripping procedure showed to be useful for the treatment of the *stratum corneum* of shed snake skin, making the membrane more adequate than the whole *stratum corneum* for the studies of the action of permeation enhancers.

Keywords: surfactants, permeation enhancer, shed snake skin.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	6
3. Revisão Bibliográfica.....	7
3.1. Anatomia, funções fisiológicas e composição química da pele humana.....	8
3.1.1. Epiderme.....	9
3.1.2. Derme.....	16
3.1.3. Tecido subcutâneo.....	17
3.2. Aspectos gerais da absorção cutânea.....	17
3.2.1. Importância dos sistemas transdérmicos.....	17
3.2.2. Fundamentos da absorção cutânea.....	19
3.3. Rotas de permeação de fármacos através da pele.....	22
3.3.1. Permeação através dos apêndices cutâneos.....	23
3.3.2. Permeação através do <i>stratum corneum</i> contínuo.....	24
3.4. Fatores que interferem na absorção.....	25
3.4.1. Fatores de natureza biológica.....	26
3.4.1.1. Integridade do <i>stratum corneum</i>	26
3.4.1.2. Idade do indivíduo.....	27
3.4.1.3. Sítios regionais.....	27
3.4.1.4. Metabolismo cutâneo.....	28
3.4.1.5. Efeito da circulação sanguínea.....	28
3.4.1.6. Hidratação do <i>stratum corneum</i>	29
3.4.1.7. Variação entre as espécies.....	30
3.4.2. Fatores de natureza físico-química.....	31
3.4.2.1. Fatores relacionados ao fármaco.....	31
3.4.2.2. Interações do fármaco com a pele.....	35
3.4.2.3. Veículo.....	35
3.4.3. Promotores de permeação.....	36
3.5. Metodologias para a avaliação da permeabilidade cutânea.....	39
3.5.1. Métodos <i>in vitro</i>	40

3.5.1.1. Membranas.....	41
3.6. Métodos biofísicos no estudo do <i>stratum corneum</i>	46
3.6.1. Espectroscopia vibracional: FT-Raman e PAS-FTIR.....	46
3.6.1.1. Espectroscopia FT-Raman.....	48
3.6.1.2. Espectroscopia PAS-FTIR.....	53
3.6.2. DSC.....	55
3.7. Tensoativos.....	57
3.7.1. Aspectos gerais.....	57
3.7.2. Interações com a pele.....	67
3.7.3. Ação como promotores de permeação.....	74
4. Material e métodos.....	83
4.1. Material.....	83
4.1.1. Tensoativos.....	83
4.1.2. Reagentes.....	85
4.1.3. Equipamentos.....	85
4.2. Métodos.....	86
4.2.1. Fluxograma dos experimentos.....	86
4.2.2. Preparo das soluções de tensoativo utilizadas para o tratamento da pele de muda de cobra.....	87
4.2.3. Preparação da pele de muda de cobra para análises biofísicas..	88
4.2.3.1. <i>Stratum corneum</i> íntegro.....	88
4.2.3.2. <i>Stratum corneum</i> após tratamento da superfície com fita adesiva.....	88
4.2.4. Métodos Biofísicos.....	89
4.2.4.1. PAS-FTIR	89
4.2.4.2. FT-Raman.....	90
4.2.3.3. DSC	91
5. Resultados e discussão.....	92
5.1. FT -Raman e PAS-FTIR.....	93
5.1.1. Tratamento do <i>stratum corneum</i> com tensoativo aniônico lauril sulfato de sódio.....	101

5.1.2. Tratamento do <i>stratum corneum</i> com tensoativo catiônico cloreto de cetil trimetil amônio.....	112
5.1.3. Tratamento do <i>stratum corneum</i> com tensoativo não iônico álcool láurico etoxilado (12 OE).....	121
5.2. DSC.....	129
6. Conclusões.....	134
Referências bibliográficas.....	136
Apêndice.....	147

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Composição lipídica do <i>stratum corneum</i> humano	13
Tabela 2. Comparação entre pele humana e pele de animais.....	30
Tabela 3. Comparação do <i>stratum corneum</i> humano x <i>Elaphe obsoleta</i>	45
Tabela 4. Modos vibracionais do <i>stratum corneum</i> humano determinados por FT-Raman.....	50
Tabela 5. Modos vibracionais do <i>stratum corneum</i> humano e de cobra determinados por FT-Raman.....	96
Quadro 1: Especificações dos tensoativos utilizados nos experimentos.....	84
Quadro 2: Concentrações das dispersões de tensoativos utilizadas.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de sugestão para a organização dos lipídeos no <i>stratum corneum</i>	14
Figura 2. Rota intercelular e transcelular através do <i>stratum corneum</i>	23
Figura 3. Muda de pele de cobra: <i>Spilotis pullatus</i> e <i>Bothrops jararaca</i>	43
Figura 4. Representação esquemática de um corte transversal da pele de cobra.....	45
Figura 5. Esquema de espectrômetro FT-Raman RFS 100.....	49
Figura 6. Esquema de funcionamento de célula fotoacústica.....	54
Figura 7. Interação por troca iônica.....	60
Figura 8. Interação via emparelhamento iônico.....	60
Figura 9. Interação via pontes de Hidrogênio.....	60
Figura 10. Interação via ácido-base de Lewis.....	61
Figura 11. Interação por dispersão de forças em superfície não polar.....	61
Figura 12. Adsorção por interação hidrofóbica em (a) superfície sem carga, (b) superfície com carga.....	61
Figura 13. Curva típica em “S” representativa da adsorção de um tensoativo aniônico a uma superfície de carga oposta.....	62
Figura 14. Adsorção de um tensoativo aniônico a uma superfície de carga oposta por troca iônica e emparelhamento iônico.....	63
Figura 15. Espectro FT-Raman de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Spilotis pullatus</i> tratada com água por 8 h (controle).....	98
Figura 16. Espectro FT-Raman de <i>stratum corneum</i> da pele íntegra de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> exposta à água por 8 h (controle).....	98
Figura 17. Espectro FT-Raman de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratada com água por 8 h (controle).....	99

Figura 18. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Spilotis pullatus</i> tratado com água por 8 h (controle).....	100
Figura 19. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> tratado com água por 8 h (controle).....	100
Figura 20. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com água por 8 h (controle).....	101
Figura 21. Espectro FT-Raman do <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> tratada com lauril sulfato de sódio a 50 g/L em água por 4 h (controle em destaque).....	103
Figura 22. Espectro FT-Raman do <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> tratada com lauril sulfato de sódio a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque).....	103
Figura 23. Espectro FT-Raman do <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Spilotis pullatus</i> tratada com lauril sulfato de sódio a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque).....	104
Figura 24. Espectro FT-Raman de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado lauril sulfato de sódio a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque).....	104
Figura 25. Espectro FT-Raman de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado lauril sulfato de sódio a 2,34 g/L em água por 12 h (controle em destaque).....	106
Figura 26. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> tratada com lauril sulfato de sódio 50 g/L em água por 4 h (controle em destaque).....	107
Figura 27. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> tratada com lauril sulfato de sódio 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque).....	108
Figura 28. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Spilotis pullatus</i> tratada com lauril sulfato de sódio 50 g/L em água por 4 h (controle em destaque).....	109
Figura 29. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Spilotis pullatus</i> tratada com lauril sulfato de sódio 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque).....	109

Figura 30. Espectro IR (PAS FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado lauril sulfato de sódio a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque).....	110
Figura 31. Espectro IR (PAS FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado lauril sulfato de sódio a 2,34 g/L em água por 12 h (controle em destaque).....	111
Figura 32. Espectro FT-Raman do <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> tratada com cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque).....	113
Figura 33. Espectro FT-Raman do <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Spilotis pullatus</i> tratada com cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque).....	113
Figura 34. Espectro FT-Raman de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque).....	114
Figura 35. Espectro FT-Raman de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com cloreto de cetil trimetil amônio a 0,78 g/L em água por 12 h (controle em destaque).....	115
Figura 36. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> tratada com cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 4 h (controle em destaque).....	116
Figura 37. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Spilotis pullatus</i> tratada com cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 4 h (controle em destaque).....	117
Figura 38. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Spilotis pullatus</i> tratada com cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque).....	118
Figura 39. Espectro IR (PAS FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado cloreto de cetil trimetil amônio a 0,78 g/L em água por 12 h (controle em destaque).....	120

Figura 40. Espectro IR (PAS FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque).....	120
Figura 41. Espectro FT-Raman do <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> tratada com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque).....	122
Figura 42. Espectro FT-Raman do <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Spilotis pullatus</i> tratada com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque).....	123
Figura 43. Espectro FT-Raman de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com cloreto de álcool láurico etoxilado (12 OE) a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque).....	124
Figura 44. Espectro FT-Raman de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 0,21 g/L em água por 12 h (controle em destaque)	124
Figura 45. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> tratada com álcool láurico etoxilado a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque).....	126
Figura 46. Espectro IR (PAS-FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Spilotis pullatus</i> tratada com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque).....	127
Figura 47. Espectro IR (PAS FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque)	128
Figura 48. Espectro IR (PAS FTIR) de <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 0,21 g/L em água por 12 h (controle em destaque).....	128
Figura 49. Curva de DSC do <i>stratum corneum</i> da pele de muda da cobra <i>Bothrops jararaca</i> tratada com água por 8 h (controle).....	130

Figura 50. Curva de DSC do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* tratada com água por 8 h (controle)..... 131

Figura 51. Curvas de DSC do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com cloreto de cetil trimetil amônio (tensoativo catiônico), lauril sulfato de sódio (tensoativo aniônico), álcool láurico etoxilado (tensoativo não iônico) a 50 g/L em água e com água (controle) por 8 h 132

Figura 52. Curvas de DSC do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* tratada com cloreto de cetil trimetil amônio (tensoativo catiônico), lauril sulfato de sódio (tensoativo aniônico), álcool láurico etoxilado (tensoativo não iônico) a 50 g/L e com água (controle) por 8 h..... 147

LISTA DE ABREVIações

ATR-FTIR	espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada
C	cadeia carbônica
°C	Grau Celsius
CAS	Chemical Abstracts Service
CGS	sistema de unidades (centímetro,grama,segundo)
cm	centímetro
cmc	concentração micelar crítica
Cv	concentração do soluto no veículo
d	dia
D	coeficiente de difusão do soluto através da membrana
DMAA	N,N,dimetil amino acetato
DMF	dimetil formamida
DMSO	dimetil sulfóxido
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EHL	equilíbrio hidrofílico-lipofílico
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
FT-Raman	espectroscopia Raman com transformada de Fourier
g	grama
h	hora
H	espessura da membrana
J	fluxo através da membrana
kg	quilograma
Km	coeficiente de partição membrana/solvente
L	litro
L	“lag time” – tempo para estabelecer gradiente de concentração uniforme através da membrana
m	metro
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mM	mili molar
mm	milímetro
mW	mili Watt
N	Newton
nm	nanômetro
OE	óxido de etileno
p/p	relação peso/peso
p/v	relação peso/volume
PAS-FTIR	espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformada de

PAS-UV	Fourier espectroscopia fotoacústica no ultravioleta
PEG	polietilenoglicol
Ph Eu	Farmacopéia Européia
s	segundo
SI	Sistema Internacional
US Pharmacopoeia	United States Pharmacopoeia
v/v	relação volume/volume
ΔC	variação da concentração do soluto nos dois lados da membrana
μm	micrômetro
π	pressão da superfície
®	marca registrada
™	Marca comercial

1. Introdução

A pele humana atua como uma excelente barreira em duas direções, controlando a perda de água e de outros constituintes do meio interno e prevenindo simultaneamente a entrada de substâncias do meio externo (ANIGBOGU *et al.*, 1995).

A camada mais externa da pele, a epiderme, em particular o *stratum corneum*, representa a principal barreira à penetração de substâncias (ANIGBOGU *et al.*, 1995; BARRY, 2001).

A veiculação de fármacos pela via tópica apresenta diversas vantagens sobre a via oral ou sistêmica, tais como prevenção da etapa inicial de metabolização hepática do fármaco, possibilidade de administração contínua do fármaco e efeitos colaterais potencialmente menores. Porém, a baixa permeabilidade da pele em relação a outros tecidos biológicos torna limitada sua utilização como rota de administração (ANIGBOGU *et al.*, 1995; PARK *et al.*, 2000).

O uso de substâncias químicas que reduzem de forma reversível as características de permeabilidade do *stratum corneum*, denominadas promotores de permeação, tem sido uma estratégia amplamente pesquisada e bastante promissora como forma de promover a penetração de fármacos através da pele tanto para terapia local quanto sistêmica (ANIGBOGU *et al.*, 1995; PARK *et al.*, 2000; BARRY, 2001).

Os tensoativos são utilizados para melhorar a estabilidade física de muitas formulações farmacêuticas para uso tópico. Sabe-se que estes compostos atuam sobre as características de permeabilidade de diversas membranas biológicas, incluindo a pele e por esta razão podem aumentar a penetração de outros compostos presentes na formulação (LÓPEZ *et al.*, 2000).

Os estudos de penetração através da pele desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de formas farmacêuticas para aplicação dérmica (efeito local) ou transdérmica (efeito sistêmico). Portanto a seleção de um modelo

in vitro para este estudo é de grande importância (SCHMOOK, MEINGASSENER e BILLICH, 2001).

Acredita-se que a permeação cutânea observada *in vitro* pode indicar a disponibilidade das formas farmacêuticas (LOPES & KANEKO, 2000).

A situação ideal é a utilização da pele humana em modelos *in vitro* para avaliação das propriedades de permeação de fármacos, porém a pouca disponibilidade de amostras de pele em quantidade suficiente para estes estudos e as dificuldades de armazenamento tornam seu uso limitado (SCHMOOK, MEINGASSENER e BILLICH, 2001; RIGG & BARRY, 1990).

Como alternativas de membranas muitos pesquisadores utilizam pele de animais de experimentação, membranas sintéticas e culturas tridimensionais como a epiderme reconstruída, a pele equivalente (LOPES & KANEKO, 2000).

Existe atualmente interesse no uso da pele de muda de cobra como modelo para pele humana. Diversos pesquisadores têm avaliado a aplicabilidade da pele de muda de cobra em estudos de permeação com diferentes graus de sucesso (RIGG & BARRY, 1990; WIDLER, SIGRIST e GAFNER, 2002).

A pele de muda de cobra fornece uma barreira similar ao *stratum corneum* humano e pode ser obtida sem a morte do animal, uma vez que a troca de pele (ou ecdise) ocorre regularmente no animal adulto, em geral a cada 2 a 3 meses, fornecendo material em abundância. A pele de muda de cobra é de fácil armazenamento e não sofre degradação microbiológica. Apresenta-se como *stratum corneum* puro, não viável e desprovido de folículos pilosos (RIGG & BARRY, 1990; ITOH *et al.*, 1990a).

As cobras ou serpentes formam a subordem *Ophidia* que pertence à ordem *Squamata*, da classe *Reptila*. As venenosas estão compreendidas em três famílias: *Viperidae*, *Elapidae* e *Atractaspiridae*. A cobra Jararaca, nome científico *Bothrops jararaca*, pertence à família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae*. Esse animal possui hábitos noturnos e encontra-se disseminado por toda a região sudeste, centro-sul e sul do Brasil. Os animais adultos pesam em média 140-240 g. A cobra Caninana, nome científico *Spilotes pullatus*, pertence à família

Culubridae e não é uma cobra venenosa. O animal adulto pode ter até 2,5 metros de comprimento e pesar cerca de 1 kg. Habita as regiões do cerrado e Mata Atlântica (HOGE, 1979; AMARAL, 1977; YAMANOUYE, 1997).

Várias técnicas espectroscópicas têm sido empregadas recentemente no estudo da estrutura do *stratum corneum* e das modificações causadas pela ação de fármacos ou de promotores de absorção químicos. A vantagem mais importante destas técnicas é que não são destrutivas (HANH *et al.*, 2002; SCHENDZIELORZ *et al.*, 1999).

Foi recentemente demonstrada que a espectroscopia fotoacústica no infravermelho (PAS FTIR) é uma técnica útil no monitoramento da permeação de fármacos. Na espectroscopia fotoacústica, de uma maneira geral, a luz modulada proveniente de qualquer região (ultravioleta, visível ou infravermelho) incide sobre a amostra, é absorvida e gera calor no interior da amostra. Após a difusão do calor para a superfície da amostra, há geração de onda de pressão (isto é, som) no gás de transferência circundante, sendo o sinal de som registrado por um microfone sensível acoplado à célula fotoacústica; o som fornece informações sobre as vibrações da amostra. No caso de espectrômetro infravermelho, a detecção é feita na forma de um interferograma (HANH *et al.*, 2001). As amostras podem ser prontamente utilizadas sem nenhuma preparação prévia. É uma técnica aplicável a meios não transparentes e que absorvem fortemente a luz, como é o caso do *stratum corneum* (HANH *et al.*, 2001; HANH *et al.*, 2000; ROSENCWAIG & PINES, 1977).

Uma outra técnica espectroscópica útil ao estudo da permeação de fármacos através do *stratum corneum* é a espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman). É uma técnica de espectroscopia vibracional de particular interesse no estudo de moléculas biológicas principalmente devido a pouca influência provocada pela presença da água nas amostras em estudo. A utilização de pequenas quantidades de amostra e o fato de não ser uma técnica destrutiva representam vantagens adicionais. (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; HANH, *et al.*, 2000; ANIGBOGU *et al.*, 1995; CASPER *et al.*, 2001).

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica amplamente utilizada para a avaliação de mudanças de propriedades térmicas do *stratum corneum* permitindo o estudo dos efeitos que compostos aplicados sobre a pele exercem sobre a morfologia do *stratum corneum*. O *stratum corneum* isolado apresenta quatro transições endotérmicas características nas temperaturas de 40, 75, 85 e 105 °C. A primeira transição, inicialmente relacionada à fusão de lipídeos do sebo, é atualmente atribuída à transição dos lipídeos das bicamadas do estado cristalino (ortorrômbico) para o estado de gel (hexagonal). As duas transições a 75 °C e 85 °C tem sido atribuídas à transição de fase do estado de gel lamelar para líquido. Muitos autores relacionam a transição a 85 °C às transições envolvendo lipídeos associados a proteínas. A quarta transição a 105 °C representa a desnaturação da porção protéica do *stratum corneum* e requer a presença de uma certa concentração de água na amostra (no mínimo 15%) para ser aparente. Modificações nas entalpias envolvidas nas transições de fases de lipídeos e alterações no pico de desnaturação da queratina indicam uma interação entre compostos aplicados e o *stratum corneum*, permitindo melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas interações e auxiliando no desenvolvimento de bases para produtos de uso dérmicos e transdérmico (LEOPOLD & LIPPOLD, 1994).

Frente ao exposto, pesquisas estão sendo realizadas empregando tensoativos como promotor de absorção de substâncias ativas de ação terapêutica e cosmética, com diversas abordagens. Assim, o estudo da influência dos tensoativos na permeabilidade cutânea de fármacos ou de substâncias cosméticas ativas através da pele é relevante. A utilização de muda de pele de cobra como modelo alternativo para o estudo da permeação cutânea contempla o aspecto da ética experimental com animais e humana, além de ser ecologicamente correta. Adicionalmente, a utilização de métodos biofísicos para a avaliação das modificações do *stratum corneum* provenientes da aplicação de tensoativos é útil e vantajosa. Esses apresentam redução de tempo/trabalho, menor quantidade de amostra de pele para análise, a qual pode ser empregada em diferentes determinações e métodos, portanto, diminuindo a variabilidade nos resultados. A

associação de metodologias analíticas complementa a análise e fornece informações úteis sobre o estudo do comportamento dos tensoativos e outras substâncias aplicadas na pele.

Assim, a análise criteriosa de resultado pode indicar o perfil de permeação, refletindo na eficácia da preparação do produto em atingir o efeito terapêutico e cosmético desejado.

2. Objetivo

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de tensoativos sobre a pele de muda da cobra Jararaca (*Bothrops jararaca*) e Caninana (*Spilotis pullatus*) utilizando PAS FTIR, FT-Raman e DSC. Os tensoativos utilizados foram o lauril sulfato de sódio, o cloreto de cetil trimetil amônio e o álcool láurico etoxilado com 12 moles de óxido de etileno, tensoativos pertencentes a três classes químicas e grupos iônicos diferentes. O *stratum corneum* das peles de muda das cobras foram submetidos à pré-tratamento com soluções dos tensoativos em duas concentrações, acima e abaixo da concentração micelar crítica (cmc), por períodos de tempo determinados.

3. Revisão Bibliográfica

A via tópica compete com a via oral, atualmente, como a área mais inovadora e bem sucedida na pesquisa de administração de fármacos. Nos Estados Unidos da América em 2001 havia cerca de 129 produtos em avaliação clínica, sendo que 51 eram sistemas dérmicos ou transdérmicos (BARRY, 2001).

Os produtos de ação tópica para o tratamento de doenças dermatológicas já existem há tempos, ao passo que os produtos transdérmicos, para os quais a pele é utilizada como uma rota alternativa para a terapia sistêmica, são formas farmacêuticas relativamente novas (SHAH *et al.*, 1992).

Os produtos transdérmicos são desenvolvidos para a veiculação de fármacos através da pele visando à obtenção de efeito sistêmico sem o uso de rotas mais tradicionais como a oral, parenteral, pulmonar ou retal e conseqüentemente a pele não é o tecido alvo para estes produtos. São características importantes para neste tipo de preparação a passagem rápida do fármaco através da pele, com um mínimo de retenção local (SHAH *et al.*, 1992; BARRY, 1983).

Os produtos dermatológicos de ação tópica são desenvolvidos para direcionar fármacos para a pele, visando o tratamento de problemas dérmicos ou tendo alguma finalidade cosmética e nestes casos a pele é o tecido alvo. As principais características para estes produtos incluem um fluxo mínimo do fármaco através da pele e máxima retenção local, minimizando a exposição a efeitos sistêmicos tóxicos e mantendo uma concentração adequada na pele pelo período de tempo necessário para produção do efeito farmacológico (SHAH *et al.*, 1992; ZATZ, 1993).

Estudos referentes à permeação cutânea realizados *in vitro* envolvem o uso de membranas. O melhor modelo de membrana é o *stratum corneum* humano, porém devido à dificuldade de obtenção e manutenção de amostras muitas vezes torna-se necessário o uso de alternativas como membranas de animais de

experimentação ou membranas sintéticas. Sendo assim, o conhecimento detalhado das características estruturais e funcionais da pele humana é relevante para a avaliação das potencialidades e limitações das membranas alternativas.

3.1. Anatomia, funções fisiológicas e composição química da pele humana

Na hierarquia da organização biológica, a estrutura e a função das membranas reside em algum ponto entre as macromoléculas e as células. Como estruturas macroscópicas agregadas de forma não covalente, originárias de macromoléculas anfipáticas, as membranas em geral apresentam características únicas que são diferentes das características de outras biomoléculas e seus agregados. Conter, compartimentar e regular a transferência de metabólitos e macromoléculas em organismos vivos é a principal função das membranas (JAIN, 1988).

A pele é o tecido que recobre o corpo humano e o mais facilmente acessível. Em um indivíduo adulto cobre uma área aproximada de 2m^2 . É elástica, flexível e sob condições fisiológicas normais é auto-regenerativa. Sua espessura é de apenas alguns milímetros e sua principal função embora não única, é a separação e proteção do meio interno do organismo, do meio ambiente, que em muitas situações, pode se apresentar hostil. Protege também o organismo da invasão de microorganismos, agentes químicos e várias formas de radiação, mantendo os tecidos e fluídos corporais em seu interior (CHIEN, 1992; ZATZ, 1993).

Além da função de barreira entre o meio externo e o meio interno, a pele exerce ainda outras funções, tais como recepção de estímulos externos de tato, pressão, dor e calor; regulação da temperatura corporal; síntese e metabolização de compostos e eliminação de metabólitos via secreção glandular e regulação da pressão sanguínea (BARRY, 1983).

A pele não é um tecido homogêneo, mas possui folículos pilosos, terminações nervosas, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e vasos sanguíneos (BARRY, 1983).

Em termos anatômicos, a pele é formada por várias camadas histológicas, que podem ser agrupadas em três tecidos: epiderme; derme; e tecido subcutâneo.

3.1.1.Epiderme

A epiderme é a camada mais externa da pele e é formada por células epiteliais estratificadas. As células que formam o tecido epitelial se diferenciam das células dos demais órgãos por sofrerem um processo de diferenciação (BARRY, 1983).

A epiderme tem espessura variável, dependendo do tamanho da célula e do número de camadas presentes no local considerado, variando de cerca de 0,8 mm na palmas das mãos e planta dos pés até espessuras ao redor de 0,06 mm na região das pálpebras (BARRY, 1983).

É um tecido composto por diferentes camadas sendo a mais interna denominada camada basal ou *stratum germinativum*, que é a camada regenerativa da epiderme. As células presentes nesta camada são nucleadas e o processo de mitose destas células renova constantemente a epiderme. Esta proliferação celular, em indivíduos saudáveis, equilibra a perda de células queratinizadas superficiais. Nesta camada estão também presentes os melanócitos, que sintetizam grânulos de melanina, responsável pela pigmentação e proteção da pele contra radiações solares. A junção dermo-epidérmica está localizada abaixo da camada basal e é a unidade anatômica que tem a função de promover a aderência entre as camadas dérmica e epidérmica, além de atuar como suporte mecânico para a epiderme e controlar a passagem de células e algumas moléculas de alto peso molecular através da junção, permitindo, porém a

passagem de água, eletrólitos e outros materiais de baixo peso molecular (BARRY, 1983).

As células produzidas pela camada basal se movimentam em direção à superfície da pele sofrendo um processo de diferenciação morfológica e bioquímica. Este processo de modificação celular ocorre de forma ordenada e as células passam de metabolicamente ativas na camada basal ou *stratum germinativum* a células mortas e queratinizadas do *stratum corneum* (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992; BARRY, 1983).

Nas camadas mais espessas da pele, a migração e diferenciação celular envolve a passagem seqüencial das células através de três camadas da epiderme: o *stratum spinosum*, o *stratum granulosum* e o *stratum lucidum*, até a formação da camada mais externa e última etapa da diferenciação celular, o *stratum corneum* (CHIEN, 1992).

Ao longo do processo de migração a partir do *stratum germinativum*, as células se tornam achatadas e o núcleo diminui de tamanho. Formam-se saliências citoplasmáticas denominadas desmossomos, entre células adjacentes, auxiliando na manutenção da integridade da epiderme. Na região próxima à superfície, ocorre a produção de grânulos de querato-hialina, que são organelas parcialmente destruídas por enzimas hidrolíticas. Esta região da epiderme é denominada *stratum granulosum* e é uma região de intensa atividade bioquímica e de mudanças morfológicas. Imediatamente sobre a camada granular, existe uma camada anatomicamente distinta e translúcida denominada *stratum lucidum* (BARRY, 1983).

O *stratum corneum* é a camada mais externa da epiderme e é formado por células achatadas, anucleadas e desprovidas das organelas habituais, mas repletas de filamentos de queratina. Estas células são denominadas corneócitos e estão agrupadas de forma tangencial à superfície da pele, entrelaçando as bordas laterais com as células adjacentes e formando uma lâmina coesa. Os espaços intercelulares são preenchidos principalmente por uma dupla camada de lipídeos, com importante papel na função barreira do *stratum corneum*. O *stratum corneum*

exibe alguma atividade enzimática e atualmente sabe-se que não é uma membrana inerte (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992; BARRY, 1983).

Na queratina, as cadeias de polipeptídeos estão arranjadas em uma estrutura helicoidal denominada α -hélice. As α -hélices têm estrutura estabilizada por ligações de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio ligados ao nitrogênio da ligação peptídica e o átomo de oxigênio do grupo carbonila do quarto aminoácido no terminal amínico da ligação peptídica. Todas as ligações peptídicas na α -hélice, exceto as terminais, participam destas ligações de hidrogênio. Cada volta da α -hélice é ligada às voltas adjacentes por três a quatro ligações de hidrogênio. As ligações de hidrogênio combinadas fornecem à estrutura helicoidal considerável estabilidade (NELSON & COX, 2000).

A α -queratina, por possuir estrutura de cadeias polipeptídicas na forma de fios, é denominada proteína fibrosa onde as cadeias de polipeptídeos em α -hélice estão unidas por pontes de dissulfeto. Esta organização estrutural relaciona-se às funções desempenhadas pelas queratinas em mamíferos, envolvendo sustentação, forma e proteção externa e conferindo força e flexibilidade às estruturas da qual fazem parte. A α -queratina é insolúvel em água devido à elevada concentração de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos no interior e na superfície da estrutura. A queratina pode assumir uma segunda organização estrutural, formando uma estrutura plana denominada conformação β ou folha β . Nesta conformação, as cadeias polipeptídicas estão mais estendidas e organizadas em ziguezague e não na forma helicoidal da α -hélice. Neste arranjo, as ligações de hidrogênio são formadas entre segmentos adjacentes de cadeias polipeptídicas (NELSON & COX, 2000).

O *stratum corneum* constitui uma barreira importante para a difusão de produtos aplicados sobre a pele. É normalmente a camada mais difícil para a penetração de moléculas de fármacos, sendo a etapa limitante para o processo de absorção percutânea (SCHEUPLEIN & BLANK, 1971; DENNIS, 1990; LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992).

O *stratum corneum* tem em média de 14 a 27 células de espessura, cada célula tendo cerca de 0,5 μm de espessura e 30-40 μm de diâmetro. A espessura total média desta camada é de 6 a 15 μm , exceto nas regiões da palma das mãos e planta dos pés, onde é muito mais espessa (DENNIS, 1990).

Estudos mostraram que a renovação do *stratum corneum* em indivíduos adultos ocorre a cada duas semanas (CHIEN, 1992).

Os corneócitos são circundados por um envelope protéico, formado nos últimos estágios da diferenciação, quando substitui a membrana citoplasmática, e é recoberto por uma matriz lipídica que possui natureza química e organização estrutural singular formada por bicamadas lamelares mantidas em estado de cristal líquido (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992; ARNIK, SIMON e STEVEN, 1998; FRIEBERG, MA e RHEIN, 1991).

O *stratum corneum* é semelhante a um sistema de três compartimentos, compreendidos pelos espaços intracelulares queratinizados, os complexos de membranas e os espaços intracelulares. As funções associadas a estes compartimentos conferem ao *stratum corneum* sua resistência, sua coesão e uma função reguladora das trocas com o meio ambiente (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992).

No interior dos corneócitos, os filamentos de queratina, ricos em resíduos de cisteína, substituem as organelas habituais. No decorrer do processo de diferenciação da epiderme um outro tipo de proteína, a filagrina, se integra a esta matriz fibrosa, favorecendo a sua agregação e se decompõem em seguida em aminoácidos livres. A estrutura fibrosa formada confere resistência mecânica à camada córnea, acentuada pelos envelopes celulares modificados (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992).

O processo de diferenciação da epiderme envolve também alterações na membrana dos corneócitos. Os fosfolipídios e o colesterol desaparecem e aparece uma espécie de ceramida, ligada ao envelope protéico, e também estão presentes glicoproteínas (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992).

A matriz lipídica representa cerca de 10% do peso total do *stratum corneum*. Compõe-se em grande parte por lipídeos neutros como as triglicérides, ácidos graxos livres, colesterol e seus diésteres. Os lipídeos polares completam a composição com os esfingolipídios, as ceramidas e o sulfato de colesterol (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992). A tabela 1 mostra a composição lipídica do *stratum corneum* humano.

Tabela 1. Composição lipídica do *stratum corneum* humano (LÉVÉQUE *et al.* ,1992)

Lipídeo		% em peso
Lipídeos polares		4,9 ± 1,6
Sulfato de colesterol		1,5 ± 0,2
Lipídeos neutros totais	Esteróis livres	14,0 ± 1,1
	Ácidos graxos livres	19,3 ± 3,7
	Triglicerídeos	25,2 ± 4,6
	Ceras	5,4 ± 0,9
	Esqualenos	4,8 ± 2,0
	Alcanos	6,1 ± 2,6
Esfingolipídios (Ceramidas)		18,1 ± 2,8
Total		99,3

A composição lipídica da pele pode ser manipulada experimentalmente através da deslipidização tópica com solventes ou sistemicamente pela manipulação da dieta; em roedores com uma dieta deficiente em ácidos graxos essenciais, a eficiência da função barreira está reduzida (RIVIERE, 1993).

Os lipídeos intercelulares provêm de pequenos grânulos citoplasmáticos, os MCG (“membranes coating granules”) que lançam seu conteúdo nos espaços

entre os corneócitos. O conteúdo destes grânulos é formado por açúcares sob a forma de glicosfingolipídeos e de glicoproteínas, esteróis livres, fosfolipídios e enzimas hidrolíticas (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992).

Os lipídeos estão organizados nos espaços intercelulares sob a forma de bicamadas, conforme mostraram estudos por microscopia eletrônica e por criofratura. É atualmente aceito que as bicamadas lipídicas sejam responsáveis pela função barreira do *stratum corneum*. A capacidade dos esfingolipídios de formarem um arranjo lamelar ao longo de suas cadeias carbônicas evidencia a importante função das ceramidas como reguladoras da permeabilidade cutânea. No arranjo lamelar, os lipídeos estão organizados com as cadeias carbônicas voltadas umas para as outras e com os grupos polares dissolvidos na fase aquosa (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992).

Figura 1. Esquema de sugestão para a organização dos lipídeos no *stratum corneum*. (FRIEBERG *et al.*, 1991)

O *stratum corneum* é recoberto por uma fina camada de sebo, produto da secreção das glândulas sebáceas. O sebo é produzido em maior quantidade na face e em menor quantidade na região do tronco e extremidades do corpo. A atividade de produção de sebo pelas glândulas sebáceas é estimulada por

hormônios androgênicos. Mudanças de estação e as alterações climáticas também afetam a produção sebácea e o conteúdo dos lipídeos superficiais (CHIEN, 1992).

O *stratum corneum* “*in vivo*” está sempre parcialmente hidratado e é necessário um conteúdo mínimo de 10% p/p para a manutenção da flexibilidade e da maciez (CHIEN, 1992; SCHEUPLEIN & BLANK, 1971). A quantidade de água presente varia com a umidade relativa do ambiente. As células próximas às camadas mais internas da epiderme viável apresentam um conteúdo maior de água e, desde que a umidade relativa do ambiente seja inferior a 100%, a água é continuamente transferida para as camadas mais externas. Em condições normais existe conseqüentemente um gradiente de concentração de água dentro do *stratum corneum* (SCHEUPLEIN & BLANK, 1971).

No *stratum corneum* normal, o conteúdo aproximado de água é de 20% (p/p) e no *stratum germinativum*, tecido fisiologicamente ativo, o nível é de 70% (p/p) (CHIEN, 1992).

Em condições “*in vitro*”, o *stratum corneum* não é imediatamente hidratado pela imersão em água. Embora possa ser observada a maceração em alguns minutos, o processo de dilatação continua por 3 d. O tecido pode absorver 5 a 6 vezes o seu peso quando totalmente hidratado e a água presente está fortemente ligada à queratina intracelular (SCHEUPLEIN & BLANK, 1971).

Muitas das propriedades físicas do *stratum corneum* são altamente dependentes de seu teor de hidratação. Quando seco, o *stratum corneum* é um isolante elétrico e térmico relativamente opaco à luz e pouco deformável por ser quebradiço. Quando hidratado, ao contrário, é um condutor térmico e elétrico, permite a passagem da luz e quase dobra o seu comprimento sem se romper (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992).

3.1.2. Derme

A espessura da derme está entre 3 a 5 mm sendo muito superior à da epiderme. Esta camada, que forma o “corpo” da pele, é composta essencialmente por uma matriz de tecido conectivo formado por proteínas fibrosas envolvidas por uma substância amorfa composta por mucopolissacarídeos. A composição aproximada das proteínas fibrosas é: colágeno 75%, elatina 4% e reticulina 0,4%. Passam através desta matriz vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos. Aí estão também localizados os apêndices cutâneos: glândulas sudoríparas e unidades pilo-sebáceas (BARRY, 1983).

A derme necessita de suprimento sanguíneo abundante que regula a temperatura e a pressão, transporta nutrientes e remove metabólitos, contribuindo também para a coloração da pele. O suprimento sanguíneo chega até a 0,2 mm da superfície da pele, absorvendo e diluindo sistemicamente a maioria dos agentes químicos que penetram no *stratum corneum* e na epiderme viável. Este vigoroso suprimento sanguíneo funciona como um sistema de drenagem (“sink”) em relação à difusão de moléculas que atingem a corrente sanguínea durante o processo de absorção percutânea. Esta condição assegura que a concentração de substância permeante na derme permaneça próxima a zero e, portanto o gradiente de concentração através da epiderme seja máximo. Como o gradiente de concentração fornece força para que a difusão ocorra, um suprimento abundante de sangue auxilia a absorção percutânea (BARRY, 1983).

O sistema linfático também forma uma rede capilar cuja principal função é a remoção de proteínas plasmáticas dos espaços extracelulares. A derme tem também nervos e terminações nervosas que juntamente com os capilares, transmitem sensação de dor, prurido, toque e temperatura (BARRY, 1983).

3.1.3 Tecido subcutâneo

O tecido subcutâneo, também denominado hipoderme ou sub-cutis, se espalha por todo o corpo como uma camada fibrogordurosa, com exceção das pálpebras e da região genital masculina. A espessura desta camada varia com a idade, o sexo e com o estado hormonal e nutricional do indivíduo. As células deste tecido produzem e armazenam gordura em grandes quantidades e feixes de fibras de colágeno se estendem entre agregados de células gordurosas formando uma interface flexível entre as estruturas internas e as camadas superficiais da pele. Esta camada atua como uma barreira térmica e fornece amortecimento mecânico. É o local de síntese e armazenamento de compostos energéticos facilmente disponíveis (BARRY, 1983).

3.2. Aspectos gerais da absorção cutânea

3.2.1. Importância dos sistemas transdérmicos

Os sistemas transdérmicos são atualmente formas bem aceitas de administração de vários fármacos para a via sistêmica e são utilizados para o tratamento de vertigens, hipertensão, angina, menopausa, estados severos de dor, dependência de nicotina e hipogonadotrofismo masculino. Nem todos os fármacos porém são adequados para a veiculação através de sistemas transdérmicos. Os fármacos candidatos para este uso devem ter potência adequada para fornecer uma dose sistêmica em concentração igual ou inferior a 20mg; o peso molecular deve ser inferior a 500 Dalton; o ponto de fusão deve ser inferior a 200°C; devem possuir em sua molécula grupos para a formação de ligações de hidrogênio em número igual ou inferior a dois; não devem provocar irritação na pele e não devem estimular a ocorrência de reação imunológica (FINNIN & MORGAN, 1999).

Os sistemas transdérmicos liberam o fármaco para a superfície da pele de forma controlada e a taxa de liberação é inferior ao máximo de concentração aceito pela pele de forma que é o dispositivo transdérmico e não o *stratum corneum* que controla a taxa de difusão através da pele para a circulação. (BARRY, 1983; FINNIN & MORGAN, 1999).

São vantagens da administração transdérmica de fármacos :

- Proporciona nível plasmático constante para fármacos com janela terapêutica estreita, ou seja, fármacos com dose terapêutica próxima à dose tóxica, minimizando o risco de efeitos colaterais e falta de eficácia. A administração controlada do fármaco pode eliminar picos na circulação, que causam efeitos colaterais indesejáveis.
- Evita a etapa inicial de metabolização no trato gastro-intestinal e fígado, possibilitando que fármacos com baixa biodisponibilidade e/ou curta meia vida biológica sejam administrados em quantidades adequadas, em uma dose diária, resultando na melhor adaptação do paciente à terapia, sem a necessidade de ingestão segundo prescrição.
- Evita problemas decorrentes do ambiente gastro-intestinal tais como degradação química ou irritação gástrica, ingestão simultânea de alimentos e motilidade intestinal.
- A interrupção da administração é facilitada bastando à retirada do sistema transdérmico da superfície da pele.
- Proporciona alternativa não invasiva a injetáveis parenterais, subcutâneos ou intramusculares.
- Forma de administração adequada para pacientes inconscientes ou com problemas de vômito.

3.2.2. Fundamentos da absorção cutânea

As leis da física para a difusão passiva podem ser aplicadas aos processos de permeabilidade da pele e auxiliar na sua descrição (SCHEUPLEIN & BLANK, 1971).

A difusão é um pré-requisito para a ocorrência de absorção de substâncias pela pele e é necessária para que o processo de penetração através das camadas mais internas da pele possa ocorrer. Na ausência da difusão a substância permanece adsorvida na superfície da pele através de interações específicas com certos sítios do *stratum corneum* (BARRY, 1983).

Segundo alguns autores, o *stratum corneum* atua como um meio de difusão passiva e nenhum processo ativo de transporte foram demonstrados (SCHEUPLEIN & BLANK, 1971; BARRY, 1983).

O *stratum corneum* é a principal barreira à penetração de moléculas de fármacos e representa a etapa limitante para os processos de difusão (SCHEUPLEIN & BLANK, 1971; DENNIS, 1990; LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992; MOGHIMI, WILLIAMS e BARRY, 1996 (a)).

Na difusão passiva, uma substância se movimenta através de uma membrana, de uma região para a outra no interior de um sistema, obedecendo a um gradiente de concentração e seguindo um movimento molecular randômico. (BARRY, 1983; MARTIN, 1993).

O processo de difusão molecular de acordo com um gradiente de concentração é termodinamicamente espontâneo e irreversível (BARRY, 1983).

A descrição matemática para os processos de difusão através de membranas é conhecida como Lei de Fick (RIEGER, 1993).

A Lei de Fick postula que o fluxo (J) de um soluto através de uma membrana é proporcional à diferença de concentração da substância entre os dois lados da membrana e inversamente proporcional à espessura da membrana (H):

$$J = \frac{dc}{dH} \quad \text{Equação 1}$$

A constante de proporcionalidade é definida como o coeficiente de permeabilidade e inclui o coeficiente de difusão do soluto através da membrana (D) e o coeficiente de partição membrana/solvente (K_m), podendo a Lei de Fick ser escrita como:

$$J = \frac{K_m D \Delta C}{H} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

J = fluxo ou velocidade de permeação

D = coeficiente de difusão do soluto na membrana

ΔC = variação da concentração do soluto nos dois lados da membrana

K_m = coeficiente de partição membrana/soluto

(MARTIN, 1993; RIEGER, 1993; BARRY, 1983; MOGHIMI, WILLIAMS e BARRY, 1996 (b); SCHEUPLEIN & BLANK, 1971).

Uma condição importante no processo de difusão é o estado de equilíbrio ou “*steady state*”. O equilíbrio não ocorre desde o início do processo de difusão. A curva de fluxo (J) em função do tempo é convexa no sentido do eixo do tempo nos estágios iniciais do processo e depois torna-se linear. Os estágios iniciais representam uma condição de não-equilíbrio. Posteriormente, a taxa de difusão

torna-se constante, a curva é essencialmente linear e o sistema está em equilíbrio (MARTIN, 1993).

A existência desta correlação linear entre o fluxo J e o tempo no equilíbrio (“steady state”) já foi estabelecida “*in vivo*” e “*in vitro*” pela passagem de fármacos através de *stratum corneum* isolado, de epiderme e de pele total. Nestes tipos de experimentos, o receptor que pode ser um líquido artificialmente constituído ou um fluído corporal, deve manter uma concentração do fármaco permeante constantemente baixa (“sink condition”) (RIEGER, 1993).

Quando a porção linear da curva de fluxo em função do tempo é extrapolada para o eixo do tempo (eixo x), o ponto de intersecção é conhecido como “lag time” (L), representa o tempo necessário para que o fármaco estabeleça um gradiente de concentração uniforme na membrana (MARTIN, 1993).

A expressão matemática para o “lag time” (L) é (MOGHIMI, WILLIAMS e BARRY, 1996a).

$$L = \frac{H^2}{6 D} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

L = “lag time”

H = espessura da membrana

D = coeficiente de difusão do soluto na membrana

No “steady state” é possível assumir que a concentração do permeante é nula na interface receptora (“sink condition”) e que a concentração na face doadora da membrana é invariável (dose infinita) e igual à concentração presente no veículo. Nestas condições pode-se substituir ΔC na equação 2 por C_v

(concentração do soluto no veículo) (MARTIN, 1993; RIEGER, 1993; MOGHIMI, WILLIAMS e BARRY, 1996(a); SCHEUPLEIN & BLANK, 1971).

$$J = \frac{K_m D C_v}{H} \quad \text{Equação 4}$$

O fluxo J representa a massa do soluto que passa por unidade de área da membrana por unidade de tempo e sua dimensão é moles/ cm² s. O coeficiente de difusão da membrana para um soluto (D) é expresso em cm²/s. A concentração do soluto no veículo (Cv) é expresso em moles/cm³ (SCHEUPLEIN & BLANK, 1971; RIEGER,1993).

O processo de difusão de um fármaco aplicado topicamente só é possível se a molécula do fármaco migrar do veículo (ou solvente) para a pele, sendo necessária à existência de alguma afinidade entre o fármaco e o *stratum corneum* (RIEGER,1993).

3.3. Rotas de permeação de fármacos através da pele

As características morfológicas da pele compõem o ambiente com o qual as substâncias aplicadas topicamente podem interagir (ZATZ,1993).

Quando uma molécula entra em contato com a superfície da pele, existem três rotas potenciais para a entrada nas camadas mais internas. As rotas possíveis são via folículos pilosos e glândulas sudoríparas ou via *stratum corneum* contínuo (BARRY,1983; ZATZ,1993).

Na rota através do *stratum corneum* contínuo, por sua vez, existem duas alternativas para a penetração da barreira cutânea, que são as rotas intercelulares, através apenas da fase lipídica intercelular e a rota transcelular, que envolve passagens alternadas através das proteínas celulares e dos lipídeos

intercelulares (MOGHIMI *et al.*,1996; ZATZ,1993; BARRY,2001; ELIAS *et al.*,1981)

Figura 2. Rotas intercelular e transcelular através do *stratum corneum* (MOGHIMI *et al.*,1996)

3.3.1. Permeação através dos apêndices cutâneos

A rota de permeação de substâncias através dos folículos pilo-sebáceos e ductos das glândulas sudoríparas são denominados “shunts”. Esta via evita o contato das substâncias com o *stratum corneum*, que é a principal barreira à permeação. As células nas paredes destes apêndices não apresentam o mesmo aspecto das células normais do *stratum corneum*; também parecem não conter os lipídeos intercelulares necessários para a formação de uma barreira eficiente. Os “shunts” representam, porém uma fração muito pequena da área superficial total da pele – cerca de 0,1%. Desta forma, mesmo que a permeação através dos apêndices seja comparativamente mais rápida do que pelo *stratum corneum* contínuo, é esta última via a principal rota para a permeação da maioria das substâncias (BARRY,2001; ZATZ, 1993).

Uma densa rede capilar circunda a base destes apêndices e muitas moléculas podem ser imediatamente absorvidas pela circulação sistêmica ao atingirem esta região (BARRY,1983).

Esta rota de permeação pode ser importante para íons e moléculas polares grandes, de difícil passagem através do *stratum corneum* intacto. Podem também representar rotas importantes nos estágios iniciais do processo de permeação antes que o estado de equilíbrio de difusão seja atingido. Polímeros e partículas coloidais podem ter permeação preferencialmente por esta via (BARRY,2001).

Íons e moléculas grandes podem se ligar à queratina hidratada do *stratum corneum*, retardando a movimentação. O pequeno coeficiente de difusão pelo *stratum corneum* resultante pode assegurar que a permeação seja mais favorável pelos apêndices, apesar da pequena área representada por esta rota. Doenças que afetam o *stratum corneum* como o eczema e a dermatite esfoliativa, danificam a camada córnea e podem formar “*shunts*” artificiais, permitindo a penetração rápida de substâncias (BARRY, 1983).

3.3.2. Permeação através do *stratum corneum* contínuo

O *stratum corneum* é formado por uma estrutura análoga a uma parede de tijolos, na qual os corneócitos ricos em queratina hidratada estão envolvidos por uma matriz intercelular lipídica, organizada na forma de bicamadas e composta por ceramidas, ácidos graxos, colesterol e ésteres de colesterol. Estas bicamadas formam regiões com estruturas na forma de gel, cristal líquido e semicristalino (BARRY,2001; ELIAS *et al.*,1981).

Existem duas rotas possíveis para a permeação de substâncias através do *stratum corneum*, que são a rota intercelular, atravessando a matriz lipídica e a rota transcelular, passando pelas camadas de células e matriz lipídica de forma alternada (BARRY,2002; MOGHIMI *et al.*,1996).

Neste sistema de dois compartimentos a única fase contínua é a região lipídica intercelular (MOGHIMI *et al.*,1996).

Inicialmente os espaços intercelulares foram considerados apenas como uma pequena porção do volume total do *stratum corneum* e por consequência de

pouca importância como rota de permeação. Após a realização de estudos por técnicas de criofratura e por microscopia eletrônica, que permitem avaliações histológicas pouco destrutivas, foi observado que o volume intercelular pode ser de 3 a 7 vezes maior do que o estimado (BARRY,2001 ;MOGHIMI *et al.*,1996).

Acredita-se que o volume da região intercelular corresponde a valores entre 5 a 30% do volume total do *stratum corneum*. Esta rota é mais longa do que a simples espessura do *stratum corneum* (BARRY,1983). Para os solutos que são mais solúveis nos lipídeos intercelulares do que na fase matriz protéica dos corneócitos, a rota de permeação preferencial é a intercelular (BARRY,1983; MOGHIMI *et al.*,1996).

A nível molecular, dados de solubilidade e de permeabilidade indicam que solutos polares e não polares se difundem através do *stratum corneum* por diferentes mecanismos. Os solutos hidrossolúveis apresentam coeficiente de partição com a membrana de *stratum corneum* próximo de 1, sugerindo a ocorrência de dissolução nas regiões da queratina hidratada (região polar). As moléculas lipossolúveis não polares tendem a se dissolver e se difundir nas regiões lipídicas intercelulares (região apolar). O soluto sofre processo de partilha entre as regiões polar e apolar do *stratum corneum* durante o processo de permeação e então se difundem de forma independente (BARRY,1983).

Uma característica comum para a permeação tanto pela rota polar quanto pela apolar é a existência de forte interação do soluto com o tecido (*stratum corneum*); o *stratum corneum* possui uma estrutura semi-sólida e a difusão em seu interior é muito mais difícil para qualquer soluto do que seria em solução aquosa. (BARRY,1983)

3.4. Fatores que interferem na absorção

O efeito farmacológico produzido por uma forma de farmacêutica aplicada topicamente ocorre após uma sequência complexa de processos envolvendo a liberação do fármaco do veículo, a penetração na ou através da pele e a ativação

da resposta farmacológica desejada. Fatores relacionados ao fármaco, ao veículo, à pele e ao próprio estado patológico podem exercer efeitos sobre o processo de absorção cutânea. Estes fatores podem ser de natureza biológica ou físico-química (BARRY,1983).

3.4.1. Fatores de natureza biológica

3.4.1.1. Integridade do *stratum corneum*

A importância da integridade do *stratum corneum* na função barreira da pele já foi demonstrada amplamente através de estudos “*in vivo*” e “*in vitro*”. A integridade da pele é um dos principais fatores que influenciam na permeação de substâncias (RIVIERE, 1993; LANGER & WISE,1984; IDSON,1975).

Agentes químicos como álcalis e ácidos podem exercer efeito corrosivo e denaturar as proteínas do *stratum corneum*, aumentando sua permeabilidade (LANGER & WISE,1984; BARRY,1983).

Solventes exercem efeitos variados sobre a permeabilidade da pele. Alguns exercem um efeito acentuado enquanto outros, um efeito mais moderado. Misturas de solvente polar-apolar provocam a remoção de grande parte dos lipídeos intercelulares, importantes na estrutura da barreira cutânea, levando à abertura de canais ou “shunts” artificiais no *stratum corneum* e aumentando a permeabilidade. Na pele delipidizada, as substâncias hidrofílicas têm sua absorção aumentada (IDSON, 1975, RIVIERE, 1993).

As alterações que ocorrem na pele em consequência de doenças são provavelmente a causa mais freqüente de alterações da integridade do *stratum corneum*. Em geral, a permeabilidade da pele está aumentada nas regiões afetadas por doenças relacionadas à alteração da formação do *stratum corneum*, como é o caso da psoríase (BARRY, 1983).

A remoção mecânica do *stratum corneum* com fita adesiva é uma técnica experimental utilizada para provocar danos a camada córnea. Este procedimento é conhecido como “tape stripping” e pode levar à remoção do *stratum corneum* quando repetido sucessivamente, provocando o aumento da evaporação de água da pele, aumentando a permeabilidade do tecido à praticamente todas as substâncias (IDSON, 1975).

3.4.1.2. Idade do Indivíduo

A relação existente entre a idade do indivíduo e a permeabilidade da pele ainda não está completamente esclarecida. Existem dados que indicam que as mudanças estruturais observadas na pele de indivíduos idosos podem contribuir para o aumento da permeabilidade (LANGER & WISE, 1984).

A função barreira da pele de recém-nascidos prematuros ainda não está totalmente formada e é mais permeável (RIVIERE, 1993).

A pele de crianças, normal ou inflamada, parece ser mais permeável do que a pele de adultos, considerando áreas equivalentes (BARRY, 1983).

3.4.1.3. Sítios Regionais

As variações de espessura do *stratum corneum*, bem como a sua estrutura estão associadas a diferenças de permeabilidade em diferentes regiões do corpo. Os dados disponíveis na literatura referentes à espessura da epiderme são conflitantes. As variações biológicas entre indivíduos são um fator complicador para este tipo de avaliação, uma vez que o dado sobre a permeabilidade de uma substância específica, em sítios regionais idênticos, varia amplamente entre indivíduos saudáveis (BARRY, 1983; IDSON, 1975).

Dependendo da natureza do experimento e do fármaco utilizados vários pesquisadores chegaram a escalas diferentes de permeabilidade para diferentes sítios da pele. Um dos trabalhos mais clássicos sobre o assunto organiza os diferentes sítios regionais, em ordem decrescente e considerando a difusibilidade de moléculas pequenas, na seguinte ordem: planta dos pés, palma das mãos, dorso das mãos, região escrotal e pós-auricular, axilas e couro cabeludo, braços, pernas e tronco (IDSON, 1975; LANGER & WISE, 1984; ELIAS, *et al.*, 1981).

3.4.1.4. Metabolismo Cutâneo

A biotransformação de compostos absorvidos pela via tópica pode gerar metabólitos ativos ou compostos inativos, podendo afetar a eficácia terapêutica de formas farmacêuticas (BARRY, 1983).

A oxidação, a redução, a hidrólise e a conjugação são processos que podem afetar o transporte de fármacos através da pele. (MARTIN, 1993)

O metabolismo cutâneo durante o transporte através da pele pode produzir diferenças significativas entre os resultados “*in vivo*” e “*in vitro*”. As estearases e outras enzimas presentes na pele podem ser úteis na administração de pró-fármacos. Os pró-fármacos, que podem ter a solubilidade e a absorção aumentadas, podem ser metabolizados por enzimas fornecendo o fármaco ativo na pele (MARTIN, 1993).

3.4.1.5. Efeito da Circulação Sanguínea

Alterações na circulação periférica ou no fluxo sanguíneo através da derme podem afetar a absorção cutânea. O efeito do aumento do fluxo sanguíneo, porém, tem influência apenas na absorção de substâncias com penetração muito rápida através da pele, como é o caso dos gases, quando a etapa limitante da

absorção passa a ser a captura da substância absorvida pela microcirculação e não mais a passagem pelo *stratum corneum*. Nas outras situações que não envolvam a absorção de gases, a etapa limitante permanece localizada no *stratum corneum* e não há influência da circulação sanguínea (IDSON,1975; RIVIERE, 1993).

3.4.1.6. Hidratação do *stratum corneum*

A hidratação do *stratum corneum* está entre os fatores de maior importância na permeação cutânea, favorecendo o aumento da passagem de praticamente todas as substâncias através da pele (IDSON,1975).

O conteúdo de água da camada mais interna do *stratum corneum* “*in vivo*” próximo ao da epiderme viável e diminui ao longo da camada córnea até a superfície, onde é controlado pela umidade relativa do ambiente (RIEGER, 1993).

A água presente na pele é resultante da difusão das camadas internas da epiderme ou do acúmulo de água proveniente da transpiração, com resultado de oclusão por veículo oleoso ou cobertura da superfície. A oclusão previne a evaporação da água da superfície, resultando na hidratação. Sob condição de oclusão, o conteúdo de água do *stratum corneum* varia da faixa normalmente presente de 5-15% para valores de até 50%. Em condições de hidratação elevada, ocorrem alterações físicas no tecido e também alterações no coeficiente de difusão (IDSON,1975).

Embora a hidratação moderada resultante de oclusão favoreça a permeação através da pele, a adsorção excessiva ou prolongada de água causa a maceração do tecido, que é apenas parcialmente reversível (RIEGER, 1993).

A hidratação do *stratum corneum* aumenta a absorção da maioria (mas não de todas) as substâncias: a água abre a compacta estrutura do *stratum corneum* (BARRY,2001).

3.4.1.7. Variação entre as Espécies

Para a realização de estudos de permeação cutânea “*in vitro*”, a membrana de escolha é preferencialmente o *stratum corneum* humano, obtido em geral de cirurgias ou de autópsias. Porém, quando este material não está disponível, lança-se mão de modelos animais. Nestes casos é importante considerar a existência de diferenças estruturais entre as espécies, tais como a espessura do *stratum corneum*, a densidade e o diâmetro dos folículos pilosos, além de diferenças na composição lipídica e no metabolismo cutâneo, que afetam a rota e a resistência à penetração cutânea. A diferença existente entre a permeabilidade da pele humana e pele animal pode ser bastante significativa e depende em grande parte do permeante de escolha (LANGER & WISE, 1984; IDSON, 1975). A tabela 2 apresenta dados comparativos entre a pele humana e a pele de diferentes animais.

Tabela 2. Comparação entre pele humana e pele de animais (LANGER & WISE ,1984)

<i>Tipo de pele</i>	<i>Stratum corneum (μm)</i>	<i>Epiderme (μm)</i>	<i>Pele total (μm)</i>	<i>Região da pele</i>	<i>Folículos pilosos (por cm²)</i>	<i>Diâmetro dos folículos (μm)</i>
Humana	16,8±0,7	46,9 ± 2,3	2,97± 0,28	abdômen	11 ± 1	97 ± 3
Porco	26,4 ± 0,4	65,8 ± 1,8	3,43 ± 0,05	dorso	11 ± 1	177 ± 4
Rato	18,4 ± 0,5	32,1 ± 1,3	2,09 ± 0,07	dorso	289 ± 21	25 ± 1
Camundongo sem pelo	8,9 ± 0,4	28,6 ± 0,9	0,70 ± 0,02	dorso	658 ± 38	26 ± 1
camundongo	5,8 ± 0,3	12,6 ± 0,8	0,84 ± 0,02	dorso	75 ± 6	46 ± 1

3.4.2. Fatores de natureza físico-química

As propriedades moleculares do fármaco, a natureza do veículo, a forma de interação entre eles e com a pele estão entre os principais fatores físico-químicos que controlam a difusão através da pele (BARRY,1983).

3.4.2.1.Fatores relacionados ao fármaco

a- Solubilidade no veículo:

As características de solubilidade de uma substância influenciam fortemente sua habilidade de penetrar através de membranas biológicas (IDSON,1975).

A concentração do fármaco no veículo é importante, uma vez que a taxa de penetração ou fluxo é proporcional à concentração, de acordo com a Lei de Fick (MARTIN, 1993).

O fluxo máximo de soluto através da membrana é obtido na presença de solução saturada do soluto na fase doadora. A seleção do solvente ou do sistema solvente deve favorecer a obtenção de soluções saturadas de soluto, porém um efeito solubilizante muito intenso do veículo pode atuar negativamente sobre o coeficiente de partição do fármaco entre veículo e pele. O coeficiente de partição veículo-pele diminui com o aumento da solubilidade do fármaco no veículo (BARRY,1983; MARTIN, 1993).

A solubilidade do fármaco pode ser alterada por mudanças no pH, pela formação de complexos ou pela presença de agentes tensoativos no veículo. Estes fatores podem também modificar o coeficiente de partição veículo-pele do fármaco, afetando o processo de difusão (BARRY,1983).

A natureza não polar do *stratum corneum* sugere que compostos iônicos encontrem maior resistência à permeação. Variações do pH do veículo alteraram o grau de dissociação de fármacos ionizáveis, dependendo do pH ácido ou pH básico. Como apenas a forma não ionizada de moléculas atravessam membranas lipídicas em quantidades significativas, o pH determina a proporção de fração não-ionizada presente, que é responsável pelo gradiente de concentração (MARTIN,1993; RIVIERE, 1993; CHIEN,1992).

A ocorrência de micelização do fármaco ou de tensoativos presentes no veículo exerce influência no processo de permeação. As micelas, que são partículas coloidais em equilíbrio dinâmico com monômeros não associados, podem ser formadas em duas situações. A primeira, quando o próprio composto em difusão tem propriedades tensoativas e a segunda quando as micelas são formadas por um agente tensoativo presente no veículo. As micelas não permeiam o *stratum corneum* e quando são formadas pelo próprio fármaco, as concentrações de monômero livres permanece constante, assim como o coeficiente de partição. Os agregados micelares neste caso atuam apenas como reservatórios de monômero livre. A situação mais comum, porém, ocorre quando um tensoativo e um fármaco estão presentes simultaneamente, levando a interações mais complexas. A presença do tensoativo pode aumentar ou diminuir a solubilidade do fármaco em uma formulação. O fármaco presente sofre partição entre as pseudofases micelar e não-micelar; este coeficiente de partição é adicional ao coeficiente de partição do fármaco não micelar- *stratum corneum*. A porção micelar do fármaco não está disponível para o processo de absorção e o fluxo neste caso, está reduzido. Quando os tensoativos estão presentes apenas na forma monomérica, pode haver aumento da absorção de alguns fármacos, possivelmente como consequência da redução da tensão superficial entre a membrana e a solução aquosa. Outros efeitos podem ser a facilitação do intumescimento do *stratum corneum* com aumento da difusão e o aumento da adsorção do fármaco sobre o *stratum corneum*. (BARRY,1993).

A formação de complexos pelo fármaco exerce efeito análogo ao das micelas sobre a absorção, nos casos onde o complexo formado é instável e não

sofre a absorção. Porém, quando o complexo formado é estável e se difunde através da membrana, sendo tanto a forma livre quanto a complexada absorvidas, existem então dois caminhos paralelos para o transporte (BARRY,1993).

b. Coeficiente de partição veículo-pele:

O coeficiente de partição mede a afinidade relativa do fármaco pelo *stratum corneum* e pelo veículo (MARTIN, 1993). Representa a característica mais importante referente ao fármaco que influencia a permeação e a distribuição através da pele e depende das propriedades solventes do veículo. O coeficiente de partição adequado pode ser obtido alterando a afinidade do fármaco pelo veículo (ZATZ,1993).

Em situações onde a membrana representa a principal resistência à difusão, como é o caso dos processos de absorção percutânea, o coeficiente de partição do fármaco entre veículo-*stratum corneum* é de fundamental importância no estabelecimento de concentrações iniciais adequadas do fármaco na camada mais externa da membrana. Se a afinidade do fármaco pelo veículo é muito grande, o coeficiente de partição com o *stratum corneum* é reduzido e a liberação do fármaco do veículo pode ser a etapa limitante do processo de absorção (BARRY,1993)

O coeficiente de partição deve ser balanceado, pois quando muito elevado, pode inibir o *clearance* pela epiderme viável. Nos casos em que o fármaco permeante não possui um coeficiente de partição adequado (geralmente o K_m é muito baixo), um pró-fármaco pode ter suas características de partição adequadas para a penetração inicial no *stratum corneum*. Após a permeação até a epiderme viável, enzimas ativam o pró-fármaco, liberando o fármaco ativo (BARRY,2001).

Muitos processos estão envolvidos na entrada de um composto no *stratum corneum*. O composto pode ser mais solúvel em um ou mais constituintes do *stratum corneum* do que no veículo. O veículo pode volatilizar, deixando um resíduo do composto, que lentamente se “dissolve” no *stratum corneum*. O veículo ou um de seus constituintes (ex: promotores de permeação) podem também penetrar no *stratum corneum* e atravessar esta camada acoplado ao composto ou

sozinho atingindo a epiderme viável. A ligação ao *stratum corneum* deve ser pelo menos parcialmente reversível, caso contrário o composto que permeia estará provavelmente ligado de forma covalente e haverá a necessidade de saturação de todos os sítios de ligação ao *stratum corneum* antes da molécula se difundir para as camadas mais internas, refletindo em um aumento do “lag time” (RIEGER, 1993).

c) Tamanho Molecular:

Sendo o *stratum corneum* uma membrana compacta e sendo o caminho de difusão a ser percorrido pelas moléculas durante a permeação, tortuoso, parece óbvio que o coeficiente de difusão deve ter uma relação inversa com o peso molecular ou com outras medidas de tamanho molecular. Porém, o efeito específico exercido pela forma e tamanho molecular sobre a absorção ainda requer estudos (ZATZ, 1993; IDSON, 1975).

Pequenas moléculas penetram o *stratum corneum* mais rapidamente do que moléculas de maior peso molecular, porém em uma faixa relativamente pequena de tamanhos moleculares, a correlação entre peso molecular e fluxo é pequena. As constantes de difusão através do *stratum corneum* hidratado são praticamente as mesmas para muitas moléculas de baixo peso molecular. (IDSON, 1975).

A massa molecular ideal deve ser preferencialmente menor que 600 Da quando o coeficiente de difusão tende a ser elevado (BARRY, 2001).

d) Coeficiente de difusão:

O fluxo através do *stratum corneum* não é afetado apenas pela solubilidade do fármaco na membrana, mas também pela facilidade com a qual ele se difunde (IDSON, 1975).

O coeficiente de difusão representa a resistência da molécula de fármaco de se movimentar através do veículo e da pele. A magnitude relativa dos dois coeficientes determina se a etapa limitante do processo de absorção é a liberação do veículo ou a passagem através do *stratum corneum*. O coeficiente de difusão

da pele pode ser afetado por componentes do veículo, em especial por solventes e tensoativos (BARRY, 1983; MARTIN, 1993).

3.4.2.2. Interações do fármaco com a pele

A pele pode atuar como um reservatório para alguns fármacos que possuem a capacidade de se ligar de forma reversível a macromoléculas. A fração do fármaco ligada não é capaz de se difundir e a ligação retarda o fluxo inicial das moléculas, resultando em maiores “lag times” (MARTIN, 1993).

A fração ligada está protegida da bio-transformação e é farmacologicamente inativa. Sendo a ligação às macromoléculas reversível, a fração ligada libera o fármaco para substituir as espécies livres removidas pela circulação em geral. Não existem dados disponíveis sobre quais proteínas específicas estão envolvidas no processo, embora a ligação de fármacos com a queratina sejam, obviamente, importantes na epiderme. Variáveis físico-químicas como a temperatura, o pH, o pK e a força iônica afetam o número de sítios protéicos de ligação e as respectivas constantes de dissociação (BARRY, 1983).

3.4.2.3. Veículo

A liberação do fármaco de seu veículo é a primeira etapa limitante do processo de permeação cutânea e é anterior à barreira representada pelo *stratum corneum* (BARRY, 1983).

O veículo é um meio conveniente de aplicação de um composto e de controle de sua concentração (RIEGER, 1993).

Em formas farmacêuticas tópicas, os veículos utilizados podem conter muitos compostos como tensoativos, solubilizantes, tampões que podem modificar as características de liberação do fármaco da preparação. O veículo pode também

aumentar ou diminuir o conteúdo hídrico do *stratum corneum*, dependendo da sua composição. Materiais oleosos como a lanolina e as parafinas reduzem a perda transepidérmica de água, aumentando o conteúdo hídrico por oclusão. O glicerol e outros glicóis como o propilenoglicol e polietilenoglicóis de baixo peso molecular são higroscópicos e podem retirar água da pele quando presentes em altas concentrações (IDSON,1975;MARTIN,1993).

O veículo e seus componentes devem proporcionar um coeficiente de partição favorável para o fármaco, de forma que o fármaco seja solúvel no veículo, mas ainda assim tenha afinidade pelo *stratum corneum* (MARTIN,1993)

3.4.3.Promotores de permeação

Embora a via tópica seja de potencial interesse tanto para a veiculação de formas farmacêuticas tópicas quanto para sistemas transdérmicos, ainda não existe uma ampla utilização desta via devido à resistência inerente do *stratum corneum* à permeação de substâncias. Em geral é difícil administrar fármacos através da pele em concentração suficiente para promover efeito terapêutico. Abordagens com diferentes técnicas têm sido consideradas para alterar a permeabilidade do *stratum corneum* através de processos envolvendo técnicas de ruptura mecânica , interferência elétrica, uso de vesículas e partículas e modificadores químicos da função barreira (FINNIN & MORGAN,1999; IDSON,1975;BARRY,2001 ;LOPES,2000).

- Modificadores químicos da função barreira

Os modificadores químicos da permeabilidade cutânea ou promotores de permeação são como um grupo, substâncias que aumentam o fluxo de uma molécula através da pele . O promotor de permeação deve atuar reduzindo de forma reversível a resistência do *stratum corneum* sem provocar danos às células viáveis. (FINNIN & MORGAN,1999).

Embora a maioria dos promotores de permeação tenha sido desenvolvida originalmente para outras aplicações, uma busca sistemática por promotores seguros e eficazes tem sido considerada prioritária na pesquisa de permeação cutânea de fármacos. (GANEM-QUINTANAR *et al.*,1997).

Foram identificadas centenas de substâncias químicas com uma grande diversidade de estruturas que são capazes de modificar o fluxo de diferentes fármacos em condições de estudos “*in vitro*”. Porém, apenas uma pequena fração destes agentes químicos apresentou resultados interessantes “*in vivo*”, sendo que poucos destes foram efetivamente incorporados em formulações e testados em humanos (FINNIN & MORGAN,1999).

Um dos primeiros promotores de permeação identificados foi o Laurocapram (Azone[®]), seguido do dimetilsulfóxido (DMSO) e do ácido oléico (RIEGER,1993). O DMSO é um solvente aprótico dipolar com uma ampla gama de propriedades químicas e físicas às quais suas diversas atividades fisiológicas e farmacológicas são atribuídas. É o promotor de permeação mais antigo e mais estudado. Atua aumentando a penetração de uma gama de compostos iônicos e não iônicos de peso molecular abaixo de 3000. Existe um produto disponível para uso clínico formulado com 5% do agente antiviral idoxuridine em DMSO. Produto formulado com cloridrato de tetraciclina em DMSO também está disponível comercialmente para o tratamento da acne (*Acne vulgaris*) (ANIGBOGU *et al.*, 1995).

Outras substâncias que apresentam a ação de promover a permeação são: água, pirrolidonas, ácidos graxos, ésteres e álcoois, agentes tensoativos, amidas (uréia e derivados), polióis, óleos essenciais, terpenos, oxazolidinas, enzimas epidérmicas, polímeros e inibidores da síntese lipídica (BARRY,2001).

Um promotor de permeação ideal deve reunir as seguintes propriedades: (FINNIN & MORGAN,1999; BARRY,1983; GANEM-QUINTANAR,1997)

- 1- inércia farmacológica e ausência de ação sobre sítios receptores na pele ou no organismo em geral;
- 2- deve ser não tóxico, não irritante e não alergênico;

- 3- rápido início de ação, efeito com duração previsível e adequada ao fármaco utilizado;
- 4- o *stratum corneum* deve recuperar completamente suas propriedades barreira normais após a remoção do promotor;
- 5- a diminuição da função barreira do *stratum corneum* deve acontecer em uma única direção, sem a ocorrência de refluxo de material endógeno para o meio externo;
- 6- compatibilidade física e química com o fármaco e com os adjuvantes farmacêuticos;
- 7- facilidade de incorporação à forma farmacêutica em questão;
- 8- custo adequado e bom espalhamento sobre a pele, inodoro, insípido e incolor;
- 9- boas propriedades solventes para fármacos;
- 10- possibilidade de uso em loções, suspensões, pomadas, cremes, géis, aerossóis e adesivos cutâneos.

O fluxo de substâncias através da pele pode ser aumentado por outros meios, como através da otimização da atividade termodinâmica do fármaco no veículo com o uso de um co-solvente ou através do aumento do coeficiente de partição do fármaco, promovendo desta forma sua liberação do veículo para a pele. Nestes casos, porém, as substâncias envolvidas não são consideradas promotores de permeação. Os promotores de permeação podem ser classificados de acordo com a forma de atuação sobre o *stratum corneum* segundo o conceito de ação via lipídeo-proteína-partição, hipótese que sugere que os promotores atuam por um ou mais rotas dentre estas três principais (BARRY,2001; GANEM-QUINTANAR *et al.*,1997).

- Ação sobre os lipídeos:

O promotor de permeação rompe a organização estrutural dos lipídeos do *stratum corneum* , tornando-o permeável. As moléculas do promotor penetram nas

bicamadas, promovendo sua rotação, vibração e translocação, formando microcavidades e aumentando o volume livre disponível para a difusão. Sem a presença do promotor de permeação, o volume livre da bicamada na interface é pequeno. Atuam por este mecanismo o DMSO, Azone[®], terpenos, ácidos graxos e álcoois. Alguns solventes como o DMSO e o etanol podem extrair lipídeos fazendo o *stratum corneum* mais permeável pela formação de canais aquosos.

- Ação sobre as proteínas:

Tensoativos iônicos e DMSO interagem bem com a queratina dos queratinócitos promovendo a abertura da estrutura protéica tornando-a mais permeável e aumentando o coeficiente de difusão (D).

- Ação na promoção da partição:

Muitos solventes penetram no *stratum corneum* e aumentam o coeficiente de partição membrana/soluto (K_m), favorecendo a partição de uma segunda molécula.

3.5. Métodos para a avaliação da permeabilidade cutânea

O modelo científico ideal pressupõe a realização de testes de avaliação de permeabilidade da pele em seres humanos, porém devido ao risco de ocorrência de reações adversas desconhecidas envolvendo novos produtos, este modelo não é de fácil aplicação. Estudos de permeabilidade dérmica envolvendo seres humanos representam apenas uma pequena porcentagem dos estudos conduzidos nesta área (FRANZ, T. *et al.*, 1993; MAJMUDAR & SMITH, 1998; BEHL *et al.*, 1993).

3.5.1. Métodos *in vitro*

Os métodos mais comuns para a avaliação da permeação cutânea de fármacos em voluntários humanos envolvem dosagens da excreção urinária, determinação de níveis sanguíneos do fármaco, biópsia da pele, remoção mecânica das camadas celulares superficiais do *stratum corneum* com fita adesiva, no procedimento conhecido como “tape stripping” do *stratum corneum*. Estudos similares podem ser conduzidos em animais de experimentação, porém as diferenças bioquímicas e estruturais entre a pele humana e a pele de animais levam a extrapolações nem sempre precisas (MAJMUDAR & SMITH,1998; FRANZ,1993).

A literatura referente à pesquisa em permeação cutânea descreve em sua maioria estudos realizados em animais de experimentação ou em modelos “*in vitro*” (FRANZ,1993).

Os modelos “*in vitro*” utilizam membranas biológicas ou artificiais isoladas e são úteis como procedimentos de triagem e para a dedução de parâmetros físico-químicos referentes ao processo de permeação cutânea tais como fluxo, coeficiente de partição e coeficiente de difusão (BARRY,1983).

Acredita-se que a permeação cutânea observada “*in vitro*” reflita de forma acurada os aspectos determinantes da passagem de fármacos através da pele, demonstrando a disponibilidade das formas farmacêuticas avaliadas (LOPES,2000).

As metodologias para estudos de permeação cutânea “*in vitro*” são freqüentemente utilizadas pela simplicidade das condições experimentais, economia, rapidez e eliminação ou redução do uso de animais de experimentação (BRONAUGH & COLLIER,1993; MAJMUDAR & SMITH,1998).

A metodologia “*in vitro*” mais freqüente utiliza células de difusão de dois compartimentos, sendo um doador e um receptor, separados por uma membrana permeante (amostra de pele).

O compartimento doador é preenchido com uma solução do fármaco em estudo em concentração suficientemente elevada para garantir a manutenção de concentração constante durante todo o experimento (dose infinita). O compartimento receptor abaixo da membrana permeante serve como recipiente para o fluido receptor, que é continuamente agitado; amostras são coletadas deste compartimento em intervalos de tempo pré-determinados, por uma abertura lateral para doseamentos e determinação da taxa de permeação. A preparação e o tipo de membrana (pele), a escolha do fluido receptor e sua homogeneização adequada são fatores importantes neste tipo de experimento, juntamente com a manutenção da temperatura fisiológica (MARTIN,1993; BRONAUGH & COLLIER,1993).

3.5.1.1. Membranas

A membrana de escolha para estudos “*in vitro*” é preferencialmente o *stratum corneum* humano, obtido em geral de cirurgias ou de autópsias. O uso de pele humana, porém é limitado pela dificuldade de obtenção e de armazenamento. Tais limitações levaram à busca de material de origem animal alternativo para utilização como modelo de membrana (ITOH, *et al.*, 1990a; ITOH *et al.*, 1990b; RIGG & BARRY,1990;LOPES,2000).

Embora a pele humana seja o melhor modelo de membrana para estudos “*in vitro*”, sua permeabilidade pode variar em até 10 vezes dependendo do sítio regional. A pele de animais de experimentação, por outro lado, é de mais fácil obtenção e os animais podem ser provenientes da mesma linhagem e da mesma idade, sendo mais homogênea. Devido ao grande número de folículos pilosos, é importante notar que a pele de animais é mais permeável (ITOH, *et al.*, 1990a, RIGG & BARRY,1990)

Uma outra opção ao uso de pele de animais de experimentação é a pele artificial desenvolvida com base na cultura de células. São modelos de membrana úteis para estudos de triagem em permeação cutânea . Alguns modelos

comercialmente disponíveis são Epiderm[®], formado por queratinócitos altamente diferenciados compondo a camada basal, espinosa, granular e queratinizadas de forma similar ao stratum corneum. Modelos com equivalente de derme ou em bicamadas também estão descritos na literatura (MAJMUDAR & SMITH,1998).

GODWING et al. ,1997 avaliaram recentemente uma pele artificial formada por uma camada dérmica contendo fibroblastos humanos dispersos em uma matriz de colágeno e uma camada epidérmica de queratinócitos humanos diferenciados e estratificados. Estudos realizados com a pele alternativa em células de difusão utilizando a hidrocortisona com diferentes promotores de permeação indicaram que, embora as peles artificiais em geral apresentem permeabilidade da ordem de 1 a 2 vezes superior à pele humana, a pele avaliada exibiu permeabilidade mais próxima à da pele humana, porém os resultados mostraram grande variabilidade e a pele alternativa não foi considerada adequada para estudos de permeação cutânea, exigindo novos ajustes nas condições de cultura de células (GODWIN *et al.*, 1997).

Trabalho similar foi realizado por SCHMOOK *et al.* em 2001. A penetração de quatro fármacos de aplicação tópica com diferentes polaridades (ácido salicílico, hidrocortisona, clotrimazol e terbinafina) foi avaliada em pele humana, equivalente de pele humana (Graftskin[™] LSE[™]) epiderme humana reconstituída (Skinethic[™]), pele de rato e pele de porco. A pele de porco foi o modelo mais próximo à pele humana. A Graftskin[™] LSE[™] e a Skinethic[™] mostraram permeabilidade muito superior à da pele humana para os compostos mais hidrofóbicos. Os modelos de pele reconstituídos avaliados não foram considerados adequados para o uso em estudos de permeação (SCHMOOK *et al.*,2001)

Existe atualmente interesse no uso de pele muda de cobra como modelo para o *stratum corneum* humano. Diversos pesquisadores têm avaliado a aplicabilidade da pele de cobra em estudos de permeação, com diferentes graus de sucesso (RIGG & BARRY,1990; WIDLER *et al.*,2002;LOPES, 2000).

A pele de cobra fornece uma barreira similar ao *stratum corneum* humano e pode ser obtida sem a morte do animal, uma vez que a troca de pele ocorre regularmente e cada 2-3 meses no animal adulto, fornecendo material em abundância. A pele de cobra é de fácil armazenamento e não sofre degradação microbiológica. É *stratum corneum* puro, não viável e desprovido de folículos pilosos (WIDLER *et al.*,2002; RIGG & BARRY,1990; ITOH *et al.*,1990b; ITOH *et al.*, 1990a).

Figura 3. Muda de pele de cobra: *Spilotes pullatus* (Caninana) e *Bothrops jararaca* (Jararaca)

A estrutura da pele de cobra é formada por três camadas distintas. A camada mais externa ou camada β composta basicamente por β queratina. Abaixo dela está localizada a camada meso ou intermediária, similar ao *stratum*

corneum humano, composta de 3 a 5 camadas de células achatadas e extremamente finas, circundadas por lipídeos intercelulares. A parte mais interna ou camada α é composta por α -queratina. A camada intermediária é o principal depósito de lipídeos na pele de cobra e a principal barreira à permeabilidade da água (ITOH *et al.*, 1990 a ;TAKAHASHI *et al.*,1993).

WILDLER e colaboradores em 2002 estudaram a composição lipídica da pele de 32 espécies de cobras totalizando 101 indivíduos, de habitat úmidos e secos, comparativamente ao *stratum corneum* humano. A extração dos lipídeos das amostras de pele foi feita em duas etapas; a primeira com hexano e a segunda com mistura diclorometano/metanol 2:1 (v/v). O material das duas extrações foi reunido, seco e analisado por HPLC, fornecendo informações sobre o conteúdo de lipídeos de diferentes polaridades (lipídeos neutros, ácidos graxos livres, glicoceramidas e fosfolipídios). Os cromatogramas mostraram que as 32 espécies possuem perfil lipídico similar, com concentração relativamente elevada de colesterol e outros lipídeos neutros não identificados que parecem ser triglicérides. Quantidades variadas de ácidos graxos livres, glicoceramidas e de fosfolipídios também foram detectadas. Existe razoável similaridade entre o perfil lipídico do *stratum corneum* humano e das peles de cobra indicando que esta membrana pode ser um modelo de *stratum corneum* humano para estudos de permeação. As diferenças encontradas entre as permeabilidades do *stratum corneum* humano e a permeabilidade do *stratum corneum* da pele de muda de cobra descritas na literatura podem estar relacionadas à ausência de folículos pilosos nos répteis e à presença de glicoceramidas que, na pele humana são convertidas a ceramidas, não detectadas na pele de cobras neste estudo.

Os ácidos graxos predominantes na pele de cobra são o ácido esteárico, o oleico, o linoleico e o palmítico, também majoritários na pele de mamíferos (RIGG & BARRY,1990).

A pele de cobra apresenta algumas variações estruturais em relação ao tecido humano, tendo uma construção em escamas sobrepostas formadas por α -queratina (RIGG & BARRY,1990).

Figura 4. Representação esquemática de um corte transversal da pele de cobra. (RIGG & BARRY,1990)

A similaridade sobre a pele humana e a pele de muda de cobra da espécie *Elaphe obsoleta* em relação à espessura, conteúdo lipídico e taxa de evaporação de água esta resumida na tabela abaixo (ITOH *et al.*, 1990a).

Tabela 3. Comparação do *stratum corneum* humano x *Elaphe obsoleta* (ITOH *et al.*, 1990a)

Parâmetro	<i>stratum corneum</i> humano	<i>Stratum corneum Elaphe</i> <i>obsoleta</i>
Espessura	13-15 μm	10-20 μm
Conteúdo lipídico	2,0 – 6,5%	~ 6%
Taxa de evaporação de água	0,1-0,8 $\text{mg}/\text{cm}^2 \text{ h}$	0,15-0,22 $\text{mg}/\text{cm}^2 \text{ h}$

HIRVONEN *et al.* em 1991, examinaram o efeito dos promotores de permeação N,N,dimetilamino acetato (DMAA) e da Azone[®] na absorção cutânea da indometacina, do 5-fluorouracil e do propanolol em células de difusão com pele humana, pele de muda de cobra (*Elaphe obsoleta*, região dorsal) e pele de orelha de coelhos. Os dois promotores de permeação avaliados apresentaram aumento no fluxo dos fármacos de mesma magnitude. Os aumentos relativos do fluxo observados para os dois promotores na pele humana, na pele de muda de cobra

e na pele de coelho foram respectivamente de 10 para 20, de 5 para 50 e de 20 para 120 vezes. A pele de coelho mostrou ser um modelo de membrana pouco adequado para estudos "*in vitro*", enquanto a pele de muda de cobra mostrou comportamento mais próximo ao da pele humana em termos de permeabilidade (HIRVONEN *et al.*,1991).

3.6. Métodos biofísicos no estudo do *stratum corneum*

Ao longo das últimas décadas, vários métodos biofísicos foram empregados no estudo da morfologia e da dinâmica do *stratum corneum* com o objetivo de compreender a correlação entre sua estrutura e suas funções. Entre estes métodos biofísicos estão a difração de raios-X, a ressonância paramagnética de elétrons, a ressonância magnética nuclear, a calorimetria exploratória diferencial e os métodos espectroscópicos FT-Raman e espectroscopia FTIR (PERCOT & LAFLEUR, 2001).

A PAS-FTIR também tem sido aplicada ao estudo de membranas e outros materiais biológicos para os quais os métodos espectroscópicos convencionais não são adequados (ROSENCWAIG & PINES,1977; CAHEN *et al.*,1980).

O *stratum corneum* representa a principal barreira à permeação de fármacos pela via tópica e as técnicas que permitem o monitoramento de sua estrutura à nível molecular podem auxiliar no estudo do mecanismo de ação de promotores de permeação, incluindo os tensoativos, e contribuir para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de aplicação tópica mais eficientes (SHIN,CHO e OH,2001; LEVANG,ZHAO e SINGH,1999; BARRY,2001).

3.6.1. Espectroscopia vibracional: FT-Raman e PAS-FTIR

A espectroscopia estuda as interações da radiação eletromagnética com a matéria (INGLE & CROUCH, 1988).

A espectroscopia que compreende as faixas de frequência das regiões de ultravioleta próximo, visível e infravermelho, como técnica analítica, apresenta

exigências instrumentais similares. As técnicas espectroscópicas nestas regiões do espectro eletromagnético são freqüentemente divididas em espectroscopia atômica e espectroscopia molecular. A espectroscopia atômica trata dos fenômenos envolvendo espécies atômicas livres, enquanto a espectroscopia molecular lida com fenômenos envolvendo espécies moleculares no estado de vapor, em solução ou no estado sólido (INGLE & CROUCH, 1988).

A espectroscopia molecular tem como objetivo a elucidação da estrutura e da dinâmica molecular bem como do estado de associação entre as moléculas e da interação com solventes (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

A energia ou o comprimento de onda da radiação incidente determina o tipo de transição ou interação que ocorre entre a radiação e a matéria. Radiações incidentes com comprimentos de onda na faixa de 770-2500 nm (infravermelho próximo) e 2,5 – 50 μm (infravermelho médio ou fundamental) levam a interações envolvendo vibrações moleculares (INGLE & CROUCH, 1988).

A espectroscopia vibracional tornou-se uma das técnicas qualitativas mais utilizadas na determinação de estruturas de moléculas biológicas e no monitoramento de suas alterações conformacionais (DIEM, 1993; LEVIN, 1986; INGLE & CROUCH, 1988).

Na espectroscopia no infravermelho médio, as freqüências fundamentais observadas na região de 4000 – 2500 cm^{-1} são relacionadas ao estiramento X–H. A vibração de estiramento C–H de compostos alifáticos pode ser observada em 3000 - 2850 cm^{-1} , tem intensidade média e apresenta banda moderadamente larga. Nesta região é possível identificar a vibração de estiramento C–H assimétrico (2965 cm^{-1}) e simétrico (2880 cm^{-1}) do grupo CH_3 . Para o grupo CH_2 , a vibração de estiramento assimétrico ocorre em 2930 cm^{-1} e a do simétrico em 2860 cm^{-1} (STUART, 1997).

A vibração de deformação N–H em aminas ocorre em 1630-1500 cm^{-1} e é em geral forte; a vibração de estiramento para este grupo é observada em 3400-3300 cm^{-1} (STUART, 1997).

As freqüências com valores inferiores a 1500 cm^{-1} não possibilitam a associação de bandas observadas com grupos específicos, uma vez que esta

região do espectro infravermelho está relacionada com vibrações de deformação ou de estiramento de cada molécula, referentes a vibrações do esqueleto da molécula, que absorvem em $1500-650\text{ cm}^{-1}$. Esta região é denominada de região de “impressão digital”. (STUART, 1997).

O grupo C–OH de álcoois e fenóis e o grupo C–O –C de éteres apresentam vibração de estiramento C–O na região de impressão digital (abaixo de 1500 cm^{-1}). São, porém, bandas de grande intensidade e podem auxiliar na identificação do composto. As vibrações de estiramento O–H ocorrem entre $2500-3650\text{ cm}^{-1}$ e as vibrações de deformação C–O–H ocorrem na região de impressão digital (STUART, 1997).

As aminas primárias, secundárias e terciárias exibem vibração de estiramento N–H em $3490-3180\text{ cm}^{-1}$ e vibração de deformação em $1650-1580\text{ cm}^{-1}$. Em amidas, a vibração de estiramento do grupo C=O ocorre em $1700-1640\text{ cm}^{-1}$ e do grupo N–H ocorre em $3500-3100\text{ cm}^{-1}$ (STUART, 1997).

Os compostos contendo enxofre, como o ácido sulfônico (R–SO₂–OH), apresentam vibrações de estiramento S–O em $1160-1120\text{ cm}^{-1}$ e $1350-1300\text{ cm}^{-1}$, ambos na região de impressão digital (STUART, 1997).

3.6.1.1. Espectroscopia FT-Raman

A espectroscopia FT-Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional de particular interesse no estudo de moléculas biológicas principalmente devido à pouca influência provocada pela fluorescência e pela presença da água nas amostras em estudo (ANIGBOGU *et al.*, 1995; WILLIAMS *et al.*, 1993; CASPER *et al.*, 2001).

A utilização de pequenas quantidades de amostra e o fato de não ser uma técnica destrutiva representam vantagens adicionais. (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; HANH, *et al.*, 2000).

A espectroscopia FT-Raman baseia-se no efeito Raman, descoberto pelo físico indiano C.V. Raman, em 1928, que se origina quando uma luz monocromática de alta potência incide sobre uma amostra causando excitação

das moléculas que, subseqüentemente reemitem em diferente comprimento de onda. Enquanto a maior parte da luz espalhada é do mesmo comprimento de onda da luz incidente, uma fração da luz é espalhada em um comprimento de onda diferente do incidente, como resultado de alterações das vibrações moleculares. A diferença entre a luz incidente e a luz espalhada pelo efeito Raman é igual à energia envolvida na transição do modo vibracional da molécula (INGLE & CROUCH,1988; SKOOG,HOLLER e NIEMAN ,2002; BULKIN, 1991).

Figura 5. Esquema do espectrômetro FT-Raman RFS 100 (Catálogo Brucker Instruments)

A região do espectro eletromagnético no qual o efeito Raman é observado depende da energia da radiação incidente e dos níveis de energia molecular envolvidos (BULKIN, 1991).

A espectroscopia FT-Raman é um método de espectroscopia vibracional que se baseia no espalhamento de luz enquanto o infravermelho se baseia na absorção da luz incidente (CASPER *et al.*,2001).

O espectro de espalhamento Raman e o espectro de absorção no infravermelho com transformada de Fourier se assemelham muito, uma vez que ambos se referem às transições vibracionais envolvidas. Uma vantagem importante da espectroscopia FT-Raman é o fato de que a água não causa interferência no espectro, podendo ser aplicada ao estudo do *stratum corneum* hidratado (WILLIAMS *et al.*,1993).

A espectroscopia FT-Raman não foi amplamente difundida até que as fontes de lasers se tornassem disponíveis nos anos 1960, facilitando a obtenção dos espectros. Um segundo impedimento para a expansão do uso do método foram os problemas de fluorescência das amostras ou de suas impurezas, atualmente superados através do uso de fontes na região do infravermelho próximo (WILLIAMS *et al.*,1993; BULKIN,1991; SKOOG, HOLLER e NIEMAN,2002).

Nos espectros obtidos por FT-Raman, as posições dos números de onda das bandas dependem das massas atômicas e da constante de força, que é a medida da intensidade das ligações internucleares (ANIGBOGU *et al.*,1995).

As posições, intensidades relativas e formas das bandas dos espectros FT-Raman contêm informações detalhadas sobre o grupo funcional molecular da amostra e sobre as estruturas e interações presentes (CASPER *et al.*,2001).

A tabela 4 apresenta os modos vibracionais do *stratum corneum* obtidos pela espectroscopia FT-Raman.

Tabela 4. Frequências vibracionais do *stratum corneum* humano determinados por FT-Raman (ANIGBOGU *et al.*, 1995)

Número de onda/cm ⁻¹	Descrição aproximada do modo vibracional
3060 w	ν (CH)
2958 m,sh	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
2931s	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$
2883 ms	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2852 m	$\nu_s(\text{CH}_2)$
1652 s	ν (C=O) amida I – α hélice
1585 w	ν (C=C) olefínico
1552 w	$\nu(\text{CN})$ e δ (NH) amida II

1438 s	$\delta(\text{CH}_2)$ tesoura
1296 m	$\delta(\text{CH})$ "twisting"
1274 m	$\nu(\text{CN})$ e $\delta(\text{NH})$ amida III α hélice
1244 w,sh	$\delta(\text{CN})$ amida III – β queratina
1172 w	$\nu(\text{CC})$
1126 mw	$\nu(\text{CC})$ cadeia carbônica, conformação trans
1082 mw	$\nu(\text{CC})$ cadeia carbônica, conformação randômica
1062 mw	$\nu(\text{CC})$ cadeia carbônica, conformação trans
1031 mw	$\nu(\text{CC})$ cadeia carbônica, conformação cis
1002 m	$\nu(\text{CC})$ anel aromático
644 w	$\nu(\text{CS})$ amida IV
623 w	$\nu(\text{CS})$

ν = estiramento ; δ = deformação; as = assimétrico s = simétrico
w = fraco (weak); m = médio (medium); sh = ombro (shoulder)

No estudo do *stratum corneum*, são de particular interesse os modos vibracionais do C-H em $3100\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$; o C=O em cerca de 1650 cm^{-1} (amida I) proveniente da α - queratina; a banda em 1274 cm^{-1} , do estiramento C-N e deformação angular N-H de proteína (amida III) e as bandas mais fracas a $1030, 1062, 1082$ e 1126 cm^{-1} , devidas ao estiramento C-C, que fornece informações sobre as estruturas das cadeias carbônicas das moléculas. Estas bandas ($1030\text{--}1126\text{ cm}^{-1}$) têm sido utilizadas para a avaliação da organização das bicamadas lipídicas em membranas biológicas modelo (ANIGBOGU *et al.*, 1995; DIEM, 1993).

A banda de estiramento C-H em 3060 cm^{-1} permanece no *stratum corneum* após extensiva extração dos lipídeos, indicando serem originadas, em sua maioria, da queratina; a banda em 2852 cm^{-1} , do estiramento CH_2 simétrico não está presente após extração dos lipídeos, indicando ser originária dos lipídeos intercelulares (ANIGBOGU *et al.*, 1995)

A banda em 2883 cm^{-1} , de CH_2 assimétrico é reduzida após a extração dos lipídeos, mas ainda está presente, indicando ser originária dos lipídeos e da queratina. A banda em 2931 cm^{-1} , de CH_3 simétrico é apenas levemente reduzida no *stratum corneum* após extração com solventes, sugerindo ser, em sua maior parte originária da queratina. De forma similar, dos quatro estiramentos C-C da cadeia carbônica, o encontrado em 1031 cm^{-1} permanece constante após a extração dos lipídeos, sugerindo ser originário da queratina, enquanto os outros

três, em 1062, 1082 e 1126 cm^{-1} são marcadamente reduzidos indicando serem originados dos lipídeos intercelulares (ANIGBOGU *et al.*, 1995).

WILLIAMS *et al.* em 1993 realizaram estudos por FT-Raman com amostras de *stratum corneum* humano com diferentes graus de hidratação e observaram que o conteúdo de água presente no tecido não levou a alterações significativas nos espectros obtidos. Estudaram também a variação intra e inter-amostras, provenientes de diferentes indivíduos e concluíram que as variações entre os espectros obtidos foram mínimas.

A espectroscopia de FT-Raman foi utilizada no estudo das interações entre o *stratum corneum* humano e o promotor de permeação dimetil sulfoxido (DMSO). Os resultados mostraram alterações na queratina, da conformação de α hélice para a conformação folha- β ; em concentrações acima de 60% (v/v), evidências de interações com os lipídeos foram observadas, indicando que o efeito de promoção da permeação observada para o DMSO envolve não apenas alteração na estrutura das proteínas mas pode também estar relacionada à alterações na organização dos lipídeos dos *stratum corneum* (ANIGBOGU *et al.*, 1995).

WILLIAMS & BARRY realizaram, em 1994, estudo comparativo das diferenças estruturais da pele humana, de porco e de cobra utilizando a técnica de FT-Raman, buscando uma interpretação para as diferenças de difusão observadas entre estas membranas. Os espectros obtidos permitiram a comparação dos três tecidos a nível molecular, sendo que as diferenças estruturais observadas podem explicar parcialmente as diferenças na permeabilidade das membranas. Concluíram que as características estruturais e de difusão do *stratum corneum* do porco e humano são semelhantes, ao passo que o *stratum corneum* de cobra pode ser uma alternativa razoável para estudos de permeação de alguns fármacos, porém a camada de β -queratina presente pode representar uma barreira adicional à permeação de moléculas lipofílicas.

CASPER *et al.* em 2001 utilizaram a espectroscopia FT-Raman *in vivo* para obter informações sobre a composição molecular da pele e para a determinação dos gradientes de concentração de água em função da profundidade, na região do antebraço de voluntários. Utilizaram equipamento

especialmente projetado e a concentração de água foi estimada com base na determinação da relação água/proteína presente no tecido, monitorada através das diferenças de intensidades relativas entre as bandas a 3390 cm^{-1} (vibração de estiramento OH) e a 2935 cm^{-1} (vibração de estiramento CH_3). Os resultados mostraram perfis de concentração de água concordantes com dados publicados, estimados por técnicas de análise por raios X, com aumento contínuo da concentração de água de 15-25% na superfície até cerca de 40% na região limite entre *stratum corneum* e *stratum granulosum*.

3.6.1.2. Espectroscopia PAS-FTIR

O efeito fotoacústico, base para a espectroscopia fotoacústica, foi descrito por Alexander Graham Bell, em 1880 e é essencialmente a conversão de uma luz de intensidade modulada em uma onda periódica de energia térmica e posteriormente em som, que é detectado por um microfone (CAHEN,1980).

Embora a espectroscopia fotoacústica seja conhecida há muitos anos, não foi utilizada na região do infravermelho médio até o advento do espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). A combinação da espectroscopia fotoacústica com o FT-IR representa uma potente ferramenta para o estudo de amostras sólidas. A principal vantagem da espectroscopia fotoacústica é o fato de que a morfologia da amostra não interfere nas características dos espectros obtidos, podendo ser utilizada para a obtenção de espectros de amostras sólidas, semi-sólidas ou líquidas turvas, difíceis de serem estudadas por outras técnicas espectroscópicas (CAHEN,1980).

A obtenção dos espectros não requer, em geral, nenhum tratamento da amostra e são utilizadas pequenas quantidades de material (RINTOUL *et al.*,1998; INGLE & CROUCH,1988).

A análise de amostras em diferentes níveis de profundidade é possível para os espectrômetros equipados com dispositivo para varredura por passos, podendo ser atingidas profundidades na faixa de 1 a $10\text{ }\mu\text{m}$ (RINTOUL *et al.*,1998).

Em estudos por espectroscopia fotoacústica de amostras sólidas, o material é colocado em uma célula fechada contendo o gás hélio, que é não absorvedor da radiação e um microfone sensível é acoplado. Um feixe modulado de radiação infravermelha proveniente de um interferômetro incide sobre a amostra e desde que haja absorção da radiação incidente, o efeito fotoacústico é observado. A radiação absorvida pela amostra é convertida em calor e difundida à superfície; como a fonte de radiação é modulada, o aquecimento e o resfriamento periódico da amostra resulta em ondas de pressão na mesma frequência da fonte modulada, que são detectadas pelo microfone (INGLE & CROUCH,1988).

Figura 6. Esquema de funcionamento de uma célula fotoacústica (Cortesia Prof. Dr. Yoshio Kawano- Lab. Espectroscopia Molecular – Instituto de Química da USP)

A espectroscopia fotoacústica FT-IR foi aplicada ao estudo da permeação do clotrimazol através de membrana sintética. O fármaco foi aplicado em vaselina sólida na concentração de 10% p/p para os estudos. Os resultados mostraram ser possível o monitoramento da penetração do fármaco através da membrana com mínima manipulação da amostra (SCHENDZIELORZ *et al.*,1999)

LEBLANC & PUCETTI, em 2000, utilizaram a espectroscopia fotoacústica na região do ultravioleta (PAS-UV) em estudo *in vitro* da ação da di-hidroxi acetona como auto-bronzeador na pele humana. Os resultados mostraram que o

efeito de bronzamento começa próximo à interface entre *stratum corneum* e *stratum granulosum*.

Estudos comparativos entre as técnicas de PAS-FTIR, PAS-UV e a técnica de ATR-FTIR, foram realizados para o estudo da penetração dos fármacos ditranol e metoxalen a partir de veículos semi-sólidos (vaselina) utilizando membranas lipídicas artificiais. Os autores sugeriram que a associação das técnicas de ATR-FTIR e PAS-FTIR é bastante útil para a caracterização do perfil de permeação de fármacos. Em comparação com a PAS-FTIR, a PAS-UV é uma técnica mais sensível, porém limitada a fármacos absorvedores da radiação ultravioleta, limitando bastante seu uso (HANH *et al.*,2000).

3.6.2. DSC

O estudo das mudanças induzidas termicamente em sistemas biológicos pode fornecer informações úteis sobre algumas propriedades destes sistemas. Muitos pesquisadores têm estudado as transições térmicas do *stratum corneum* de mamíferos utilizando a DSC (GOLDEN *et al.*,1986).

A DSC é uma técnica de análise térmica no qual se mede a diferença de energia (entalpia) fornecida à substância e a um material de referência, em função da temperatura enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. De acordo com o método de medição utilizado, há duas modalidades: DSC com compensação de potência e DSC com fluxo de calor (IONASHIRO & GIOLITO,1980).

A DSC mede a diferença de fluxo de calor necessária para manter a amostra na mesma temperatura do material de referência durante o aquecimento linear de ambos (HAINES & WILBURN,1995).

As mudanças de temperatura na amostra são decorrentes de eventos endotérmicos ou exotérmicos tais como os causados por mudanças de fase, fusão, ebulição, desidratação, dissociação ou decomposição, entre outras. Em geral, transições de fase, desidratação e algumas reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos (HAINES & WILBURN,1995).

Avanços na instrumentação tornaram a análise térmica do *stratum corneum* possível. O *stratum corneum* isolado apresenta quatro transições endotérmicas características nas temperaturas de 40, 75, 85 e 105 °C. A primeira transição, inicialmente relacionada à fusão de lipídeos do sebo, é atualmente atribuída à transição dos lipídeos nas bicamadas do estado cristalino (ortorrômbico) para o estado de gel (hexagonal). As duas transições a 75 °C e 85 °C têm sido atribuídas à transição de fase do estado de gel lamelar para líquido. Muitos autores relacionam a transição a 85 °C às transições envolvendo lipídeos associados a proteínas. A quarta transição a 105 °C representa a desnaturação da porção protéica do *stratum corneum* e requer a presença de uma certa concentração de água na amostra (no mínimo 15%) para ser aparente. Após a remoção dos lipídeos com mistura clorofórmio/metanol, apenas uma transição de fase foi relatada a 100 °C; a análise por DSC dos lipídeos extraídos também forneceu apenas uma transição de fase a aproximadamente 65 °C (ASHTON *et al.*,1992; GOLDEN *et al.*,1986; GOLDEN,Mc KIE & POTTS,1987, LEOPOLD & LIPPOLD, 1994).

O mecanismo envolvido na permeabilidade da vitamina C através do *stratum corneum* de camundongos sem pelo foi avaliado por DSC. Apesar da vitamina C ser um composto hidrofílico e portanto de penetração lenta pelo *stratum corneum*, observou-se que a penetração é mais rápida que a observada para outros compostos hidrofílicos. Os resultados da análise das curvas de DSC mostraram que a vitamina C reduz as pontes de dissulfeto da queratina formando ligações S-H e aumentando a capacidade de hidratação do *stratum corneum*, facilitando a rápida penetração do composto (LEE & TOJO,1998).

O efeito provocado pelo tratamento com uma série de isômeros de ácidos graxos com cadeias carbônicas C18 sobre a permeabilidade e fluidez dos lipídeos do *stratum corneum* de porco foi avaliado com a utilização da DSC e da FT-IR. Os autores observaram que o tratamento com isômero contendo uma insaturação *cis* causa aumento da fluidez dos lipídeos do *stratum corneum* causada por alterações na organização das bicamadas lipídicas, sugerida pela redução na temperatura máxima dos picos das transições a 65 e 75 °C. A posição da dupla

ligação mais próxima ao centro da cadeia carbônica mostrou efeito mais acentuado sobre a interferência na organização dos lipídeos (GOLDEN, Mc KIE e POTTS, 1987).

O mecanismo de ação do ácido oléico e do DMSO como promotores de permeação para o 5-fluorouracil foi estudado por DSC utilizando *stratum corneum* humano. Os resultados mostraram que o DMSO reduz as temperaturas das transições a 70 °C e 85 °C indicando desorganização e aumento da fluidez dos lipídeos; o ácido oléico provocou menor alteração nas temperaturas de transição, porém ocorreu aumento das áreas referentes às transições. Com base nestes resultados os autores propuseram que o ácido oléico atua através da inserção na região lipídica do *stratum corneum*, desorganizando sua estrutura e o DMSO não se insere da mesma forma mas aumenta a fluidez dos lipídeos (GOODMAN & BARRY, 1986).

3.7. Tensoativos

3.7.1. Aspectos Gerais

Tensoativos ou agentes orgânicos de superfície, são produtos que quando misturados com água numa concentração de 0,5%, a 20 °C, e deixados em repouso durante uma hora à mesma temperatura originam um líquido transparente ou translúcido ou uma emulsão estável sem separação de matéria insolúvel e reduzem a tensão superficial da água de 72,5 dinas/cm para 45 dinas/cm ou menos (MANUAL de classificação, 2002).

Os tensoativos apresentam a propriedade de se localizar nas superfícies ou interfaces de sistema quando presentes em baixas concentrações, provocando a redução da tensão superficial ou interfacial do sistema (MARTIN, 1993; ATTWOOD & FLORENCE, 1985; ROSEN, 1979; MILLER & NEOGI, 1985).

A estrutura química dos tensoativos é caracterizada por possuir uma região ou grupo polar (hidrofílico) e uma região ou grupo apolar (lipofílico). Estes tipos de

estrutura são denominados, anfifílicos (ROSEN, 1989; ATTWOOD & FLORENCE, 1985; MILLER & NEOGI, 1985)

A camada interfacial formada como resultado da adsorção é geralmente monomolecular. Estas monocamadas desempenham papel importante em inúmeras áreas industriais envolvendo tensoativos, como a área farmacêutica, agroquímica, alimentícia, de detergência e na extração de petróleo (BINKS, 1993).

A tendência à adsorção a interfaces é um mecanismo para evitar o contato desfavorável do ponto de vista energético, entre a água e a porção hidrofóbica da molécula, enquanto a porção hidrofílica permanece em contato com o meio aquoso. Situação análoga ocorre em dispersões oleosas de tensoativos, onde a porção polar tende a adsorver a interface, evitando o contato desfavorável com o meio oleoso e a porção apolar tende a se manter no meio. A adsorção ocorre de forma orientada (MARTI, 1993; ROSEN, 1989; LINDMAN, 1984; ATTWOOD & FLORENCE, 1985.)

Em uma fase líquida, as moléculas localizadas no interior da fase são atraídas por moléculas da vizinhança por forças iguais em todas as direções, tendo uma resultante de força nula. Na superfície ou interface da fase líquida, porém, as moléculas interagem mais fortemente com as moléculas do interior da fase do que com as moléculas da fase acima, resultando em uma força no sentido do interior da fase líquida. Esta resultante de força é denominada tensão superficial ou interfacial e é definida como a força por unidade de comprimento necessária para aumentar a área da superfície ou interface em uma unidade. É expressa em dinas/cm (sistema CGS) ou N/m(SI); pode também ser expressa em unidade de energia por unidade de área: erg/cm² (sistema CGS) ou Joules/m² (SI). A adsorção dos tensoativos às superfícies ou interfaces reduz a força ou a energia necessária para expandir a superfície ou interface, reduzindo a tensão superficial. A adsorção é sempre acompanhada de redução da tensão superficial (MARTIN, 1993; ROSEN, 1989; RABOCKAI, 1979; LINDMAN, 1984).

A classificação mais usual dos tensoativos baseia-se no tipo iônico, considerando a carga presente na porção hidrofóbica da molécula, quando ocorre ionização em água. Quando a carga que acompanha a porção hidrofóbica é

negativa, os tensoativos são chamados aniônicos; quando a carga é positiva, catiônicos e no caso de possuírem grupos polares não ionizáveis, são chamados não iônicos. Existe também uma classe de tensoativos cujo caráter iônico da molécula depende do pH do meio, podendo ser aniônicos, catiônicos ou não iônicos. Estes tensoativos são conhecidos como anfotéricos ou zwitteriônicos (ATTWOOD & FLORENCE, 1985; MILLER & NEOGI, 1985).

Todas as propriedades dos tensoativos decorrem da natureza anfipática de sua molécula. Os tensoativos podem ser predominantemente hidrofílicos (solúveis em água), lipofílicos (solúveis em óleo) ou apresentar um balanço entre estes dois extremos, dependendo da natureza química dos grupos polares presentes na molécula (MARTIN, 1993).

A ação dos tensoativos em vários fenômenos interfaciais tais como formação de espuma, detergência e emulsificação dependem de sua concentração na interface ou seja, da eficiência com a qual ocorre a adsorção. A eficiência da adsorção refere-se à concentração máxima que o tensoativo pode atingir na interface em questão e está relacionada com a área ocupada pela molécula na interface. Quanto menor a área ocupada, maior será a eficiência da adsorção. A área ocupada na interface depende da estrutura da molécula e de sua orientação na interface (ROSEN, 1989).

Na interface sólido-líquido, onde a fase líquida é a água, a adsorção dos tensoativos é fortemente influenciada por vários fatores que determinam o mecanismo pelo qual a adsorção ocorre. Alguns destes fatores são: a natureza estrutural dos grupos químicos presentes na superfície do sólido (presença de sítios fortemente carregados ou grupos não polares), a estrutura molecular do tensoativo (presença de grupos iônicos ou não iônicos, tamanho da porção hidrofóbica, ramificações, grupos aromáticos), as características da fase líquida (pH, conteúdo de eletrólitos, temperatura) (ROSEN, 1989).

Os principais mecanismos pelos quais os tensoativos podem adsorver à substratos sólidos a partir de soluções aquosas são:

- 1- Troca iônica: envolve a substituição de um íon adsorvido no substrato por um tensoativo na forma ionizada de carga similar;

Figura 7. Interação por troca iônica (ROSEN,1989)

- 2- Emparelhamento iônico: adsorção de um tensoativo na forma ionizada a sítios carregados com carga oposta;

Figura 8. Interação via emparelhamento iônico (ROSEN,1989)

- 3- Interação ácido-base através da formação de ligações de hidrogênio entre o substrato e o tensoativo ou através da reação ácido-base de Lewis;

Figura 9. Interação via ligação de hidrogênio (ROSEN,1989)

Figura 10. Interação via ácido- base de Lewis (ROSEN,1989)

- 4- Adsorção por dispersão de forças: através de forças dispersão de London atuando entre o substrato e o tensoativo. A adsorção por este mecanismo é também suplementar à que ocorre pelos demais mecanismos;

Figura 11. Interação por dispersão de forças em superfície não polar (ROSEN,1989)

- 5- Interação hidrofóbica: ocorre quando há atração mútua entre grupos hidrofóbicos do tensoativo e a tendência à escapar do meio aquoso supera as forças de repulsão permitindo que se adsorvam ao substrato através da agregação de suas cadeias hidrofóbicas.

Figura 12. Adsorção por interação hidrofóbica em (a) superfície sem carga, (b) superfície carregada (ROSEN,1989)

A adsorção de tensoativos a substratos com sítios carregados é um processo complexo durante o qual a adsorção pode ocorrer sucessivamente por

mecanismos de troca iônica, emparelhamento iônico e interação hidrofóbica. A curva típica de adsorção de um tensoativo aniônico a um substrato com carga oposta tem o formato de um “S”, conforme ilustra a figura a seguir.

Figura 13. Curva típica em “S” representativa da adsorção de um tensoativo aniônico a uma superfície de carga oposta (ROSEN,1989)

O formato reflete três modos distintos de adsorção. Na região 1, o tensoativo adsorve à superfície principalmente por troca iônica; o grupo hidrofóbico fica mais ou menos direcionado para o substrato. Na região 2 há aumento significativo na adsorção como resultado de interações hidrofóbicas entre as cadeias dos tensoativos que se aproximam da superfície com as cadeias dos tensoativos já adsorvidos. Este tipo de agregação é chamado de adsorção cooperativa. Nesta região, a carga original do substrato é neutralizada pela adsorção de íons do tensoativo de carga oposta, tornando-se reversa ao final, de forma que o substrato adquire carga do mesmo sinal do tensoativo ionizado.

Figura 14. Adsorção de um tensoativo aniônico a uma superfície de carga oposta por troca iônica (região 1) e emparelhamento iônico (região 2) (ROSEN,1989)

Na região 3 há redução da inclinação porque, para que a adsorção ocorra, é necessário superar a repulsão eletrostática entre os íons que se aproximam e a superfície do substrato, com a mesma carga. A adsorção é geralmente completa quando a superfície é coberta com uma monocamada ou bicamada do tensoativo (região 4). Em muitos casos, a adsorção se completa em concentrações próximas à concentração na qual o tensoativo passa a se agrupar em solução formando micelas, uma vez que a adsorção envolve íons simples preferencialmente à micelas (ROSEN,1989).

Alterações do pH do meio podem causar modificações pronunciadas na adsorção de tensoativos iônicos a substratos sólidos. A redução do pH da fase aquosa faz com que a superfície se torne mais positiva ou menos negativa em decorrência da adsorção de prótons da solução aos sítios carregados, com o conseqüente aumento da adsorção de tensoativos aniônicos e redução da adsorção de tensoativos catiônicos. O inverso ocorre quando o pH da solução aquosa aumenta. Variações do pH podem também afetar a molécula de tensoativo, que pode tornar neutros grupos iônicos capazes de adsorver a sítios de carga oposta, sendo que a adsorção poderá ocorrer apenas através de ligações de hidrogênio ou forças de dispersão (ROSEN, 1989; MARTIN, 1993).

Eletrólitos neutros como o NaCl e o KBr causam uma redução na adsorção de tensoativos iônicos à superfícies de carga similar, em decorrência de uma redução na atração entre espécies de carga oposta e redução da repulsão entre espécies com carga similar em meios com alta força iônica. Íons polivalentes em

solução, em especial o Ca^{2+} provocam aumento na adsorção de tensoativos aniônicos devido à adsorção de íon Ca^{2+} à superfície, produzindo sítios positivos, aos quais os tensoativos aniônicos podem adsorver (ROSEN, 1989; MARTIN, 1993).

Os tensoativos em solução se associam formando estruturas de dimensões coloidais denominadas micelas. Esta propriedade, ao lado da redução da tensão superficial e interfacial e da tendência à adsorver em superfícies, é uma propriedade fundamental dos tensoativos. Fenômenos interfaciais importantes tais como detergência e solubilização dependem da formação de micelas (ROSEN, 1989; LINDMAN, 1984).

A associação em micelas, assim como a adsorção a interfaces, reflete a tendência das moléculas de tensoativos de evitar a interação hidrofóbica-hidrolítica desfavorável sob o ponto de vista da entropia. A associação em micelas ocorre por um processo cooperativo e em geral se inicia com a formação de micelas esféricas quando a quantidade de tensoativo em solução atinge uma concentração definida, denominada concentração micelar crítica ou cmc (LINDMAN, 1984).

Diferentes tensoativos exibem diferentes valores de cmc. A cmc é a concentração acima da qual se inicia a formação de micelas e ocorre quando as interfaces do sistema estão ocupadas por uma camada monomolecular de tensoativo (LOMAX, 1996).

A formação de micelas é um mecanismo complementar ao processo de adsorção a interfaces que possibilita a remoção dos grupos hidrofóbicos dos tensoativos do contato com a água, reduzindo a energia livre do sistema (MILLER & NEOGI, 1985).

Em concentrações próximas à cmc quase todas as propriedades físicas mensuráveis da solução tais como densidade, solubilidade, pressão osmótica e detergência sofrem alteração brusca. A redução da tensão superficial também tem o seu mínimo próximo à cmc. A adição de tensoativo ao meio em concentração acima da cmc gera, em sua maior parte, apenas mais micelas, sem afetar a tensão superficial (MILLER & NEOGI, 1985).

A determinação da cmc de tensoativos pode ser feita através do uso de qualquer destas propriedades físicas, sendo as mais utilizadas as medidas de tensão superficial e condutividade elétrica (ROSEN, 1989; MARTIN, 1993).

Em meio aquoso, as moléculas de tensoativos são orientadas na micela com as porções polares voltadas para uma fase aquosa e a porção apolar voltada para o interior da micela. Em meio não polar, a estrutura da micela é similar, mas invertida, com a porção polar formando a região interna circundada por uma região externa contendo os grupos hidrofílicos; interações dipolo-dipolo mantêm os grupos hidrofílicos juntos no interior da micela (MILLER & NEOGI, 1985).

Alterações na temperatura da solução, na concentração do tensoativo, presença de aditivos na solução e grupos estruturais do tensoativo podem causar alterações no tamanho e na forma das micelas (ROSEN, 1989)

A cmc diminui com o aumento do tamanho da porção hidrofóbica do tensoativo. Os grupos polares influenciam fortemente o valor da cmc., sendo que os tensoativos não iônicos possuem cmc mais baixas do que os tensoativos iônicos. A diferença na cmc entre os tipos iônicos (aniônicos e catiônicos) é pequena (MILLER & NEOGI, 1985).

A concentração de moléculas de tensoativo ionizado na forma de monômeros em solução, em concentrações acima da cmc, não é constante mas está em equilíbrio com as moléculas das micelas (LINDMAN, 1984).

As micelas formadas por tensoativos aniônicos permanecem com forma mais ou menos esférica em uma ampla faixa de concentração acima da cmc e tornam-se cilíndricas à medida que a concentração continua a aumentar. Em concentrações ao redor de 20% a 30% em peso, uma nova fase surge em solução apresentando birrefringência e alta viscosidade. Esta fase é formada por muitas micelas cilíndrica longas, paralelas e em uma organização hexagonal e apresenta uma estrutura de cristal líquido, ou seja, possui estrutura ordenada, mas não verdadeiramente cristalina. É também conhecida como fase hexagonal ou “middle phase”. Em concentrações ainda mais elevadas de tensoativos em solução, há favorecimento para a organização das moléculas na forma de bicamadas e outra estrutura de cristal líquido, conhecida como fase lamelar. As fases lamelar e

hexagonal se formam em concentrações elevadas de tensoativos em solução, quando a água presente é insuficiente para preencher os espaços entre micelas esféricas ou cilíndricas (ATTWOOD & FLORENCE, 1985; MILLER & NEOGI, 1985).

A solubilização é uma propriedade dos tensoativos diretamente relacionada à formação de micelas. É definida como a dissolução espontânea de uma substância sólida, líquida ou gasosa, em um solvente formando uma solução termodinamicamente estável com reduzida atividade termodinâmica do material solubilizado. A solubilização ocorre através de interação com as micelas do tensoativo presentes no solvente (ATTWOOD & FLORENCE, 1985; MILLER & NEOGI, 1985).

A representação gráfica da quantidade de um material solubilizado em função da concentração de tensoativo em solução, mostra que a solubilidade aumenta de forma aproximadamente linear com a concentração do tensoativo, acima de uma determinada concentração. Esta concentração é a cmc do tensoativo, indicando que a solubilização é um fenômeno micelar (ROSEN, 1989).

Quando as micelas formadas atingem diâmetro superior a 4 ou 5 nm, a fase resultante é freqüentemente chamada de microemulsão (MILLER & NEOGI, 1985).

As emulsões, ao contrário das microemulsões não são termodinamicamente estáveis, mas podem ser cineticamente estáveis. A emulsificação, que é a dispersão de um líquido em outro no qual ele não é solúvel, difere da solubilização pelo fato de que, na solubilização, o material solubilizado permanece na mesma fase da solução solubilizante e na emulsão forma uma fase separada e descontínua. O tamanho das gotículas formadas por tensoativo e fase interior apresenta um tamanho superior ao observado para as microemulsões, estando ao redor de 1 μm (LOMAX, 1996; MILLER & NEOGI, 1985).

3.7.2. Interações com a pele

A interação de tensoativos com a pele já está bem documentada na literatura (ANANTHAPADMANABHAN, *et al.*, 1996; FROEBE *et al.*, 1990; SCHEUPLEIN & ROSS, 1970; ASHTON *et al.*, 1992; SINGER, 1985; BARRY, 1983; LODÉN, 1990; DYKES, 1998; PATIL *et al.*, 1995).

Os tensoativos, assim como outras substâncias em solução, podem interagir com a pele através da deposição sobre a superfície do *stratum corneum*, da solubilização dos compostos da superfície ou do interior do *stratum corneum* ou através do transporte para ou através do *stratum corneum*. Os tensoativos em solução apresentam um comportamento físico-químico complexo no qual a principal característica é a formação de micelas (COOPER & BERNER, 1985).

As formulações de produtos para uso tópico são freqüentemente compostas com a utilização de tensoativos, que exercem efeito na estabilidade e na aparência dos produtos (ASHTON *et al.*, 1988).

Os tensoativos são ainda largamente empregados na formulação de produtos para a higiene pessoal aplicados à limpeza diária da pele, onde atuam na remoção de material particulado estranho, microorganismos, secreções corporais e excreções. Este material precisa ser removido da superfície da pele tanto por razões biológicas quanto culturais (DYKES, 1998).

A exposição excessiva da pele à solução de tensoativo sempre leva a reações de irritação cutânea tais como dermatites, caracterizadas clinicamente por eritema e descamação da pele, podendo ocorrer rupturas e fissuras em casos extremos. Outros sintomas menos intensos incluem o ressecamento e a adstringência da pele, que podem representar desconforto, em especial na face. A sensibilidade varia de indivíduo para indivíduo e de região para região do corpo (DYKES, 1998).

O *stratum corneum* tem estrutura bifásica, formada por corneócitos ricos em α - queratina, circundados por uma matriz lipídica. Os corneócitos possuem um envelope celular composto por proteínas e lipídeos, alguns covalentemente ligados. Para que uma molécula de tensoativo possa interagir com as regiões internas do *stratum corneum*, ricas em proteína, deve haver a difusão através da

matriz lipídica. A estrutura do *stratum corneum* e as características conformacionais da membrana proteica do corneócito limitam o acesso dos tensoativos a todos os sítios de ligação potenciais na queratina. Existem forças de coesão que mantêm a estrutura do *stratum corneum* unida, incluindo as forças envolvidas na manutenção conformacional das proteínas. A ligação dos tensoativos às regiões protéicas do *stratum corneum* pode induzir forças eletrostáticas repulsivas que, ao atingirem um ponto crítico, superam as forças de coesão das proteínas (ANANTHAPADMANABHAN *et al.*, 1996).

A α - queratina possui grupos iônicos positivos e negativos ligados à cadeia polipeptídica, além de possuir também cadeias laterais hidrofóbicas. Todos estes grupos podem atuar como sítios de ligação para compostos iônicos ou com porções hidrofóbicas, como os tensoativos. Em geral, quando uma molécula de tensoativo entra em contato com uma proteína, a porção iônica do tensoativo interage com o grupo iônico de carga oposta presente na proteína, formando um par iônico e a porção apolar do tensoativo tende a se direcionar para a região hidrofóbica da proteína, formando uma interação hidrofóbica; a intensidade destas interações é proporcional ao tamanho da cadeia apolar ou hidrofóbica do tensoativo (BREUER, 1979).

Assim, a interação dos tensoativos com o *stratum corneum* envolve uma combinação de ligação iônica do grupo hidrofílico do tensoativo com interações hidrofóbicas das porções apolares das moléculas com as proteínas (RHEIN *et al.*, 1986).

O grau de interação dos tensoativos em solução com a pele dependem da concentração do tensoativo na solução da estrutura química do tensoativo, do tempo de contato e do pH da solução (ANANTHAPADMANABHAN *et al.*, 1996; SCHEUPLEIN & ROSS, 1970).

O contato de amostras de *stratum corneum* humano isolado com solução de tensoativo provoca a expansão do tecido, com aumento nas dimensões superior ao observado após exposição à água pura. A expansão ocorre no comprimento, na largura e na espessura do *stratum corneum* (RHEIN *et al.*, 1986; BREUER, 1979).

O mecanismo proposto para a expansão do *stratum corneum* por tensoativo baseia-se na presença do ânion do tensoativo no interior da α - queratina. Ocorre modificação na estrutura da α - queratina, que sofre um desenrolamento dos filamentos formando a β -queratina e expandindo a membrana (SCHEUPLEIN & ROSS, 1970).

A expansão, medida como a % de aumento do comprimento de porções do *stratum corneum* , cresce rapidamente com o aumento da concentração do tensoativo na solução, até atingir a cmc do tensoativo, quando os incrementos na expansão são menos significativos. Este comportamento sugere saturação da membrana na região da cmc indicando que a expansão do *stratum corneum* decorre da interação com os monômeros ou espécies sub-micelares do tensoativo. Em concentrações acima da cmc., as micelas existentes em solução são possivelmente muito grandes para permear através da região lipídica do *stratum corneum* e interagir com a queratina (RHEIN *et al.*, 1986; BREUER, 1979).

Porém, em estudos de adsorção de tensoativos aniônicos marcados com ^{14}C (lauril sulfato de sódio e lauroil isotionato de sódio) utilizando *stratum corneum* humano e *stratum corneum* de cobaias sem pelo, foi observado aumento da quantidade adsorvida pelo *stratum corneum* quando soluções de tensoativos em concentração acima da cmc foram utilizadas, indicando uma possível contribuição das micelas no processo de ligação dos tensoativos ao *stratum corneum*. É provável que as micelas atuem na solubilização de lipídeos levando à exposição de novas regiões de ligação na queratina. A contribuição das micelas no processo de interação, porém, ainda não está totalmente esclarecido no momento (ANANTHAPADMANABHAN *et al.*,1996).

A estrutura do tensoativo, incluindo o tipo iônico influencia na ligação do *stratum corneum* . A extensão da ligação depende da natureza do grupo iônico e do comprimento da cadeia hidrofóbica (BREUER,1979; SINGER,1985)

Para uma série homóloga de tensoativos aniônicos, a interação máxima ocorre para a cadeia C 12. Embora a interação hidrofóbica entre a queratina e a porção hidrofóbica do tensoativo aumente para cadeias mais longas, as cadeias

carbônicas com tamanho superior a C12-C14 são muito grandes para penetrar no *stratum corneum* (RHEIN *et al.*, 1986; BREUER, 1979; SINGER, 1985).

A presença de insaturações ou ramificações na molécula de tensoativo também influencia a intensidade de ligação com o *stratum corneum*. As ramificações dificultam a penetração no *stratum corneum*; a insaturação torna a molécula mais solúvel na matriz lipídica facilitando o acesso às regiões proteicas (WU *et al.*, 1996; RHEIN *et al.*, 1986)

A etoxilação da molécula de tensoativo reduz a interação com o *stratum corneum*; para uma série homóloga de alquil sulfatos C12-C14, o aumento do grau de etoxilação reduz a capacidade de ligação ao *stratum corneum*, até a presença de 6 moles de óxido de etileno; acima deste número não são observadas diferenças na intensidade de interação. A etoxilação reduz a cmc do tensoativo, reduzindo a quantidade de monômeros livres para a interação. A etoxilação também leva a um aumento do tamanho da molécula, dificultando a penetração na matriz lipídica (RHEIN *et al.*, 1986).

Misturas de aniônicos e anfóteros apresentam menor capacidade de ligação com o *stratum corneum* do que a observada para o aniônico puro, possivelmente devido à competição pelos sítios de ligação na queratina, à redução da cmc e a outras interações entre as duas moléculas de tensoativos, reduzindo a fração livre (RHEIN *et al.*, 1986).

O tipo iônico tem influência na capacidade do tensoativo de expandir o *stratum corneum*. Os tensoativos não iônicos e catiônicos causam uma expansão mínima em comparação aos aniônicos (RHEIN *et al.*, 1986).

O pH das soluções de tensoativo pode influenciar na intensidade da interação com o *stratum corneum*. A queratina tem ponto isoelétrico ao redor de pH 5 e acima deste pH, a carga residual negativa da proteína aumenta com o aumento do pH (ANANTHAPADMANABHAN *et al.*, 1996).

Para os tensoativos aniônicos, o aumento de pH reduz as forças de interação eletrostática entre a queratina negativamente carregada e a porção aniônica da molécula (ANANTHAPADMANABHAN *et al.*, 1996).

Em pH neutro, a porção hidrofóbica do tensoativo aniônico interage com os sítios hidrofóbicos da queratina, deixando expostos os grupos polares da molécula, carregados com carga negativa, criando sítios adicionais na membrana proteica, resultando em forças de repulsão que levam à separação da matriz proteica expondo sítios de ligação para a água e provocando a expansão do *stratum corneum*. A alteração da conformação da queratina de estrutura α para β está possivelmente envolvida no processo de expansão do *stratum corneum* como consequência de desestabilização da estrutura da proteína pelo excesso de carga negativa gerado pelos tensoativos aniônicos (BREUER, 1979; SCHEUPLEIN & ROSS, 1970).

Na condição de pH neutro, a porção polar dos tensoativos catiônicos, carregada com carga positiva, é atraída por forças eletrostáticas pelo excesso de sítios negativos da queratina, deixando exposta a porção apolar da molécula e criando sítios apolares que tornam a superfície mais hidrofóbica. Por esta razão os tensoativos catiônicos não provocam a expansão do *stratum corneum*. (SCHEUPLEIN & ROSS, 1970)

De forma análoga, porém inversa, em pH ácido a queratina apresenta carga residual positiva. Os tensoativos aniônicos são atraídos por forças eletrostáticas com maior intensidade pelos sítios catiônicos da proteína, expondo a porção hidrofóbica da molécula, que tende a repelir a água, resultando em menor expansão do *stratum corneum*. Da mesma forma os tensoativos catiônicos causam maior expansão do *stratum corneum* em pH mais ácido (BREUER, 1979).

A interação dos tensoativos com as proteínas do *stratum corneum* é um processo reversível dependendo do tempo de exposição e da concentração do tensoativo em solução (SCHEUPLEIN & ROSS, 1970)

A expansão do *stratum corneum* provocada pela exposição à solução de estearato de sódio a 0,26% por 1 h é reversível após a imersão em água destilada por uma noite. Porém, exposições mais prolongadas (> 24 h) com soluções de maior concentração (>2%) provocam a ruptura irreversível de *stratum corneum* (RHEIN *et al.*, 1986).

Estudos "*in vitro*" da permeabilidade da água marcada com trítio ($^3\text{H}_2\text{O}$) utilizando pele humana, foram realizados para avaliar o efeito do laurato de sódio sobre a integridade da membrana. O aumento da permeabilidade indica aumento do coeficiente de difusão da membrana. A avaliação mostrou que o aumento da permeabilidade é contínuo ao longo do tempo, tendo início de 2 a 6 horas após o contato. A recuperação da permeabilidade original da membrana após a retirada do tensoativo só ocorreu para tempos de contato curtos e soluções em concentração diluídas de tensoativo (1%) (SCHEUPLEIN & ROSS, 1970).

A extração de lipídeos inter-corneocitários pelos tensoativos ainda não foi claramente demonstrada, porém em razão das propriedades solubilizantes destes compostos, esta suposição persiste na literatura (FROEBE *et al.*, 1990; VADDI *et al.*, 2001).

Estudos "*in vitro*" relativos à quantidade e ao tipo de lipídeos extraídos do *stratum corneum* humano pela ação do lauril sulfato de sódio e do dodecilbenzeno sulfonato de sódio foram realizados. Porções do *stratum corneum* foram incubadas com soluções de cada um dos tensoativos, em concentrações entre 0,01% e 2,0%, compreendendo uma faixa acima e abaixo da cmc dos tensoativos. Os lipídeos foram posteriormente extraídos das soluções aquosas com o sistema solvente clorofórmio-metanol, 2%; a identificação foi feita por cromatografia em camada delgada e a quantificação através da densitometria de varredura. Quantidades detectáveis de lipídeos foram extraídas apenas em concentrações acima da cmc (FROEBE *et al.*, 1990).

Ambos os tensoativos removeram colesterol, ácidos graxos livres e seus ésteres. Concentrações mais elevadas extraíram maior quantidade de lipídeos. Nenhum tensoativo extraiu triglicerídeos ou ceramidas que, juntamente com o colesterol e os ácidos graxos livres, são componentes majoritários dos lipídeos do *stratum corneum*. As quantidades extraídas foram pequenas, representando apenas uma fração do total dos lipídeos do *stratum corneum*. Na concentração de 2,0%, o dodecil benzeno sulfonato de sódio removeu até 7,0% do total de lipídeos e o lauril sulfato de sódio até 4,0%. A exposição do *stratum corneum* a estes tensoativos não afetou de forma significativa o conteúdo lipídico do *stratum*

corneum. A localização das ceramidas na estrutura das bicamadas lipídicas possivelmente não facilita a solubilização pronta pela ação dos tensoativos, como ocorre com os ácidos graxos livres e o colesterol. A extração dos lipídeos do *stratum corneum* com uma série de solventes não afeta a subsequente ligação do lauril sulfato de sódio (^{35}S), indicando que o principal ponto de interação do tensoativo é a adsorção às proteínas (FROEBE *et al.*, 1990).

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi utilizada no estudo dos efeitos da água e de soluções diluídas de lauril sulfato de sódio sobre a ultra-estrutura das bicamadas lipídicas do *stratum corneum* de porco. Amostras do *stratum corneum* foram colocadas em contato com solução de lauril sulfato de sódio na concentração de 2,3 mM e com água pura, em células de difusão por períodos de 1 h, 6 h e 24 h. As soluções diluídas de tensoativo provocaram ruptura do *stratum corneum*, manifestada pela degradação dos desmossomos e pelo rompimento das bicamadas lipídicas, levando a delaminação progressiva das bicamadas e resultando em aumento da permeabilidade da pele. A exposição prolongada à água também levou à ruptura das bicamadas, similar à observada para as soluções de tensoativos, embora de forma mais lenta. Em ambos os casos as bicamadas lipídicas formaram agregados. A semelhança entre os efeitos provocados pela água e por soluções dos tensoativos indica que a ruptura da estrutura das bicamadas lipídicas provocada por soluções diluídas de tensoativos, pode ser decorrente da alteração da concentração de água na região intercelular, induzida pelo tensoativo (WARNER *et al.*, 1999).

O contato prolongado (24 h) da pele sob oclusão de soluções de lauril sulfato de sódio leva à inflamação cutânea, com aumento da perda transepidérmica de água. Este aumento pode ser observado após uma simples lavagem da pele com soluções de tensoativos e aumenta após lavagens repetidas. A ligação inicial do tensoativo com o *stratum corneum* pode facilitar a permeação mais profunda das moléculas até a epiderme viável, podendo causar danos às células ou mesmo lise celular, com o desenvolvimento de reações de irritação observável a nível clínico (DYKES, 1998).

3.7.3. Ação dos tensoativos como promotores de permeação

As interações entre os tensoativos e a pele resultam em geral em um aumento na permeabilidade do tecido (ZATZ,1991).

As alterações na permeabilidade variam em grau para diferentes tensoativos. Algumas alterações estão associadas às mudanças na conformação de proteínas do *stratum corneum* e com sua expansão ou com modificações na estrutura das bicamadas lipídicas. (COOPER & BERNER, 1985; WARNER *et al.*,1999)

Vários mecanismos podem atuar de forma simultânea em experimentos realizados para avaliar a influência de tensoativos na permeabilidade cutânea. Qualquer interação do fármaco com o tensoativo ou com o veículo que leve à redução da atividade termodinâmica do permeante, tal como complexação ou solubilização micelar, reduz o fluxo de permeação. Para evitar este tipo de interação deve-se trabalhar com solução saturada do fármaco. Outra abordagem possível para solucionar o problema é a utilização de pré- tratamento da membrana permeante com solução do tensoativo, seguida da aplicação do fármaco a ser avaliado. Desta forma não existe efeito do tensoativo sobre as propriedades físico-químicas da solução de fármaco, não afetando suas propriedades termodinâmicas. Assim, diferenças no comportamento do fluxo de permeação refletem alterações na estrutura do *stratum corneum* decorrentes da ação do tensoativo (ZATZ,1991).

Os tensoativos aumentam o transporte de moléculas polares e exercem pouco efeito sobre a permeação de moléculas não-polares (COOPER,1984).

Muitos fármacos existentes na atualidade não possuem as características físico-químicas necessárias que favoreçam a absorção eficiente quando aplicados em formas farmacêuticas de uso tópico; assim, níveis sanguíneos necessários para a ocorrência de efeito terapêutico não são atingidos quando da aplicação destes fármacos pela via tópica. Por esta razão, pesquisas relativas ao aumento da penetração e da permeação de fármacos através da pele tem atraído a atenção de muitos pesquisadores (WALTERS , WALKER & OLEJNIK,1988).

Considerando a natureza bifásica do *stratum corneum*, dois mecanismos possíveis para a atividade dos tensoativos como promotores de permeação de fármacos podem ser abordados. A primeira possibilidade envolve a penetração do tensoativo na fase intercelular lipídica, provocando um aumento na fluidez da barreira lipídica que resulta na diminuição da resistência à permeação. Não ocorrendo remoção de lipídeos, este efeito deve ser reversível, cessando com a retirada da molécula de tensoativo da estrutura lipídica. O aumento da fluidez é decorrente da interação das cadeias alquílicas na região de hidrocarbonetos das bicamadas lipídicas, causando sua desorganização (CASTELLANO *et al.*,2000).

A segunda possibilidade está relacionada à penetração do tensoativo na matriz intracelular, seguida da interação e ligação aos filamentos de queratina. A estrutura molecular do tensoativo parece ser um requisito necessário para este tipo de interação, o que pode explicar a inatividade dos tensoativos com cadeias ramificadas ou estruturas aromáticas (WALTERS, WALKER & OLEJNIK,1988; SINGER,1985; CASTELLANO *et al.*,2000; SHOKRI *et al.*,2001).

Os solventes não polares aumentam a permeabilidade da pele através da remoção de lipídeos do *stratum corneum*; a incorporação posterior dos lipídeos restaura total ou parcialmente a barreira cutânea. Alguns solventes aumentam a permeabilidade da pele sem provocar a extração de lipídeos. O exemplo mais importante desta classe é a água; a hidratação pode aumentar de forma significativa a permeabilidade do *stratum corneum*. Outros solventes polares como o DMSO e a dimetilformamida (DMF) também aumentam a permeabilidade do *stratum corneum* intensificando a difusão através da membrana na presença do solvente. Nestes casos, as substâncias citadas são aplicadas puras e em altas concentrações; soluções diluídas com concentrações da ordem de 0,1-0,5 M de DMSO ou DMF não atuam sobre a permeabilidade da pele. Em contraste, os tensoativos são eficientes em soluções diluídas (SCHEUPLEIN & ROSS,1970).

A seletividade do efeito de promoção da permeação para moléculas polares sugere que os tensoativos alterem a permeabilidade de forma mais intensa pela ação sobre a porção protéica do *stratum corneum* (COOPER & BERNER,1985).

Os tensoativos iônicos exercem efeito sobre o fluxo de permeação do *stratum corneum* superior ao observado para os tensoativos não iônicos. Porém, a ação observada para os não iônicos é mais imediata. Esta observação é concordante com a visão de que o efeito de um composto sobre a permeabilidade da pele só ocorre após sua penetração no *stratum corneum*; os tensoativos iônicos devem penetrar esta barreira lipídica de forma mais lenta do que os tensoativos não iônicos de estrutura similar e portanto levar mais tempo para exercer sua ação (ASHTON *et al.*, 1992).

Monocamadas formadas por moléculas anfifílicas adsorvidas à superfície de uma fase líquida podem ser utilizadas como modelo “*in vitro*” para membranas biológicas, que são formadas por duas monocamadas lipídicas paralelas com as cadeias hidrofóbicas organizadas frente a frente. O filme formado pelo espalhamento das moléculas em uma monocamada sobre um líquido (geralmente a água) pode ser submetido à compressão por meio de uma barreira móvel e a força aplicada pode ser medida por uma balança de torção. Este equipamento é conhecido como balança de Langmuir. A força de compressão por unidade de área ocupada na monocamada é denominada pressão da superfície, π , que mede a redução da resistência à expansão da monocamada. A barreira móvel é levada a diferentes posições; a área ocupada pela monocamada é medida e a correspondente pressão da superfície é medida. A pressão da superfície em função da área do filme pode ser representada graficamente e fornece informações sobre o estado de agregação das moléculas na monocamada (MARTIN, 1993).

Equipamento similar foi utilizado em estudos da interação do laurato de sorbitan com monocamadas de lipídeos similares aos presentes no *stratum corneum*, em comparação com a Azone[®]. A Azone[®] é um promotor de permeação que exerce seu efeito através da fluidificação dos lipídeos do *stratum corneum*; esta ação é em parte decorrente da cadeia C12, que dá ao composto a capacidade para inserir entre as cadeias carbônicas nas bicamadas lipídicas. A técnica das monocamadas oferece uma forma de examinar a interação entre promotores de permeação e lipídeos do *stratum corneum*, inacessíveis para uma

experimentação direta. Vários modelos de monocamadas formadas de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres foram utilizadas em concentrações similares às do *stratum corneum* humano. As curvas obtidas a 25 °C da pressão da superfície (Π) x área da molécula indicaram que o laurato de sorbitan modifica o estado de condensação das ceramidas e do colesterol, aumentando a fluidez da monocamada; não foram observados efeitos nas monocamadas formadas por ácidos graxos. O laurato de sorbitan e a Azone® mostraram resultados estatisticamente similares na compressibilidade das monocamadas. Ambos atuam sobre os lipídeos intercelulares do *stratum corneum* promovendo a fluidez e portanto, aumentando a difusão de moléculas (CASTELLANO *et al.*, 2000).

Foram realizados estudos “*in vitro*” para a avaliação da ação de tensoativos sobre penetração do Captopril em pele de coelho utilizando os tensoativos catiônicos cloreto de benzalcônio e cloreto de cetilpiridínio, o tensoativo aniônico lauril sulfato de sódio e os tensoativos não iônicos etoxilados com 20 moles de óxido de etileno (OE): monolaurato de sorbitan, monopalmitato de sorbitan, monoestearato de sorbitan e monooleato de sorbitan. A ordem de efeito sobre o fluxo de permeação obtido foi, em ordem crescente, tensoativo aniônico > tensoativos catiônicos > tensoativos não iônicos. O aumento do fluxo de penetração observado para o lauril sulfato de sódio foi 58 vezes maior que o controle, conduzido sem a utilização de tensoativos; o incremento observado para os catiônicos foi 29 a 37 vezes maior que o controle e, entre os não iônicos, o monolaurato de sorbitan etoxilado apresentou o maior aumento no fluxo. Na comparação entre os resultados obtidos para o monoestearato e monooleato de sorbitan etoxilados, o monooleato mostrou efeito maior, o que os autores atribuem possivelmente à presença de insaturação na molécula do éster de ácido oleico, que aumenta a solubilidade da cadeia graxa e a capacidade de alterar a organização dos lipídeos do *stratum corneum* (WU *et al.*, 1996).

Os polissorbatos ou ésteres de sorbitan etoxilados são uma classe de tensoativos de interesse potencial como promotores de permeação devido às suas características de segurança, como baixa toxicidade e quase ausência de irritabilidade, além de ampla aceitação por agências regulatórias internacionais.

Foram realizados experimentos de permeação "*in vitro*" com membrana inerte e com pele de camundongos sem pelo para o monolaurato de sorbitan etoxilado com 4 moles de OE e 20 moles de OE e para o monooleato de sorbitan etoxilado com 5 moles de OE e 20 moles de OE. O efeito de promoção da permeação foi realizado utilizando o metanol como modelo de composto hidrofílico e octanol como modelo de composto lipofílico. O efeito de promoção da permeação foi observado apenas para o metanol, hidrofílico, para o qual os tensoativos mais lipofílicos monolaurato de sorbitan 4 moles de OE e monooleato de sorbitan 5 moles de OE, indicando alteração da permeabilidade do *stratum corneum*. O efeito observado foi reversível (CAPPEL & KREUTER, 1991)

WU e colaboradores, em 1995 avaliaram os efeitos de tensoativos na permeação do Capsaicin, fármaco de ação hipotensiva, em testes "*in vitro*" com pele de rato em células de difusão. O mecanismo de promoção da permeação foi avaliado através de DSC. Os tensoativos avaliados foram cloreto de benzalcônio, lauril sulfato de sódio e laurato de sorbitan etoxilado (20 moles de OE), aplicados a 0,5% na solução do fármaco. Os experimentos de DSC foram realizados com o *stratum corneum* pré-tratado por 2 h com solução a 1% de cada tensoativo. O fluxo de permeação aumentou com a presença dos tensoativos na seguinte ordem: laurato de sorbitan etoxilado (20 moles de OE) < lauril sulfato de sódio < cloreto de benzalcônio. Os resultados foram consistentes com os perfis obtidos para as curvas de DSC, que indicaram efeito de desorganização do *stratum corneum* crescente na mesma ordem.

A influência da associação de iontoforese após pré-tratamento do *stratum corneum* humano com tensoativos e Azone[®] foi avaliada para a permeação de macromoléculas (Dextran). Os tensoativos utilizados foram brometo de dodecil trimetil amônio e lauril sulfato de sódio, ambos com cadeia carbônica C12. A penetração do Dextran no *stratum corneum* foi acompanhada em tempo real através de microscopia de excitação de fótons. Os resultados indicaram efeito positivo na promoção da penetração promovido pelo tensoativo catiônico seguido da iontoforese. O transporte passivo observado após pré-tratamento com brometo de dodecil trimetil amônio foi caracterizado pela distribuição da macromolécula na

região intercelular do *stratum corneum*; a aplicação de iontoforese suplementar resultou em captação da macromolécula também na região intracelular (GREWAL *et al.*, 2000)

O efeito do brometo de cetil trimetil amônio na permeação do haloperidol em pele humana "*in vitro*" foi avaliado através de estudos de difusão e FT-IR. O tensoativo catiônico foi utilizado nas concentrações de 0,1 ,0,3 e 0,6%. Os resultados indicaram que o aumento na permeação do fármaco era dependente da concentração do tensoativo. As alterações induzidas pelo tensoativo no *stratum corneum* foram estudadas por FT-IR. Observaram-se alterações nas bandas de amida I e amida II, possivelmente em consequência da remoção de lipídeos pelas micelas do tensoativo, uma vez que as três concentrações utilizadas estão acima da cmc. Os autores atribuem o efeito dose-dependente à extração de lipídeos do *stratum corneum*. Em concentrações acima da cmc, a quantidade de monômero livre é constante e a capacidade de solubilização e remoção dos lipídeos do *stratum corneum* aumenta com o aumento da concentração de micelas (VADDI *et al.*, 2001).

A influência de 14 tensoativos não iônicos na permeação dérmica do Tenoxican foi avaliada "*in vitro*" utilizando pele de cobaias em células de difusão. Foram utilizados tensoativos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica e diferentes graus de etoxilação. Os autores identificaram uma relação entre o EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) do tensoativo e o efeito de promoção da permeação. Os tensoativos mais lipofílicos exerceram efeito mais acentuado no aumento da permeação comparativamente aos tensoativos mais hidrofílicos. Os tensoativos com carácter mais lipofílico parecem ter grande afinidade com a pele, resultando no aumento da permeabilidade. Os resultados indicaram aumentos do fluxo de permeação do fármaco Tenoxican da ordem de 2 a 4 vezes superior ao observado na ausência dos tensoativos. Os autores citam como fatores fundamentais para o efeito de aumento da permeabilidade dérmica a afinidade do tensoativo pelo *stratum corneum* e sua penetração na estrutura do *stratum corneum* (ENDO *et al.*, 1996).

Outro estudo utilizando uma série de 17 tensoativos não iônicos etoxilados com cadeias carbônicas superiores a C12 e números de moles de OE na molécula entre 2 e 100 foi realizado para a avaliação do efeito destes compostos sobre a permeação do Ibuprofen. Os testes foram realizados em células de difusão utilizando pele de rato, com soluções contendo 5% do fármaco e 15% de cada tensoativo. Para um grau de etoxilação constante de 2 moles de OE na molécula, a ordem de aumento do fluxo observado referente ao tamanho das cadeias carbônicas foi $C12 > C18:1 > C18 > C16$. Para um grau de etoxilação constante de 10 moles de OE, a ordem foi $C18 > C16+18:1 = C16$. Observou-se que tanto o tamanho da cadeia carbônica quanto o grau de etoxilação da molécula influencia o efeito de aumento do fluxo de penetração promovido pelos tensoativos não iônicos etoxilados (PARK *et al.*, 2000).

A influência do grupo polar de tensoativos não iônicos laurato de sorbitan e laurato de sorbitan etoxilado sobre a permeação de compostos de diferentes lipofilicidades foi avaliada utilizando pele de ratos Wistar. A Azone[®] foi considerada como promotor de referência. Os compostos avaliados, em ordem crescente de lipofilicidade foram 5-fluorouracil, antipirina, 2-fenil etanol e 4 fenilbutanol. A influência da concentração do promotor no aumento da permeabilidade mostrou ser dependente do caráter lipofílico do permeante; para compostos mais hidrofílicos uma maior concentração do promotor leva a maior permeação, porém para compostos mais lipofílicos, não foram detectadas diferenças significativas entre o incremento da permeabilidade e a concentração do promotor. O laurato de sorbitan apresentou comportamento similar ao da Azone[®], indicando possível atuação também no aumento da fluidez dos lipídeos do *stratum corneum*. O efeito do laurato de sorbitan etoxilado foi inferior ao observado para o produto não etoxilado. Os autores sugerem que o volume molecular maior do produto etoxilado dificulte a penetração das moléculas nas bicamadas lipídicas do *stratum corneum* e que sua ação seja relacionada à extração de lipídeos, modificando a composição da membrana e favorecendo a permeação (LOPEZ *et al.*, 2000).

A avaliação da influência do tamanho da cadeia de óxido de etileno de uma série de tensoativos não iônicos na absorção cutânea do Piroxicam a partir de cataplasma foi conduzida através de testes “*in vivo*” no dorso de cobaias. A influência do pH e do propilenoglicol também foram avaliados. Os tensoativos utilizados foram álcool láurico etoxilados (2, 9 e 21 moles de OE), álcool cetílico etoxilado (2, 5, 7, 10, 15 e 20 moles de OE), álcool oleílico etoxilado (2, 10 e 20 moles de OE) e álcool estearílico etoxilado (4, 10 e 25 moles de OE). Os cataplasmas formulados com 5% de cada tensoativo permaneceram por 8 h no dorso dos animais e o Piroxicam foi dosado no sangue. Os autores observaram a existência de uma relação parabólica entre o aumento do fluxo do fármaco e o tamanho da cadeia de óxido de etileno, com efeitos máximos para as cadeias entre 5 e 15 moles de OE (OKUYAMA *et al.*, 1999).

SHIN e colaboradores, em 2001 realizaram estudo similar. Avaliaram a influência dos tensoativos não iônicos álcool láurico etoxilado (23 moles de OE), álcool oleílico etoxilado (2 moles de OE) e álcool estearílico etoxilado (2 moles de OE) na penetração do Piroxicam a partir de formulações de gel em pele de rato contendo ou não os tensoativos; os tensoativos foram utilizados na concentração de 5% e os experimentos foram conduzidos com pele total. Decorridas 24 h de contato, o gel foi removido da superfície da pele e as amostras foram fixadas e coradas com hematoxilina-eosina para análise microscópica. Os três tensoativos avaliados apresentaram efeito positivo sobre o fluxo do Piroxicam. Para a elucidação do mecanismo de ação dos tensoativos, utilizaram além do exame histológico, a análise térmica. Amostras da pele foram submetidas a pré-tratamento com soluções dos tensoativos a 5% em propilenoglicol por 12 h, o *stratum corneum* foi removido e submetido a avaliação por DSC. Já foi descrito na literatura que o *stratum corneum* humano apresenta curvas de DSC com picos próximos a 65, 75 e 105 °C referentes a transições térmicas envolvendo os lipídeos intercelulares, o complexo proteína-lipídeo e a queratina, respectivamente. A curva obtida para o *stratum corneum* (rato) não tratado mostrou um pico pequeno e largo próximo a 57,5 °C. Quando comparado com o *stratum corneum* não tratado, a amostra incubada com o álcool oleílico etoxilado

(2 moles de OE) mostrou um pico largo próximo a 45,4 °C; observou-se transição térmica com início em 30,5 °C. As mudanças no perfil térmico observadas após o tratamento com o tensoativo sugerem sua incorporação no *stratum corneum* resultando em redução da organização da estrutura. O *stratum corneum* das amostras de pele pré-tratadas com o gel contendo o Piroxicam e tensoativo mostrou-se mais frouxo e com espaços intercelulares maiores do que o observado para o controle (tratamento com salina) .

Tensoativos com diferentes estruturas químicas foram utilizados como promotores de permeação para o Diazepan em estudos "*in vitro*" com pele de rato. Os tensoativos utilizados foram lauril sulfato de sódio, brometo de cetil trimetil amônio, cloreto de benzil alquil amônio e laurato de sorbitan etoxilado (20 moles de OE) em concentrações entre 0 e 5%, aplicados em solução saturada de Diazepan. Os resultados mostraram que todos os tensoativos avaliados aumentaram o fluxo de penetração do fármaco e o efeito é diretamente proporcional à concentração do tensoativo. A maior taxa de aumento de fluxo foi observada para o lauril sulfato de sódio na concentração de 5% (SHOKRI, 2001).

A penetração simultânea do lauril sulfato de sódio e da água no *stratum corneum* humano "*in vitro*" foi avaliada utilizando o composto marcado com ³⁵S e água marcada com ³H. Foram utilizadas três concentrações de tensoativo: 0,1%, 1,0% e 10%. A cmc para o lauril sulfato de sódio é 0,24 %. A quantidade que penetrou na pele foi 50 a 100 vezes maior para a concentração de 1,0% do que para 0,1%; o aumento de 1,0 para 10,0% aumentou a penetração em 10 vezes. Não se observou relação linear entre a quantidade penetrada e a concentração do tensoativo. O aumento da penetração em concentrações acima da cmc pode ser explicado pela quantidade crescente de monômeros livre com o aumento da concentração, uma vez que a penetração de micelas não ocorre devido ao seu tamanho. O aumento da permeabilidade à água foi paralela ao aumento da penetração do lauril sulfato de sódio. A taxa de penetração também aumentou com o tempo, indicando danos crescentes ao *stratum corneum* (LODÉN, 1990).

4. Material e Métodos

4.1. Material

4.1.1 Tensoativos

- Tensoativo aniônico: lauril sulfato de sódio – cedido pela Stepan Química Ltda.

- nome comercial: Stepanol ME-Dry
- nome químico: lauril sulfato de sódio
- denominação: sal sódico de lauril sulfato
- número CAS: 151-21-3
- fórmula empírica: $C_{12}H_{25}O_4S.Na$
- fórmula química: $CH_3(CH_2)_{10}CH_2OSO_3Na$
- sinônimo: dodecil sulfato de sódio
- peso molecular: 288,38
- ponto de fusão: 204-207 °C
- aspecto regulatório: aprovado pelo FDA para uso em produtos dentais, orais, tópicos e vaginais; US Pharmacopoeia; British Pharmacopoeia; Ph Eu Compliance

- Tensoativo catiônico: cloreto de cetil trimetil amônio – cedido pela Stepan Química Ltda.

- nome comercial: Ammonyx CETAC 50
- nome químico: cloreto de cetil trimetil amônio
- denominação: sal de amônio quaternário
- número CAS: 112-02-7
- fórmula empírica: $C_{19}H_{42}ClN$
- fórmula química: $C_{16}H_{33}(CH_3)_3NCl$
- sinônimo: cloreto de hexadecil trimetil amônio

- peso molecular: 320,01
- aspecto regulatório: aprovado pelo FDA para uso tópico

- Tensoativo não aniônico: álcool láurico etoxilado (12 moles de OE) – cedido pela Stepan Química Ltda.

- nome comercial: Polystep AE-128
- nome químico: álcool láurico etoxilado (12OE)
- denominação: Polietilenoglicol éter do álcool láurico
- número CAS: 3056-00-6
- fórmula empírica: $C_{36}H_{64}O_{13}$
- fórmula: $CH_3(CH_2)_{10}CH_2(OCH_2CH_2)_{12}OH$
- sinônimo: PEG 12 lauril éter
- peso molecular: 1199.57
- ponto de fusão: 41-45°C
- aspecto regulatório: FDA 21CFR § 177.2800

Quadro 1. Especificações dos tensoativos utilizados no experimento

ESPECIFICAÇÃO (*)	TENSOATIVOS		
	Aniônico (Stepanol ME DRY)	Catiônico (Ammonyx CETAC 50)	Não iônico (Polystep AE-128)
Aspecto a 25 °C	Pó branco	Líquido incolor	Líquido incolor
Ativo, %	95,80	50,52	-
Sólidos, %	-	-	77,3
pH	9,1 ^(a)	7,02 ^(b)	6,80 ^(c)
Alcalinidade livre , mg KOH/g	0,10	-	-
Amina livre, %	-	0,68	-

(*) dados extraídos dos certificados de análise do fabricante

(a) solução a 1% em água; (b) solução a 10% v/v em água; (c) solução a 5% em água/ isopropanol 1:1 v/v

4.1.2. Reagentes

- pele de muda das cobra – Jararaca (*Bothrops jararaca*) e Caninana (*Spilotes pullatus*) cedidas pelo Instituto Butantã
- papel de filtro quantitativo CAAL n. 1541
- fita adesiva Transpore 100m x 4,5 – marca 3M
- ácido cítrico mono-hidratado – Anidrol Produtos Químicos Ltda
- água desmineralizada

4.1.3. Equipamentos

- placas de Petri
- lâminas para microscopia
- balança analítica Mettler-Toledo modelo AB 204-S
- balança semi-analítica Mettler-Toledo modelo PB 3002-S
- desmineralizador Permution DE 1800 com pré-filtro
- pHmetro digital Micronal modelo B474
- aparelhos utilizados nas análises biofísicas são descritos em “métodos”

4.2. Métodos

4.2.1. Fluxograma dos experimentos

4.2.2. Preparo das soluções de tensoativo utilizadas para o tratamento da pele de muda de cobra

Foram preparadas soluções aquosas dos tensoativos nas concentrações de 50 g/L de matéria ativa (ou sólidos para o não iônico) e em concentração correspondente a 5% abaixo da cmc de cada tensoativo. O pH das dispersões dos tensoativos foi ajustado para 6,5 a 7,0 com solução de ácido cítrico a 10% (p/v) em água desmineralizada.

As cmc dos tensoativos consideradas foram :

- Lauril éter sulfato de sódio : $8,2 \times 10^{-3}$ M (em água, a 25 °C)
- Cloreto de cetil trimetil amônio : $1,3 \times 10^{-3}$ M (em água, a 30 °C)
- Álcool láurico etoxilado (12 moles de OE): $14,0 \times 10^{-5}$ M (em água, a 23 °C)

As concentrações finais das dispersões utilizadas são descritas no quadro 2, a seguir:

Quadro 2. Concentrações das dispersões dos tensoativos utilizadas

TENSOATIVO	CONCENTRAÇÃO (g/L em água)	
	Acima da cmc	5% abaixo da cmc
lauril sulfato de sódio	50	2,34
cloreto de cetil trimetil amônio	50	0,78
álcool láurico etoxilado (12 moles de OE)	50	0,21

4.2.3. Preparação da pele de muda de cobra para análises biofísicas

4.2.3.1. *Stratum corneum* íntegro

As porções ventrais das peles de muda das cobras Jararaca (*Bothrops jararaca*) e Caninana (*Spilotes pullatus*) foram recortadas com tesoura e lavadas em água corrente e colocadas em contato com as soluções dos tensoativos previamente preparadas, na concentração de 50 g/L em água, em placas de Petri. Os tempos de contato foram de 4 e 8 h. Decorridos os tempos indicados, as amostras foram retiradas das soluções e secas entre folhas de papel de filtro quantitativo sob leve compressão. As amostras foram prensadas entre duas lâminas para microscopia e permaneceram armazenadas em dessecador até o momento do uso.

Estas amostras foram utilizadas para os experimentos com PAS-FTIR, FT-Raman e DSC.

4.2.3.2. *Stratum corneum* após tratamento da superfície com fita adesiva

As porções ventrais da pele de muda da cobra Jararaca (*Bothrops jararaca*) foram recortadas com tesoura e lavadas em água corrente. Permaneceram imersas em água em placas de Petri por 1 h para re-hidratação. Após este período, foram retiradas, secas entre folhas de papel de filtro quantitativo sob leve compressão e deixadas à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida procedeu-se à realização de tratamento da pele com fita adesiva Transpore®, aplicando-se a fita sobre a superfície da amostra de pele com leve compressão e retirando-a em seguida, promovendo a remoção mecânica de camadas superficiais de células. Este procedimento é também conhecido como “tape

stripping”. Realizou-se o procedimento uma única vez. Em seguida as amostras foram colocadas em placas de Petri contendo as soluções dos tensoativos nas concentrações indicadas no quadro 2. Permaneceram em contato com as soluções por um pernoite (12 h). Decorridos os tempos indicados, as amostras foram retiradas das soluções e secas entre folhas de papel de filtro quantitativo, sob leve compressão. As amostras foram prensadas entre duas lâminas de microscopia e permaneceram armazenadas em dessecador até o momento do uso.

Estas amostras foram utilizadas para os experimentos com PAS-FTIR, FT-Raman e DSC.

4.2.4. Métodos Biofísicos

4.2.4.1. PAS-FTIR

A amostra foi cortada de forma adequada para preencher toda a área da célula e colocada na célula fotoacústica (Modelo MTEC 200). Em cima da amostra colocou-se uma tela de metal, de forma a evitar que esta se deslocasse durante a purga da célula. A seguir passou-se um fluxo de hélio durante 2 min na câmara para que fossem arrastadas as moléculas de vapor de água e de CO₂. Após selar a célula fotoacústica, fez-se vácuo no espectrômetro e as co-adições, as quais foram controladas pelo programa BOMEM PCDA.

O compósito de borracha e negro de fumo foi utilizado como referência. As condições utilizadas estão descritas a seguir:

- Amplificador: Ganho 4
- Resolução: 4 cm⁻¹
- Número de co-adições: 64

- Apodização: Hamming
- Faixa espectral: 400-4000 cm^{-1}
- Abertura: 10 mm
- Velocidade do espelho móvel: 0,05 cm s^{-1}

Os experimentos foram realizados no laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da USP.

4.2.4.2. FT-Raman

Na análise usou-se o espectrômetro Raman BRUKER RFS 100/S, software OPUS. As amostras tratadas foram acondicionadas no compartimento destinado à análise. Foram obtidas 256 co-adições correspondentes aos espectros das amostras. As condições do experimento foram as seguintes:

- Potência do laser: ~ 250 mW
- Resolução: 4 cm^{-1}
- Ganho: 4
- Abertura: 7 mm
- Os dados foram salvos entre 3500 a 200 cm^{-1}

Os experimentos foram realizados no laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da USP.

4.2.4.3. DSC

Na técnica do DSC, as amostras da pele de muda de cobra de aproximadamente 2 mg de massa secas foram seladas em um cadinho semi-hermético. As amostras foram submetidas às condições descritas a seguir utilizando-se o equipamento DSC 10 – Differential Scanning Calorimeter – TA Instruments.

Condições do experimento da calorimetria exploratória diferencial (DSC):

- Temperatura inicial: 25,00 °C
- Rampa de resfriamento: 20,00 °C min⁻¹ a 0 °C
- Isoterma: 5,00 min
- Rampa de aquecimento: 10,00 °C min⁻¹ a 160 °C
- Rampa de resfriamento: 20,00 °C min⁻¹ a 0 °C
- Isoterma: 5 min
- Rampa de aquecimento: 10,00 °C min⁻¹ a 160 °C
- Temperatura final: 25,00 °C

As temperaturas de transição foram determinadas considerando-se os valores mínimos dos picos endotérmicos observados nas curvas de aquecimento. As curvas de DSC foram construídas com os valores de fluxos de calor em função da temperatura.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a natureza bifásica do *stratum corneum* e a característica anfipática dos tensoativos, é possível supor a existência de dois mecanismos de ação pelos quais esta classe de compostos atue como promotor de permeação cutânea. A primeira abordagem considera a penetração do tensoativo na porção lipídica intercelular do *stratum corneum* que leva à desorganização das bicamadas e aumento da fluidez do sistema, facilitando a difusão de fármacos. Outra abordagem possível é a interação dos tensoativos com a queratina, favorecendo o afluxo de água ao tecido, aumentando a permeabilidade. A alteração da conformação da queratina de α -hélice para folha β é também um mecanismo de ação proposto para os tensoativos, uma vez que a estrutura β é menos compacta e torna-se mais permeável (WALTERS, WALKER e OLEJNIK, 1988; SINGER, 1985; CASTELANO *et al.*, 2000; FROEBE *et al.*, 1990).

Para que uma molécula de tensoativo possa interagir com a região protéica do *stratum corneum*, deve haver difusão pela matriz lipídica (ANANTHAPADMANABHAN *et al.*, 1996).

Estudos de absorção cutânea têm sido conduzidos com a utilização de vários modelos de membrana tais como pele de animais de experimentação, membranas artificiais e pele humana proveniente de cirurgias plásticas ou de cadáveres (LOPES & KANEKO, 2000).

A utilização da pele de muda de cobra para esta finalidade também tem sido reportada na literatura. É um modelo de membrana que apresenta similaridades com o *stratum corneum* humano em termos de espessura, conteúdo lipídico e permeabilidade a vários compostos (ITOH *et al.*, 1990a).

Embora a natureza geral das rotas de permeação de fármacos pelo *stratum corneum* tenham sido deduzidas indiretamente através de estudos do efeito de promotores de permeação sobre o fluxo de fármacos com diferentes perfis de solubilidade, a estrutura e a organização molecular destas rotas puderam ser conhecidas com o advento do desenvolvimento de técnicas instrumentais de alta

sensibilidade tais como Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, FT-Raman, PAS-FTIR, DSC entre outras (YOKOMIZO, 1997).

Frente ao exposto, os ensaios realizados envolveram a utilização de amostras de pele de muda de cobra íntegras das espécies *Bothrops jararaca* (Jararaca) e *Spilotis pullatus* (Caninana) e amostras de pele de muda de cobra da espécie *Bothrops jararaca* submetida a processo de remoção mecânica das camadas superficiais de células (camada de β -queratina) com fita adesiva.

RIGG & BARRY em 1990 estudaram a utilização de pele de muda de cobra como modelo de membrana em experimentos de permeação e concluíram que a camada mais externa de β -queratina, denominada camada β , pode representar uma barreira adicional à permeação de substâncias quando comparada ao *stratum corneum* humano e sugeriram sua remoção por extração mecânica com fita adesiva. Desta forma, as camadas mais internas ficam expostas, tornando a membrana mais similar ao *stratum corneum* humano e mais adequada para uso na avaliação da ação de promotores de permeação (RIGG & BARRY, 1990).

5.1. FT-Raman e PAS-FTIR

As técnicas de espectroscopia vibracional como FT-Raman e PAS-FTIR são úteis para o estudo de alterações provocadas por promotores de permeação sobre a estrutura e a organização do *stratum corneum*. O conhecimento do espectro característico das biomoléculas que compõem o *stratum corneum*, como as proteínas e os lipídeos, permite o estudo das interações entre estes sítios e promotores de permeação, identificadas por alterações nas bandas típicas, envolvendo variações na intensidade das bandas, deslocamento de bandas para números de onda diferentes do característico e alargamento das bandas.

Os efeitos induzidos pela ação de promotores de permeação sobre a matriz lipoprotéica do *stratum corneum* podem ser investigados pela técnica espectroscópica de FT-IR. A estrutura da queratina apresenta bandas de amida A da vibração de estiramento N-H em 3300 cm^{-1} , de amida I originária

principalmente da vibração de estiramento C=O em 1650 cm^{-1} e de amida II da vibração de deformação N-H e estiramento C-N em 1550 cm^{-1} . Vibrações de estiramento CH₂ simétrico e assimétrico das cadeias de hidrocarboneto de lipídeos ocorrem em 2920 e 2850 cm^{-1} (VADDI *et al.*, 2001)

A técnica FT-Raman é de particular interesse no estudo espectroscópico do *stratum corneum*, uma vez que não é uma técnica sensível ao grau de hidratação da amostra, possibilitando a avaliação das interações com promotores de permeação que não se relacionam com o aumento do conteúdo hídrico do tecido. A utilização da técnica PAS-FTIR associada à técnica FT-Raman fornece uma complementação ao estudo espectroscópico do efeito de promotores de permeação sobre o *stratum corneum*, pois permite a avaliação também de alterações no grau de hidratação, mecanismo pelo qual atuam alguns promotores de permeação.

A utilização da técnica de DSC possibilita a avaliação do efeito que promotores de permeação exercem sobre a estrutura e a organização do *stratum corneum* através de alterações observadas nas temperaturas características dos eventos endotérmicos relativos tanto à porção lipídica do tecido, tais como transições de fase, quanto à porção proteica, envolvendo desidratação e desnaturação.

A Espectroscopia FT-Raman foi recentemente utilizada para caracterizar o *stratum corneum* humano. As regiões espectrais de vibrações características para o *stratum corneum* são o estiramento CH₂ simétrico em 2852 cm^{-1} e CH₂ assimétrico em 2883 cm^{-1} originados de cadeias de hidrocarbonetos de lipídeos assim como os estiramentos C-C em 1126 , 1082 e 1062 cm^{-1} ; outro estiramento C-C de proteína ocorre tipicamente em 1031 cm^{-1} . A vibração de estiramento C-H em 3060 cm^{-1} é originária em sua maioria da α -queratina (ANIGBOGU *et al.*, 1995; WILLIAMS *et al.*, 1993).

Alterações nas posições de estiramentos são úteis para avaliar o efeito de promotores de permeação sobre a estrutura do *stratum corneum* (ANIGBOGU *et al.*, 1995).

WILLIAMS & BARRY em 1994 estudaram comparativamente a natureza molecular do *stratum corneum* da pele de muda de cobra (American black rat), pele de porco e pele humana utilizando a técnica FT-Raman. Os espectros obtidos para as três espécies foram notadamente semelhantes. Os tecidos parecem conter componentes similares, entretanto em quantidades ligeiramente diferentes. Algumas diferenças, porém foram observadas, como a ausência de vibrações de estiramento C-S em 644 e 620 cm^{-1} no *stratum corneum* de cobra, sugerindo que estas vibrações sejam resultantes de tecidos de mamíferos. Outra diferença foi observada na região do espectro entre 2931 e 2883 cm^{-1} , de estiramento C-H, onde uma banda em 2975 cm^{-1} é evidente no espectro do *stratum corneum* de cobra e ausente no humano, indicando a existência de diferenças no conteúdo e organização dos lipídeos nos mamíferos e nos répteis. Outra diferença importante está relacionada à queratina presente nas amostras. O *stratum corneum* de pele de muda de cobra é formado por três camadas distintas; a mais externa é a camada β , rica em β -queratina, abaixo da qual está localizada a camada meso, contendo α -queratina em uma matriz lipídica, seguida da camada mais interna, formada por α -queratina. Em contraste, a queratina presente no *stratum corneum* de mamíferos está predominantemente na conformação α , embora pequenas quantidades possam estar presentes na conformação β . Estas diferenças conformacionais são observadas através das posições dos modos vibracionais de amida I e amida III. A tabela 5 mostra algumas frequências vibracionais determinadas por FT-Raman para o *stratum corneum* humano e de cobra.

Tabela 5. Frequências vibracionais do *stratum corneum* humano e de cobra determinados or FT-Raman (WILLIAMS & BARRY, 1994)

Número de onda/cm ⁻¹		Descrição aproximada do modo vibracional
<i>stratum corneum</i> de cobra *	<i>stratum corneum</i> humano	
3060w	3060w	ν (CH) anel aromático
3002 w	3000 vw,sh	ν (CH) olefínico
2975 mw	-	ν _{as} (CH ₃)
2956 mw,sh	2958 m,sh	ν _{as} (CH ₃)
2933 s	2931 s	ν _{as} (CH ₂)
2882 m	2883 ms	ν _s (CH ₃)
2852 mw,sh	2852 m	ν _s (CH ₂)
-	1768 vw	ν (COO)
-	1743 vw	ν (C=O) lipídeo
1672 mw,sh	-	ν (C=O) amida I – β queratina
1656 ms	1652 s	ν (C=O) amida I – α hélice
1614 mw	-	ν (C=C) olefínico
-	1585 w	
1540 mw	1552 w	ν(CN) e δ (NH) amida II
1473 w,sh	-	δ(CH ₂)
1452 m	1438 s	δ(CH ₂) tesoura
1294 mw	1296 ms	δ(CH) “twisting”
-	1274 mw	ν (CN) e δ (NH) amida III α hélice
1240 mw	1244 w,sh	δ (CN) amida III – β queratina
1170 w	1172 w	ν(CC)
1124 mw	1126 mw	ν(CC) cadeia carbônica, conformação trans
1085 w	1082 mw	ν(CC) cadeia carbônica, conformação randômica
1055vw	1062 mw	ν(CC) cadeia carbônica, conformação trans
1031 w	1031 mw	ν(CC) cadeia carbônica, conformação cis
1004 w	1002 m	ν(CC) anel aromático
-	644w	ν(CS) amida IV
-	623 w	ν(CS)
-	424 w,br	δ (CCC) esqueleto carbônico

ν = estiramento; δ = deformação ; ν = muito(very); s = forte(strong); m = médio(medium); w = fraco(weak); sh = ombro(shoulder); br = largo(broad)

*American black rat

A espectroscopia FT-Raman é útil no estudo de materiais de origem biológica por não detectar a presença de água e, portanto não sofrendo sua interferência. Esta condição é vantajosa possibilitando análise comparativa de amostras de diferentes níveis de hidratação (ANIGBOGU *et al.*,1995; WILLIAMS *et al.*,1993; CASPER *et al.*,2001).

Os espectros Raman das amostras de *stratum corneum* da pele de muda das cobras *Spilotis pullatus* e *Bothrops jararaca* (figura 15 e 16) apresentam perfil bastante similar ao descrito na literatura (WILLIAMS & BARRY,1994). Podem ser observadas as regiões espectrais de vibrações características do *stratum corneum*, com bandas de sinal forte em 3100-2700 cm^{-1} , referentes aos estiramentos C-H originados das cadeias carbônicas de lipídeos (CH_3 assimétrico, CH_2 assimétrico, CH_3 simétrico, CH_2 simétrico, CH). Observa-se também banda na região de 1650-1672 cm^{-1} relativas à banda de estiramento C=O de Amida I de α -queratina e possivelmente de β -queratina, além de uma banda na região de 1450-1460 cm^{-1} , possivelmente originária da deformação angular C-H para CH, CH_2 e CH_3 .

A comparação entre os espectros Raman obtidos para o *stratum corneum* das duas espécies de cobra tratados com água por 8 h (controle) mostra perfis similares, porém a intensidade do sinal é mais forte para o *stratum corneum* da muda de pele da espécie *Spilotis pullatus*, especialmente para a banda observada em 3100-2700 cm^{-1} indicando possíveis diferenças na morfologia da superfície do *stratum corneum* das duas espécies.

Figura 15. Espectro FT-Raman de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotes pullatus* tratada com água por 8 h (controle)

Figura 16. Espectro FT-Raman de *stratum corneum* da pele íntegra de muda da cobra *Bothrops jararaca* exposta à água por 8 h (controle)

O espectro Raman obtido para o *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após a remoção mecânica da camada superficial de células com fita adesiva (figura 17), tratado com água por 8 h (controle) apresenta

signal com maior intensidade do que o observado para o *stratum corneum* íntegro da mesma espécie (figura 16) indicando que o procedimento levou a alterações na morfologia da superfície do *stratum corneum*.

Uma vez que na técnica espectroscópica Raman os sinais são obtidos pelo espalhamento da luz que incide sobre a superfície de uma amostra, diferenças na intensidade dos sinais obtidos estão relacionadas com mudanças na morfologia da superfície decorrentes tanto de alterações na densidade de moléculas por unidade de área presentes na região da superfície envolvida no espalhamento de luz quanto de alterações na topografia da superfície. Assim, o procedimento de retirada mecânica com fita adesiva das camadas de células superficiais do *stratum corneum* da pele de muda de *Bothrops jararaca* provocou o aumento do número de grupos responsáveis pelo espalhamento de luz presentes na superfície da amostra indicando a ocorrência de alterações na morfologia do *stratum corneum*.

Figura 17. Espectro FT-Raman de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva exposta, à água por 8 h (controle)

Nos espectros PAS-FTIR do *stratum corneum* da pele de muda de *Bothrops jararaca* e *Spilotis pullatus* (figuras 18 e 19) observa-se perfis típicos de material biológico hidratado, com bandas em 1650 cm^{-1} de estiramento C=O de amida I,

em 1550 cm^{-1} de estiramento C-N e deformação N-H de amida II ;em $3600\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ observa-se uma banda larga relativa à presença de água. Em $2850\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$ observam-se bandas relativas a vibrações de estiramento C-H₂ simétrico e assimétrico de cadeias carbônicas de lipídeos (GOLDEN *et al.*,1986;LIN *et al.*,1992)

Figura 18. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* tratado com água por 8 h (controle)

Figura 19. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratado com água por 8 h (controle)

O procedimento de remoção mecânica com fita adesiva das camadas superficiais de células do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* não levou a alterações detectáveis através da técnica de PAS-FTIR comparativamente ao espectro obtido com o *stratum corneum* íntegro da mesma espécie (figura 20).

Figura 20. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com água por 8 h para *stratum corneum* íntegro em (controle em destaque)

5.1.1. Tratamento do *stratum corneum* com tensoativo aniônico lauril sulfato de sódio

Os tensoativos aniônicos interagem com o *stratum corneum* principalmente através da ligação com a região protéica (queratina) por interações eletrostáticas e hidrofóbicas (SCHEUPLEIN & ROSS, 1970; RHEIN *et al.*, 1986). Em pH neutro, como é o caso dos experimentos realizados, a queratina apresenta carga residual negativa; as interações com tensoativos aniônicos ocorrem através das porções

hidrofóbicas da queratina e a porção apolar do tensoativo, deixando exposta desta forma a porção polar da molécula, negativamente carregada, que atua como sítio de ligação para a água. Este processo leva a um aumento da quantidade de água presente no *stratum corneum*, causando a expansão do tecido e aumento do volume do mesmo (BREUER, 1979; SCHEUPLEIN & ROSS, 1970).

O espectro Raman obtido com amostra de *stratum corneum* de pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com solução do tensoativo aniônico lauril sulfato de sódio a 50 g/L em água por 4 e 8 h (figuras 21 e 22) apresentaram aumento da intensidade do sinal em 3100-2700 cm^{-1} comparativamente ao *stratum corneum* tratado apenas com água (controle), sendo que o tratamento por 8 h apresentou sinal mais intenso do que o observado para 4 h. O aumento da intensidade do sinal Raman é indicativo da presença de maior densidade de grupos que espalham a luz por unidade de área da superfície da amostra após o tratamento com o tensoativo, indicando a ocorrência de alterações na topografia do *stratum corneum*; a alteração foi mais intensa para maior tempo de exposição. O grau de interação dos tensoativos com o *stratum corneum* é dependente, entre outros fatores, do tempo de contato (ANANTHAPADMANABHAN *et al.*, 1996), o que pode explicar a diferença observada entre os tratamentos por dois períodos de tempo diferentes. O tratamento do *stratum corneum* por maior período de tempo de contato levou a alterações de maior intensidade no espectro Raman.

Figura 21. Espectro FT-Raman do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com lauril sulfato de sódio a 50 g/L em água por 4 h (controle em destaque)

Figura 22. Espectro FT-Raman do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com lauril sulfato de sódio a 50 g/L por 8 h (controle em destaque)

O *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* submetido ao tratamento com a mesma solução de tensoativo por 8 h (figura 23) apresentou aumento da intensidade do sinal Raman em $3100\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$ de forma similar ao

observado para o tratamento do *stratum corneum* da pele de *Bothrops jararaca* por 8 h, porém com menor intensidade.

Figura 23. Espectro FT-Raman do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* tratada com lauril sulfato de sódio a 50 g/L por 8 h (controle em destaque)

O sinal na região de 3100-2700 cm^{-1} é originário de estiramento CH de CH_2 e CH_3 simétrico e assimétrico de lipídeos. O aumento do sinal Raman após tratamento com o tensoativo aniônico possivelmente reflete a interação do lauril sulfato de sódio com a queratina, uma vez que a cadeia hidrofóbica do tensoativo (C_{12}) exibe bandas de absorção de estiramento CH_2 simétrico e assimétrico nos mesmos comprimentos de onda dos lipídeos.

A interação superficial do tensoativo aniônico com o *stratum corneum*, sem a ocorrência de penetração nas camadas mais internas poderia explicar a não ocorrência de maior afluxo de água ao tecido, conforme seria esperado para o tratamento com lauril sulfato de sódio. Uma possível explicação para a interação apenas superficial seria a maior resistência do *stratum corneum* de cobra comparativamente ao *stratum corneum* humano devido à presença da camada adicional de β -queratina presente na pele dos répteis (WILLIAMS & BARRY, 1994).

Embora a técnica FT-Raman não tenha sensibilidade à presença de água, o aumento do fluxo de água pode ser observado indiretamente através de alterações na topografia da superfície do *stratum corneum* que, uma vez dilatado pela presença de maior quantidade de água, tende a ter menor densidade de moléculas que espalham a luz por unidade de área, o que leva a uma redução do sinal Raman.

Após a remoção mecânica com fita adesiva das camadas superficiais do *stratum corneum* da pele de muda de *Bothrops jararaca*, o tratamento com soluções de lauril sulfato de sódio a 50 g/L em água (acima da cmc) e a 2,34 g/L em água (abaixo da cmc) levaram a uma diminuição na intensidade do sinal Raman na região de 2800-3000 cm^{-1} (figuras 24 e 25 respectivamente). A diminuição foi maior para o tratamento com a solução mais concentrada (50 g/L em água).

Figura 24. Espectro FT-Raman de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado lauril sulfato de sódio a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

Figura 25. Espectro FT-Raman de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado lauril sulfato de sódio a 2,34 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

A diminuição da intensidade do sinal Raman está relacionada a uma menor densidade de grupos que espalham a luz, presentes na superfície por unidade de área, indicando uma possível expansão do *stratum corneum* decorrente do aumento da presença da água no tecido, que provoca um aumento do volume. O efeito observado foi maior para o tratamento com solução mais concentrada (50 g/L em água) indicando que não apenas os monômeros dos tensoativos estão envolvidos no processo de ligação ao *stratum corneum* mas também as espécies micelares. Estes resultados indicam que a remoção das camadas superficiais de células com fita adesiva facilitou a interação do tensoativo com a camada mais interna de α -queratina e com a matriz lipídica do *stratum corneum* com o conseqüente aumento do teor de água no tecido, conforme mecanismo proposto na literatura para a ação dos tensoativos aniônicos (SCHEUPLEIN & ROSS, 1970; RHEIN *et al.*, 1986).

Os resultados obtidos por FT-Raman permitem observar que a camada adicional de β -queratina presente no *stratum corneum* de pele de muda de cobra atua como uma barreira adicional à penetração de substâncias (RIGG & BARRY,1990; ITOH *et al.*, 1990 a; WILLIAMS & BARRY, 1994).

No espectro PAS-FTIR obtido para o *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com tensoativo aniônico a 50 g/L em água por 4h (figura 26) e por 8 h (figura 27) não foram observadas alterações significativas na região de 3600-3300 cm^{-1} , característica da banda de absorção de água, indicando que não houve aumento da hidratação conforme seria esperado pela ação do lauril sulfato de sódio (SCHEUPLEIN & ROSS, 1970; RHEIN *et al.*,1986).

No tratamento por 8 h e não por 4 h, ocorreu intensificação do sinal em 2920-2850 cm^{-1} , região de estiramento CH de lipídeos, indicando a presença do tensoativo na superfície do *stratum corneum*, detectado através de cadeia C12 do lauril sulfato de sódio, confirmando os resultados obtidos através da técnica de FT-Raman. O tempo de contato mostrou ser um parâmetro significativo para o processo de interação do lauril sulfato de sódio com a queratina, corroborando com dados já publicados (ANANTHAPADMANABHAN *et al.*, 1996).

Figura 26. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com lauril sulfato de sódio 50 g/L em água por 4 h (controle em destaque)

Figura 27. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com lauril sulfato de sódio 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque)

O espectro PAS-FTIR obtido para o *stratum corneum* da pele da cobra *Spilotis pullatus* tratado com a mesma solução de tensoativo apresentou intensificação das bandas na região de 2920-2850 cm^{-1} após 4h e 8 h de tratamento (figuras 28 e 29 respectivamente); para 8 h de tratamento a intensificação das bandas foi superior à observada para 4 h, indicando que o maior tempo de contato favoreceu a adsorção do tensoativo aniônico à queratina, conforme observado também para o *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca*. Alterações na região de 3600-3300 cm^{-1} , característica da banda de absorção de água também não foram observadas.

Figura 28. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotes pullatus* tratada com lauril sulfato de sódio 50 g/L em água por 4 h (controle em destaque)

Figura 29. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotes pullatus* tratada com lauril sulfato de sódio 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque)

Os espectros PAS-FTIR do *stratum corneum* da pele de muda de *Bothrops jararaca* obtidos após a remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratamento com soluções de lauril sulfato de sódio em concentração acima da cmc (50 g/L água) (figura 30) e abaixo da cmc (2,34 g/L em água) (figura 31) mostraram aumento da hidratação, identificada pelo alargamento das bandas na região de 3600-3300 cm^{-1} . As duas concentrações levaram a resultados similares, sendo indicativo de que, mesmo que as espécies envolvidas na interação com o *stratum corneum* sejam as espécies monoméricas do tensoativo, que por apresentarem dimensão menor penetram na estrutura dos *stratum corneum*, as micelas podem atuar apenas como reservatórios, mantendo constante a concentração de monômeros livres em solução (VADDI *et al.*, 2001).

Figura 30. Espectro IR (PAS FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado lauril sulfato de sódio a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

Figura 31. Espectro IR (PAS FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado lauril sulfato de sódio a 2,34 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

Os resultados obtidos por PAS-FT-IR e por FT-Raman para amostras de *stratum corneum* da pele de muda de *Bothrops jararaca* após a remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva indicam que o procedimento permitiu a interação do tensoativo aniônico com a região protéica mais interna do tecido, formada por α -queratina envolvida por uma matriz lipídica, de forma mais acentuada do que na amostra de *stratum corneum* íntegro da mesma espécie. Os resultados obtidos através das duas técnicas indicam que o *stratum corneum* apresentou aumento do conteúdo de água e conseqüente alteração de sua morfologia superficial. Estes resultados corroboram com a literatura, que cita o aumento da permeabilidade do *stratum corneum* da pele de muda de cobras após a extração da camada β (β - queratina) com fita adesiva ou por tratamento enzimático com tripsina, expondo desta forma as camadas mais internas do *stratum corneum* ao efeito dos promotores de permeação (WILLIAMS & BARRY, 1994; RIGG & BARRY, 1990).

Os resultados também indicam a ocorrência de adsorção do lauril sulfato de sódio à porção protéica do *stratum corneum*, levando a intensificação das bandas no PAS-FTIR em $2920\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ relacionadas às vibrações de estiramento CH de lipídeos do *stratum corneum* e coincidente com as vibrações de estiramento CH da cadeia láurica (C12) do tensoativo (YOKOMIZO, 1997; VADDI *et al.*, 2001).

Não foram detectadas alterações na banda de amida I que aparecem em $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ de acordo com a conformação da queratina, indicando que o lauril sulfato de sódio não provocou alteração na conformação da queratina, que seria um dos mecanismos propostos para a ação dos tensoativos como promotores de permeação (WALTERS, WALKER e OLEJNIK, 1988; SINGER, 1985; CASTELANO *et al.*, 2000).

5.1.2. Tratamento do *stratum corneum* com tensoativo catiônico cloreto de cetil trimetil amônio:

Os tensoativos catiônicos, assim como os aniônicos, podem interagir com o *stratum corneum* através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas (ANANTHAPADMANABHAN *et al.*, 1996; SCHEUPLEIN & ROSS, 1970; RHEIN *et al.*, 1986).

O espectro FT-Raman obtido para o *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratado com solução do tensoativo catiônico cloreto de cetil trimetil amônio na concentração de 50 g/L em água por 8 h (figura 32) mostrou uma ligeira intensificação do sinal em $3100\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ de pequena magnitude, sendo possivelmente conseqüente da variabilidade natural existente entre amostras de material biológico (WILLIAMS & BARRY, 1994).

Figura 32. Espectro FT-Raman do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque)

No *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* submetido ao mesmo tratamento, houve uma diminuição na intensidade do sinal Raman em $3100\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ (figura 33) de pequena magnitude, sendo também possivelmente decorrente da variabilidade inerente ao material biológico.

Figura 33. Espectro FT-Raman do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* tratada com cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque)

O *stratum corneum* da pele de muda de *Bothrops jararaca* após a remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva tratado com soluções do cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água (acima da cmc) e a 0,78 g/L em água (abaixo da cmc) (figuras 34 e 35 respectivamente) mostrou em ambos os casos uma diminuição da intensidade do sinal Raman em relação ao *stratum corneum* tratado apenas com água (controle) na região de 3100-2700 cm^{-1} .

Figura 34. Espectro FT-Raman de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

Figura 35. Espectro FT-Raman de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com cloreto de cetil trimetil amônio a 0,78 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

A diminuição da intensidade do sinal Raman indica a ocorrência de mudança na morfologia da superfície após o tratamento com o tensoativo catiônico, decorrente de alteração na topografia ou redução do número de moléculas envolvidas no espalhamento da luz por unidade de área, causados possivelmente pelo aumento do volume do tecido pelo afluxo de água e a conseqüente alteração das características da superfície. O comportamento observado para o tratamento com cloreto de cetil trimetil amônio foi similar ao observado para o lauril sulfato de sódio. As duas concentrações estudadas apresentaram resultados similares, da mesma forma que foi observado para o lauril sulfato de sódio, o que sugere mais uma vez que a interação do tensoativo com a queratina envolve espécies monoméricas e as micelas atuam como reservatório, mantendo o número de monômeros em solução constante, corroborando com dados da literatura (VADDI *et al.*, 2001).

O espectro obtido por PAS-FTIR para o *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* e *Spilotis pullatus* tratadas com cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 4 h (figura 36 e 37) mostraram intensificação da

banda em $2920\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$, relacionada com a vibração de estiramento C-H olefínico, indicando uma possível incorporação do tensoativo no *stratum corneum*.

Figura 36. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 4 h (controle em destaque)

No espectro PAS-FTIR, a intensificação da banda em $2920\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ característica da vibração de estiramento C-H é indicativa da adsorção do tensoativo à queratina. A intensificação desta banda pode estar relacionada às vibrações de estiramento C-H da cadeia graxa do cloreto de cetil trimetil amônio (C16), indicando sua presença no *stratum corneum* (YOKOMIZO,1997; VADDI *et al.*, 2001)

Figura 37. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* tratada com cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 4 h (controle em destaque)

No tratamento similar para o *stratum corneum* da muda de pele da cobra *Spilotis pullatus* por 8 h observa-se aumento menos intenso na banda em 2920-2850 cm^{-1} do que aquele observado para 4 h (figura 38). A interação de tensoativos com a pele é um processo dependente do tempo de contato e da concentração, porém é também saturável e reversível (SCHEUPLEIN & ROSS, 1970). O tempo de tratamento de 4 h para o cloreto de cetil trimetil amônio com solução a 50 g/L em água pode representar a etapa de saturação da queratina para este tensoativo, sendo que a continuidade da exposição à solução pode ter levado a um novo equilíbrio no qual alguma fração do tensoativo inicialmente adsorvida voltou à solução.

Figura 38. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotes pullatus* tratada com cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque)

O efeito de redução da banda relativa à absorção da água em 3600-3300 cm^{-1} observada nos tratamentos com o cloreto de cetil trimetil amônio pode ser explicado como o resultado da interação do tensoativo catiônico com a queratina. Em pH neutro como no caso dos experimentos realizados, a porção polar do tensoativo catiônico apresenta carga positiva ao passo que a queratina, neste pH, apresenta carga residual negativa; a interação eletrostática entre o tensoativo catiônico e a queratina neste pH leva à exposição da porção hidrofóbica do tensoativo, tornando a superfície da proteína com caráter hidrofóbico que, portanto, tende a repelir a água. Nestas condições não era esperado aumento da concentração de água no tecido, confirmando os resultados obtidos em estudos realizados por outros pesquisadores (BREUER, 1979; SCHEUPLEIN & ROSS, 1970).

Após a remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva, o *stratum corneum* da pele de muda de *Bothrops jararaca* tratado com tensoativo catiônico na concentração de 0,72 g/L em água (abaixo da cmc) por 12 horas (figura 39) apresentou aumento da banda referente à água indicando a ocorrência de hidratação do tecido.

Os resultados obtidos são indicativos de que, também para o tratamento com tensoativo catiônico, a remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva leva a alterações na estrutura do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca*, expondo as camadas mais internas de α -queratina e a matriz lipídica ao efeito promotores de permeação não acessíveis no tecido íntegro.

Embora o aumento da hidratação não seja um efeito esperado da ação dos tensoativos catiônicos, o tempo de contato neste caso é um fator que deve ser considerado com maior atenção. A adsorção de tensoativos a substratos com sítios carregados é um processo complexo durante o qual a adsorção pode ocorrer sucessivamente por mecanismos de troca iônica, emparelhamento iônico e interação hidrofóbica (ROSEN,1989).

Embora inicialmente a interação eletrostática entre a queratina negativamente carregada no pH utilizado (pH 6,5-7,0) e o tensoativo catiônico favoreça a formação de uma superfície de caráter mais hidrofóbico na proteína e que portanto apresenta tendência de repelir a água (BREUER,1979; SCHEUPLEIN & ROSS, 1970), o processo de adsorção pode ter continuidade com a adição de outras camadas de tensoativo catiônico por interação hidrofóbica entre as porções apolares, levando então à exposição da porção polar do tensoativo, tornando assim a superfície da proteína mais hidrofílica (ROSEN,1989). O tratamento prolongado da amostra de *stratum corneum* por 12 h pode ter possibilitado a ocorrência de sucessivas camadas de cloreto de cetil trimetil amônio, tornando o tecido mais hidrofílico.

Figura 39. Espectro IR (PAS FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado cloreto de cetil trimetil amônio a 0,78 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

O mesmo tratamento com solução a 50 g/L (acima da cmc) pelo mesmo período de tempo (figura 40) apresentou grande intensificação da banda em $2920-2850\text{ cm}^{-1}$ característica de estiramento C-H olefínico indicando possível incorporação no tecido.

Figura 40. Espectro IR (PAS FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado cloreto de cetil trimetil amônio a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

Não se observou neste caso aumento da quantidade de água no *stratum corneum*, uma vez que não se observa expansão da banda 3600-3300 cm^{-1} . Embora o tempo de tratamento tenha tido a mesma duração que o tratamento com a solução mais diluída, o efeito da concentração parece ter sido fator importante para o efeito observado em relação ao aumento da hidratação. Apenas a solução mais diluída (0,72 g/L em água), em concentração abaixo da cmc levou a um aumento da hidratação, indicando que a interação envolveu preferencialmente a forma monomérica do tensoativo e não com a forma micelar (BREUER, 1979; SCHEUPLEIN & ROSS, 1970).

Conforme foi observado para o lauril sulfato de sódio, não foram detectadas alterações na banda de amida I que aparecem em 1700-1600 cm^{-1} de acordo com a conformação da queratina, indicando que o cloreto de cetil trimetil amônio também não provocou alteração na conformação da queratina, que seria um dos mecanismos de ação propostos para a ação dos tensoativos como promotores de permeação (WALTERS, WALKER e OLEJNIK, 1988; SINGER, 1985; CASTELANO *et al.*, 2000).

5.1.3. Tratamento do *stratum corneum* com tensoativo não iônico álcool láurico etoxilado (12 OE)

Embora a interação dos tensoativos não iônicos com a região protéica do *stratum corneum* também seja possível através de interações hidrofóbicas com as cadeias laterais da queratina, devido à ausência de carga na molécula a interação mais provável é com a porção lipídica do tecido (WALTERS, WALKER e OLEJNIK, 1988; BREUER, 1979; ANANTHAPADMANABHAN *et al.*, 1996).

O espectro Raman obtido para o *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratado com o tensoativo não iônico álcool láurico etoxilado (12 moles OE) a 50 g/L em água por 8 h (figura 41) apresentou

intensificação do sinal Raman em 3100-2700 cm^{-1} indicando a ocorrência de alterações na morfologia da superfície do tecido, decorrentes de alterações na topografia ou no número de moléculas por unidade de área envolvidas no espalhamento da luz. O sinal Raman nesta região está relacionado aos estiramentos CH_2 simétrico e assimétrico de lipídeos e o aumento da intensidade após tratamento com álcool láurico 12 moles OE indica a presença do tensoativo no stratum corneum, uma vez que a cadeia hidrofóbica C12 apresenta estiramentos CH_2 simétrico e assimétrico na mesma região (YOKOMIZO,1997; VADDI *et al.*, 2001).

Figura 41. Espectro FT-Raman do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque)

O *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* submetida ao mesmo tratamento apresentou comportamento similar ao observado para o *stratum corneum* da espécie *Bothrops jararaca* (figura 42).

Figura 42. Espectro FT-Raman do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* tratada com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque)

O espectro Raman do *stratum corneum* da pele de muda de *Bothrops jararaca* após a extração das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com álcool láurico etoxilado (12 moles OE) a 50 g/L em água (acima da cmc) por 12 h (figura 43) e a 0,21 g/L em água (abaixo da cmc) também por 12 h (figura 44) apresentaram ambos redução na intensidade do sinal Raman em 3100-2700 cm^{-1} . A redução do sinal está relacionada a uma menor quantidade de moléculas que espalham a luz por unidade de área indicando alteração da topografia da superfície do tecido.

Figura 43. Espectro FT-Raman de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com cloreto de álcool láurico etoxilado (12 OE) a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

Figura 44. Espectro FT-Raman de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 0,21 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

As duas concentrações estudadas (acima e abaixo da cmc) apresentaram resultados semelhantes, indicando que a interação entre o álcool láurico etoxilado (12 OE) e o *stratum corneum* ocorreu tanto através da interação com a forma micelar do tensoativo quanto com a forma monomérica. Embora existam trabalhos relacionados a adsorção dos tensoativos ao *stratum corneum* preferencialmente à forma não micelar dos tensoativos (RHEIN et al., 1986; BREUER, 1979), os resultados obtidos não indicaram comportamento diferente para os tratamentos com as soluções de concentração acima e abaixo da cmc, para o tensoativo não iônico estudado.

O espectro PAS-FTIR da amostra de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* submetida ao tratamento com álcool láurico etoxilado (12 moles OE) a 50 g/L em água por 8 h (figura 45) mostrou diminuição da banda em $2920-2850\text{ cm}^{-1}$, relativa à vibração de estiramento C-H de lipídeos, indicando uma possível extração destes compostos pela ação de emulsificação do tensoativo não iônico ou alterações na conformação da estrutura das bicamadas lipídicas (VADDI et al., 2001).

Atualmente, o estudo da influência dos tensoativos sobre a porção lipídica do *stratum corneum* não está elucidada necessitando investigação. Na literatura referente ao assunto, existem dados conflitantes, por exemplo, em relação à capacidade dos tensoativos de extraírem lipídeos do *stratum corneum* (FROEBE et al., 1990; VADDI et al., 2001).

Por outro lado, também estão relatadas na literatura a existência de bicamadas lipídicas intactas no *stratum corneum* após o tratamento com tensoativos (MISRA et al., 1997; WARNER et al., 1999).

O espectro PAS-FTIR para o tratamento citado não apresentou alteração na banda em $3600-3300\text{ cm}^{-1}$, indicando que não houve alteração do conteúdo hídrico do *stratum corneum*. Este comportamento observado corrobora com resultados existentes na literatura sobre o efeito de tensoativo não iônicos, que não exercem efeito sobre o fluxo de água e consequente expansão do *stratum corneum*. RHEIN e colaboradores em 1986 relataram que os tensoativos não

iônicos causam expansão mínima do *stratum corneum* quando comparados aos efeitos observados para os tensoativos aniônicos.

Figura 45. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com álcool láurico etoxilado a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque)

No espectro PAS-FTIR do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* submetido ao mesmo tratamento (figura 46) não foram observadas alterações significativas na região de absorção de água (3600-3300), confirmando o comportamento observado para o *stratum corneum* da espécie *Bothrops jararaca*; neste caso, porém, não se observou redução da banda na região de 2920-2850 cm^{-1} . Esta diferença de comportamento entre as duas espécies pode ser decorrente da existência de diferenças morfológicas entre as duas espécies; sendo a espécie *Spilotis pullatus* de tamanho superior à espécie *Bothrops jararaca*, a espessura do *stratum corneum* deste animal deve ser mais espesso e portanto com sítios de ligação menos acessíveis aos promotores de permeação.

Figura 46. Espectro IR (PAS-FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* tratada com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 50 g/L em água por 8 h (controle em destaque)

O *stratum corneum* da pele de muda de *Bothrops jararaca* após extração mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e submetido aos tratamentos com soluções de álcool láurico etoxilado (12 moles OE) a 50 g/L em água (acima da cmc) e a 0,21 g/L em água (abaixo da cmc) por 12 h (figuras 47 e 48 respectivamente) não apresentou aumento da banda de absorção de água ($3600\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$), indicando que o tensoativo não iônico não aumentou a hidratação, confirmando os resultados obtidos anteriormente e corroborando com dados da literatura já discutidos.

Figura 47. Espectro IR (PAS FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 50 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

Figura 48. Espectro IR (PAS FTIR) de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* após remoção mecânica das camadas superficiais de células com fita adesiva e tratado com álcool láurico etoxilado (12 OE) a 0,21 g/L em água por 12 h (controle em destaque)

A avaliação conjunta dos dados obtidos por FT-Raman e PAS FTIR indica que o álcool láurico etoxilado (12 OE) não exerce efeito sobre o grau de hidratação do *stratum corneum*; a redução do sinal Raman observado pode ser decorrente da extração de lipídeos e conseqüente alteração da topografia do tecido.

Conforme foi observado para o lauril sulfato de sódio e para o cloreto de cetil trimetil amônio, não foram detectadas alterações na banda de amida I que aparecem em $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ de acordo com a conformação da queratina, indicando que álcool láurico etoxilado com 12 OE também não provocou alteração na conformação da queratina, que seria um dos mecanismos propostos para a ação dos tensoativos como promotores de permeação (WALTERS, WALKER e OLEJNIK, 1988; SINGER, 1985; CASTELANO *et al.*, 2000).

5.2. DSC

A utilização da técnica de DSC possibilita a avaliação do efeito que promotores de permeação exercem sobre a estrutura e a organização do *stratum corneum* através de alterações observadas nas temperaturas características dos eventos endotérmicos relativos tanto à porção lipídica do tecido, tais como transições de fase, quanto à porção protéica envolvendo desidratação e desnaturação da queratina (LIN, DUAN e LIN, 1996).

O *stratum corneum* isolado apresenta quatro transições endotérmicas características nas temperaturas de 40 °C atribuída à transição de fase nas bicamadas lipídicas do estado cristalino (ortorrômbico) para o estado de gel (hexagonal); 75 °C e 85 °C, atribuídas à transição de fase de lipídeos das bicamadas do estado de gel lamelar para líquido e a transição a 105 °C representa a desidratação e a desnaturação da porção protéica do *stratum corneum* e requer a presença de uma certa concentração de água na amostra para ser aparente (ASHTON *et al.*, 1992; GOLDEN *et al.*, 1986; GOLDEN, Mc KIE & POTTS, 1987, LEOPOLD & LIPPOLD, 1994).

Na curva de DSC obtida para a amostra de *stratum corneum* de pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com água por 8 h (controle) (figura 49), nem todos os picos de transições endotérmicas para os lipídeos são observados ; uma transição endotérmica fraca pode ser observada ao redor de 58 °C. O pico referente à transição endotérmica envolvendo a desidratação e desnaturação da queratina ocorre em 130 °C e é nítido.

Figura 49. Curva de DSC do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratada com água por 8 h (controle)

A amostra de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* tratada com água por 8 h (controle) (figura 50) apresentou curva de DSC com perfil bastante similar à obtida para o *stratum corneum* de muda de pele da *Bothrops jararaca*. As transições endotérmicas relativas aos lipídeos são fracas; observa-se uma transição endotérmica em cerca de 38 °C e outra em cerca de 58 °C. A transição endotérmica relacionada à desidratação e desnaturação da queratina ocorre em 129 °C.

Figura 50. Curva de DSC do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotes pullatus* tratada com água por 8 h (controle)

A interação de tensoativos com o *stratum corneum* leva a alterações nas temperaturas de transição de fase dos picos endotérmicos referentes aos lipídeos para valores de temperatura inferiores ou promovem uma atenuação dos picos causada pela desorganização nas bicamadas lamelares (SHIN,CHO e OH,2001; ASHTON *et al.*,1992).

A interação de tensoativos iônicos com o *stratum corneum* leva a um aumento da quantidade de água presente no tecido, causando sua expansão e aumento do volume e espessura (BREUER, 1979; SCHEUPLEIN & ROSS, 1970). O aumento do conteúdo hídrico do tecido reduz as temperaturas de transição como consequência do aumento da desordem das cadeias de hidrocarbonetos dos lipídeos. Uma interpretação possível para o efeito da água sugere que a água adicionada à região lipídica do *stratum corneum* ficaria inicialmente confinada à região polar, onde se insere entre as porções polares, tornando a estrutura menos coesa (GOLDEN *et al.*).

No *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca*, o tratamento com o tensoativo lauril sulfato de sódio a 50 g/L por 8 h (figura 51), a transição endotérmica em 58 °C pode ser observada na mesma temperatura da amostra controle. A temperatura na qual ocorre a perda de água e a desnaturação da queratina, porém apresentou uma elevação de cerca de 10 °C (140 °C),

indicando um maior conteúdo hídrico presente na amostra decorrente da interação do tensoativo com a porção protéica do *stratum corneum* e o conseqüente aumento do teor de água no tecido causado pelo tensoativo aniônico. As alterações relatadas nos experimentos com FT-Raman e PAS-FTIR para a ação do lauril sulfato de sódio sobre o *stratum corneum* de *Bothrops jararaca* foram confirmadas pela curva de DSC, onde é possível observar aumento da temperatura de perda de água em cerca de 10 °C, indicando aumento da hidratação do tecido.

Figura 51. Curvas de DSC de amostras de *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* tratadas com cloreto de cetil trimetil amônio (tensoativo catiônico), lauril sulfato de sódio (tensoativo aniônico), álcool láurico etoxilado (tensoativo não iônico) a 50 g/L e com água, por 8 h (controle)

O tratamento com cloreto de cetil trimetil amônio levou a uma redução na temperatura de perda de água, indicando menor conteúdo hídrico na amostra. Estes resultados também confirmam os dados observados pela técnica de PAS-FTIR para o tratamento do *stratum corneum* íntegro da pele de muda de *Bothrops jararaca* e *Spilotis pullatus*.

A mesma concordância com os resultados obtidos pelas técnicas PAS-FTIR e FT-Raman pode ser observada com relação à curva de DSC obtida para o

stratum corneum de *Bothrops jararaca* tratado com álcool láurico etoxilado (12 OE), que não mostra alteração na temperatura de perda de água, corroborando com as observações anteriores referentes ao tensoativo não iônico utilizado no estudo.

6. Conclusões

Nas condições experimentais utilizadas foi possível a elaboração das seguintes conclusões:

- As técnicas biofísicas de PAS-FTIR, TF-Raman e DSC permitiram detectar os efeitos da interação dos tensoativos lauril sulfato de sódio, álcool láurico etoxilado com 12 moles OE e cloreto de cetil trimetil amônio com o *stratum corneum* da pele de muda das cobras *Spilotis pullatus* e *Bothrops jararaca*.
- O procedimento de remoção mecânica das camadas superficiais de células do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* com fita adesiva aumentou o grau de interação dos tensoativos avaliados com o tecido, indicando que a camada de β -queratina presente no *stratum corneum* das cobras atua como uma barreira adicional à permeação de substâncias.
- A interação dos tensoativos iônicos lauril sulfato de sódio (aniônico) e cloreto de cetil trimetil amônio (catiônico) com o *stratum corneum* da pele de muda de cobras levou a um aumento do teor de água no tecido.
- A interação do tensoativo não iônico álcool láurico etoxilado com 12 OE com o *stratum corneum* da pele de muda de cobras não levou a um aumento do teor de água no tecido e provocou a extração de alguma quantidade de lipídeos.
- O efeito da concentração dos tensoativos sobre a intensidade de interação com o *stratum corneum* da pele de muda de cobras foi observável apenas para os tempos de contato mais curtos (4 e 8 h); para o tempo de contato mais prolongado (12 h), apenas o cloreto de cetil trimetil amônio apresentou maior efeito para a solução em concentração abaixo da cmc.

- O *stratum corneum* da pele de muda das duas espécies de cobras utilizadas, *Bothrops jararaca* e *Spilotis pullatus* apresentaram resultados diferentes para alguns tensoativos, em algumas das condições experimentais avaliadas, indicando a existência de possíveis diferenças na morfologia dos tecidos das duas espécies.

Referências Bibliográficas*

AMARAL, A. **Serpentes do Brasil : iconografia colorida**. Brasília: Editora da Universidade de São Paulo, 1977. 248p.

ANANTHAPADMANABHAN, K.P.; YU, K.K.; MEYERS, C.L.; ARONSON, M.P. Binding of surfactants to stratum corneum. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v.47, p.185-200, 1996.

ANIGBOGU, A.N.C.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W.; EDWARDS, H.G.M. Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum. *Int. J. Pharm.*, v.125, p.265-282, 1995.

ARNIK, M.; SIMON, M.N.; STEVEN, A.C. Cornified cell envelope assembly: a model based on electron microscopic determinations of thickness and projected density. *J. Cell Sci.*, v.111, n.8, p.1051-1060, 1998.

ASHTON, P.; HADGRAFT, J.; BRIAN, K.R.; MILLER, T.A.; WALTERS, K.A. Surfactant effects in topical drug availability. *Int. J. Pharm.*, v.41, p.189-195, 1988.

ASHTON, P.; WALTERS, K.A.; BRIAN, K.R.; HADGRAFT, J. Surfactant effects in percutaneous absorption I. effects on transdermal flux of methyl nicotinate. *Int. J. Pharm.*, v.87, p. 261-264, 1992.

ASHTON, P.; WALTERS, K.A.; BRIAN, K.R.; HADGRAFT, J. Surfactants effects in percutaneous absorption II. Effects on protein and lipid structure of the stratum corneum. *Int. J. Pharm.*, v.87, p.265-269, 1992.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A.T. **Surfactant systems: their chemistry, pharmacy and biology**. New York: Chapman and Hall, 1985. cap.1, p.1-29 .

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.14, p.102-114, 2001.

BARRY, B.W. Structure, functions, diseases and topical treatment of human skin. In: **Dermatological formulations**. New York: Marcel Dekker, 1983. v.18, p.1-213.

BEHL, C.R.; CHAR, H.; PATEL, S.B.; MEHTA, D.B.; PIEMONTESE, D.; MALICK, A.W. "In vitro" and *in vivo* skin uptake and permeation studies – critical considerations and factors which affect them. In: SHAH, V.; MAIBACH, H. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum Press, 1993. cap.13, p.225-259.

BINKS, B.P. Surfactants monolayers at oil-water interfaces. *Chemistry & Industry*, v.19, n.7, p.537-541, 1993.

BREUER, M.M. The interaction between surfactants and keratinous tissues. *J.Soc.Cosmet. Chem.*, v.30, p. 41-64, 1979.

BRONAUGH, R.; COLLIER, S. "In vitro" methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J. **Skin permeation fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing, 1993. cap.4, p.93-111.

BRONAUGH, R. "In vitro" percutaneous absorption models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.919, p.188-191, 2000.

BULKIN, B.J. The Raman effect: an introduction. In: GRASSELLI, J.G.; BULKIN, B.J. **Analytical Raman spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons, 1991, cap.1, p. 1-18.

CAHEN, D.; BULTS, G.; GARTY, H.; MALKIN, S. Photoacoustic in life sciences. *J.Biochem.Biophys. Methods.*, v.3, p. 293-310, 1980 .

CAPPEL, M.J.; KREUTER, J. Effects of nonionic surfactants on transdermal drug delivery: I polysorbates. *Int. J. Pharm.*, v.69, p.143-153, 1991a.

CASPER, P.; LUCASSEN, G.W.; CARTER, E.A ; BRUINING, H.A ; PUPPEL, G.J. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J.Soc.Invest.Dermatol.*, v.116, n.3, p. 434-442, 2001.

CASTELLANO, A.L.; IRVARS, C.C.; CARBALLO, G.L.; DOMÍNGUEZ, M.H. The influence of Span 20 on stratum corneum lipids in Langmuir monolayers: comparison with Azone. *Int. J. Pharm.*, v.203, p.245-253, 2000.

CHIEN, Y.W. Transdermal drug delivery and delivery systems. In: () **Novel drug delivery systems**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1992. cap.7, 301-369 .

COOPER, E.R.; BERNER, B. Interactions of surfactants with epidermal tissues: physicochemical aspects. In: RIEGER, M.M. **Surfactants in cosmetics**. New York: Marcel Dekker, 1985. cap. 7, p.195-210.

COOPER, E.R. Increased skin permeability for lipophilic molecules. *J. Pharm. Sci.*, v.73, n.8, p.1153-1156, 1984.

DENNIS, M. J. Absorption process. In: HANSCH, C. **Comprehensive medical chemistry**. London: Pergamon Press, 1990, v. 5, cap. 23.1, p. 1-43.

DIEM, M. Biophysical applications of vibrational spectroscopy. In: _____. **Introduction to modern vibrational spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons, 1993. cap. 8, p. 205-235.

DYKES, P. Surfactants and skin. *Int. J. Cosmet. Sci.*, v.20, p.53-61, 1998.

ELIAS, P.M.; COOPER, E.R.; KORC, A.; BROWN, B. Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. *J. Invest. Dermatol.*, v.76, p.297-301, 1981.

ENDO, M.; YAMAMOTO, T.; IJUIN, T. Effect of nonionic surfactant on the percutaneous absorption of tenoxicam. *Chem. Pharm. Bull.*, v.44, n.4, p.865-867, 1996.

FINNIN, B.C.; MORGAN, T.M. Transdermal penetration enhancers: applications, limitations, and potential. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.88, n.10, p.955-958, 1999.

FRANZ, T.; LEHMAN, P.; MCGUIRE, E. In vivo methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J. **Skin permeation fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing, 1993. cap.3, p.73-92.

FRIEBERG, S.E.; MA, Z.; RHEIN, L. Amphiphilic association structures of the stratum corneum. In: MITTAL, K.L.; SHAH, D.O. **Surfactants in solution**. New York: Plenum Press, 1991. v.11, p.177-183.

FROEBE, C.L.; SIMION, F.A.; RHEIN, L.D.; CAGAN, R.H.; KLIGMAN, A. Stratum corneum lipid removal by surfactants: relation to in vivo irritation. *Dermatologica*, v.181, p.227-283, 1990.

GANEM-QUINTANAR, A.; KALIA, Y.N.; FALSON-RIEG, F.; BURI, P. Mechanisms of oral permeation enhancement. *Int. J. Pharm.*, v.156, p.127-142, 1997.

GODWIN, D.A.; MICHNIAK, B.B.; CREEK, K.E. Evaluation of transdermal penetration enhancers using a novel skin alternative. *J. Pharm. Sci.*, v.86, n.9, p. 1001 – 1005, 1997.

GOLDEN,G.M.; GUZEK,D.B.; HARRIS,R.R.; McKIE,J.E.; POTTS,R. Lipid thermotropic transitions in human *stratum corneum*. *J.Soc.Invest.Dermatol.*, v.86, n.3, p.255-259,1986 .

GOLDEN,G.M.; McKIE,J.E.; POTTS,R.O . Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux. *J.Pharm.Sci.* V.76,n.1,p.25-28,1987.

GOODMAN,M.; BARRY,B.W. Action of skin permeation enhancers azone,oleic acid and decylmethyl sulphoxide: permeation and DSC study. *J.Pharm. Pharmacol.*, v.38, p.71P,1986.

GREWAL, B.S.; NAIK, A.; WILLIAM, J.I.; GOORIS, G.; GRAUW, C.J.; GERRITSEN, H.G.; BOUWSTRA, J.A. Transdermal macromolecular delivery: real-time visualization of iontophoretic and chemically enhanced transport using two-photon excitation microscopy. *Pharm. Res.*, v. 17, n.7, p.788-795, 2000.

HAINES,P.J.; WILBURN,F.W. Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry.In: HAINES,P. **J.Thermal methods of analysis principles, applications and problems**. London: Chapman & Hall.1995. cap.3,p.63-119

HANDBOOK of industrial surfactants. 3 ed. New York: Synapse Information Resources, 2000, p. 1073, 1188,1381.

HANH, B.D.; NEUBERT, R.H.H.; WATERWIG, S.; CHRIST, A.; HENTZSCH, C. Drug penetration as studied by noninvasive methods: Fourier transform infrared-attenuated total reflection, Fourier transform infrared, and ultraviolet photoacoustic spectroscopy. *J. Pharm. Sci.*, v.89, n.9, p.1106-1113, 2000.

HANH, B.D.; NEUBERT, R.H.H.; WATERWIG, S.; LASCH, J. Penetration of compounds through stratum corneum as studied by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *J. Control. Release.*, v. 70, p.393-398, 2001.

HARADA,K.;MURAKAMI,T.;YATA,N.;YAMAMOTO,S. Role of intercellular lipids in stratum corneum in the percutaneous permeation of drugs. *J.Invest.Dermatol.*,v.99,n.3,p.278-282,1992.

HIRVONEN, J.; RYTTING, J.H.; PARONEN, P.; URTII, A. Dodecyl N,N-dimethylamino acetate and Azone enhance drug penetration across human, snake, and rabbit skin. *Pharm. Res.*, v.8, n.7, p.933-937, 1991.

HOGUE, A.R. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem.Inst. Butantan*, v.42/43, p.373-496, 1979.

IDSON, B. Percutaneous absorption. *J. Pharm. Sci.*, v.64, n.6, p.901-923, 1975.

INGLE, J.D.; CROUCH, S. Spectrochemical techniques on the horizon. In: (____) **Spectrochemical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1988. cap. 17, p.525-541.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. *Cerâmica.*, v.26, n.121, p. 17- 24, 1980.

ITOH, T.; MAGAVI, R.; CASADY, R.L.; NISHIHATA, T.; RYTTING, J.H. A method to predict the percutaneous permeability of various compounds: shed snake skin as a model membrane. *Pharm. Res.*, v.7, n.12, p.1302-1306, 1990b.

ITOH, T.; XIA, J.; MAGAVI, R.; NISHIHATA, T.; RYTTING, J.H. Use of shed snake skin as a model membrane for "in vitro" percutaneous penetration studies: comparison with human skin. *Pharm. Res.*, v.7, n.10, p.1042-1047, 1990a.

JAIN, M.K. **Introduction to biological membranes**, 2 ed. John Wiley & Sons, 1988, cap.1, p.1 – 9.

LANGER, R.; WISE, D. **Medical applications of controlled release**. 1ed. Florida: CRC Press Inc., 1984. v.1, cap.7, p.203-251.

LEE, A. C.; TOJO, K. Characterization of skin permeation of vitamin C: theoretical analysis of penetration profiles and differential scanning calorimetry study. *Chem.Pharm.Bull.*, v.46, n.1, p.174-177, 1998 .

LEOPOLD, C.S.; LIPPOLD, B.C. An attempt to clarify the mechanism of the penetration enhancing effects of lipophilic vehicles with differential scanning calorimetry (DSC). *J. Pharm. Pharmacol.*, v.47, p.276-281, 1994.

LEVANG, A. K.; ZHAO, K.; SINGH, J. Effects of ethanol/propylene glycol on the in vivo percutaneous absorption of aspirin, biophysical changes and macroscopic barrier properties of the skin. *Int. J. Pharm.*, v.181, p. 255-263, 1999 .

LÉVÉQUE, J.L.; RIBAUD, C.; GARSON, J.C. Caractérisation biophysique du stratum corneum relation entre sa structure et ses propriétés. *Pathol. Biol.*, v.40, n.2, p.95-108, 1992.

LEVIN, I.W. Structural and dynamical properties of model and intact membrane assemblies by vibrational spectroscopy. In: DURIG, J.R. **Chemical, biological and industrial applications of infrared spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons, 1986, p. 173-197 .

LIN, S.Y.; DUAN, K.J.; LIN, T.C. Microscopic FT-IR/DSC system used to simultaneously investigate the conversion process of protein structure in porcine *stratum corneum* after pretreatment with skin penetration enhancers., *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, v.18, n.3, p.175-181, 1996.

LIN, S.Y.; HOU, S.J.; HSU, T.H.S.; YEH, F.L. Comparisons of different animal skins with human skin in drug percutaneous penetration studies., *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, v.14, n.8, p.645-654, 1992 .

LINDMAN, B. Structural aspects of surfactant micellar systems. In: TADROS, T. F. **Surfactants**. London: Academic Press, 1984. cap. 2, p.83-109.

LODÉN, M. The simultaneous penetration of water and sodium lauryl sulfate through isolated human skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v. 41, p. 227-233, 1990.

LOMAX, E. Physical properties of surfactants. In: (___) **Surfactants in personal care applications**. Warwickshire: Specialty Training Limited, 1996. n.p.

LOPES, P.S.; KANEKO, T.M. Membranas no estudo de permeação cutânea. *Cosm. Toiletries, Ed. Port.*, v.12, n.2, p.62-66, 2000.

LÓPEZ, A.; LLINARES, F.; CORTELL, C.; HERRÁEZ, M. Comparative enhancer effects of Span 20 with Tween 20 and Azone on the "in vitro" percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities. *Int. J. Pharm*, v.202, p.133-140, 2000.

MAJMUDAR, G.; SMITH, M. "in vitro" screening techniques in dermatology. *Cosm. Toiletries*, v.113, n.4, p.69-74, 1998.

MANUAL de classificação. 2ed. São Paulo: Edições Aduaneiras Ltda, 2002, n.p.

MARTIN, A. In:(_) **Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical science**. 4ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. p.324-356, 362-379, 512 - 542.

MILLER, C.;NEOGI, P. Surfactants. In:(_) **Interfacial phenomena – equilibrium and dynamic effects**. New York: Marcel Dekker, 1985. cap.IV, p.140-180.

MISRA,M.;ANANTHAPADMANABHAN,K.P.;HOYBERG,K.;GURSKY,R.P.;PROWELL,S.;ARONSON,M. Correlation between surfactant-induced ultrastructural changes in epidermis and transepidermal water loss. *J.Soc.Cosmet.Chem.*,v.48,p.219-234,1997.

MIZUSHIMA, J.; KAWASAKI, Y.; TABOHASHI, T.; KITANA, T.; SAKAMOTO, K.; KAWASHIMA, M.; COOKE, R.; MAIBACH, H. Effect of surfactants on human stratum corneum: electron paramagnetic resonance study. *Int. J. Pharm.*, v.197, p.193-202, 2000.

MOGHIMI, H.R.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W.A Lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids. I. characterisation and comparison with stratum corneum intercellular structure. *Int. J. Pharm.*, v.131, n.2, p.103-115, 1996. (a)

MOGHIMI, H.R.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W.A Lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids. II. effects of geometry of the stratum corneum on permeation of model drugs 5-fluorouracil and oestradiol. *Int J. Pharm.*, v.131, n.2, p.117-129, 1996. (b)

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3ed. New York: Worth Publishers, 2000, 1152p.

OKUYAMA, H.; IKEDA, Y.; KASAI, S.; IMAMORI, K.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Influence of non-ionic surfactants, pH and propylene glycol on percutaneous absorption of piroxicam from cataplasm. *Int. J. Pharm.*, v.186, p.141-148, 1999.

PARK, E.S.; CHANG, S.Y.; HAHN, M.; CHI, S.C. Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen. *Int. J. Pharm.*, v.209, p.109-119, 2000.

PATIL, S.; SINGH, P.; SARASOUR, K.; MAIBACH, H. Quantification of sodium lauryl sulfate penetration into skin and underlying tissues after topical application – pharmacological and toxicological implications. *J. Pharm. Sci.*, v.84, n.10, p.1240-1244, 1995.

PERCOT,A .;LAFLEUR,M. Direct observation of domains in model stratum corneum lipid mixtures by Raman microspectroscopy. *Biophys. J.*, v.81, n.4, p.2144-2153,2001.

PROTTEY, C.; FERGUSON, T. Factors which determine the skin irritation potencial of soaps and detergents. *J. Soc. Cosm. Chem.*, v.26, p.29-46, 1975.

PUC CETTI,G.;LEBLANC,R.M. A sunscreen-tanning compromise: 3D visualization of the actions of titanium dioxide particles and dihydroxyacetone on human epiderm.*Photochem.Photobiol.*,v.71,n.4,p.426-430, 2000.

RABOCKAI, T. **Físico-química de superficies**. Washington: Tehe General Secretariat of Organization of American States, 1979, 128p.

RHEIN, L.D.; ROBBINS, C.R.; FERNEE, K.; CANTORE, R. Surfactant structure effects on swelling of isolated human stratum corneum. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v.37, p.125-139, 1986.

RIEGER, M.M. Factors affecting sorption of topically applied substances. In: ZATZ, J. **Skin permeation fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing. 1993. cap.2, p.33-72.

RIGG, P.C.; BARRY, B.W. Shed snake skin and hairless mouse skin as a model membrane for human skin during permeation studies. *J. Invest. Dermatol.*, v.94, n.2, p.235-240, 1990.

RINTOUL,L.;PANAYIOTOU,H.;KOKOT,S.;GEORGE,G.;CASH,G.;FROST,R.;BUI,T .;FREDERICKS,P. Fourier transform infrared spectroscopy: a versatile technique for real world samples. *Analyst.*, v.123,p.571-577,1998.

RIVIERE, J. Biological factors in absorption and permeation. In: ZATZ, J. **Skin permeation fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing. 1993. cap.5, p.113-125.

ROSEN, M.J. **Surfactant and interfacial phenomena**. New York: John Wiley & Sons, 1989. p.33-205.

ROSENCWAIG, A.; PINES, E. Stratum corneum studies with photoacoustic spectroscopy. *J. Invest. Dermatol.*, v.69, n.3, p.296-298, 1977.

SCHENDZIELORZ, A.; HANH, B.D.; NEUBERT, R.H.H.; WARTEWIG, S. Penetration studies of clotrimazole from semisolid formulation using step-scan FT-IR photoacoustic spectroscopy. *Pharm. Res.*, v.16, n.1, 1999.

SCHEUPLEIN, R.; ROSS, L. Effects of surfactants and solvents on the permeability of epidermis. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v.21, p.853–873, 1970.

SCHEUPLEIN, R.J.; BLANK, I.H. Permeability of the skin. *Physiol. Rev.*, v.51, n.4, p.702-747, 1971.

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

SHAH, V.P.; BEHL, C.R.; FLYNN, G.L.; HIGUCHI, W.I. Workshop report: principles and criteria in the development and optimization of topical therapeutic products. *Int. J. Pharm.*, v.82, n.1, p.21-28, 1992.

SHIN, S.C.; CHO, C.W.; OH, I.J. Effects of non-ionic surfactants as permeation enhancers towards piroxicam from the poloxamer gel through rat skins. *Int. J. Pharm.*, v.222, p.199-203, 2001.

SHOKRI, J.; NOKHODCHI, A.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; JALALI, M.B. The effects of surfactants on the skin penetration of diazepam. *Int. J. Pharm.*, v.228, p.99-107, 2001.

SINGER, E.J. Interactions of surfactants with epidermal tissues: biochemical and toxicological aspects. In: RIEGER, M.M. **Surfactants in cosmetics**. New York: Marcel Dekker. 1985, cap. 6, p.133-194.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Espectroscopia Raman. In: (____) **Princípios de análise instrumental**. São Paulo: Artmed Editora S.A., 2002. cap. 18, p. 385-398.

STUART, B. **Biological applications of infrared spectroscopy**. Chichester: Wiley & Sons, 1997. 191p.

TAKAHASHI, K.; TAMAGAWA, S.; KATAGI, T.; RYTTING, J.H.; NISHIHATA, T.; MIZUNO, N. Percutaneous permeation of basic compounds through shed snake skin as a model membrane. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.45, p.882-886, 1993.

VADDI, H.K.; WANG, L.Z.; HO, P.C.; CHAN, Y.W.; CHAN, S.Y. Effects of cetrimide and ascorbic acid on "in vitro" human skin permeation of haloperidol. *Chem. Pharm. Bull.*, v.49, n.11, p.1395-1400, 2001.

WALTERS, K.A.; WALKER, M.; OLEJNIK, O. Non-ionic surfactant effects on hairless mouse skin permeability characteristics. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.40, p.525 – 529, 1988.

WARNER, R.R.; BOISSY, Y.L.; LILLY, N.A.; SPEARS, M.J.; McKILLOP, K.; MARSHAL, J.L.; STONE, K.J. Water disrupts stratum corneum lipid lamellae: damage is similar to surfactants. *J. Invest. Dermatol.*, v.113, n.6, p. 960-966, 1999.

WIDLER, N.; SIGRIST, A.; GAFNER, F.M. Lipid analysis and transepidermal water loss in snakes. *IFSCC Magazine*, v.5, n.1, p. 24-29, 2002.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B.W. Comparison of Fourier Transform Raman spectra of mammalian and reptilian skin. *Analyst*., v.119, p. 563-566, 1994 .

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W.; EDWARDS, H.G.M.; FARWELL, D.W. A critical comparison of some Raman spectroscopic techniques for studies of human stratum corneum. *Pharm. Res.*, v.10, n.11, p.1642-1647, 1993.

WU, P.C.; HUANG, Y.B.; LIN, H.H.; TSAI, Y.H. "In vitro" percutaneous absorption of captopril through excised rabbit skin. *Int. J. Pharm.*, v.143, p.119-123, 1996.

WU, P.C.; FANG, J.Y.; HUANG, Y.B.; TSAI, Y.H. "In vitro" effects of penetration enhancers on sodium nonivamide acetate in rat skin. *Biol. Pharm. Bull.*, v.18, n.2, p.1790-1792, 1995.

YAMANOUYE, N. **Participação do sistema nervoso simpático na função da glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca***. São Paulo, 1997, 89 p. Tese de Doutorado- Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo. 89p.

YOKOMIZO, Y. Effect of phosphatidylglycerol on the in vitro percutaneous drug penetration through the dorsal skin of guinea pigs, and analysis of the molecular mechanism using (ATR-FTIR) spectroscopy. *Int. J. Pharm.*, v.147, p. 219-231, 1997.

ZATZ, J. Scratching the surface: rationale and approaches to skin permeation. In: (___). **Skin permeation fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing, 1993. cap.1, p.11-72, 127-148.

ZATZ, J.L. Modification of skin permeation by surfactants. *Cosm. Toil.*, v.106, n.7, p. 89-94, 1991.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICA. NBR 6023/2000. Informação e documentação: referência:elaboração.Rio de Janeiro, 2002

ANEXO

Nas curvas de DSC obtidas para o *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus*, os resultados obtidos foram discordantes dos observados para o *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Bothrops jararaca*. As curvas de DSC do *stratum corneum* da pele de muda de *Spilottis pullatus*:

Figura 50. Curvas de DSC do *stratum corneum* da pele de muda da cobra *Spilotis pullatus* tratada com cloreto de cetil trimetil amônio (tensoativo catiônico), lauril sulfato de sódio (tensoativo aniônico), álcool láurico etoxilado (tensoativo não iônico) a 50 g/L e com água, por 8 h (controle)