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

**Avaliação dos óleos essenciais de plantas nativas da Mata
Atlântica como promotores de permeação cutânea**

Aurea Cristina Lemos Lacerda

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Telma Mary Kaneko

São Paulo
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Lacerda, Aurea Cristina Lemos
L131av Avaliação dos óleos essenciais de plantas nativas da Mata
Atlântica como promotores de permeação cutânea / Aurea
Cristina Lemos Lacerda. -- São Paulo, 2014.
143p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Kaneko, Telma Mary

1. Fármaco: Análise química 2. Óleos essenciais 3. Terpenos
4. Medicamento : Segurança I. T. II. Kaneko, Telma Mary
orientador.

615.19015 CDD

Aurea Cristina Lemos Lacerda

Avaliação dos óleos essenciais de plantas nativas da Mata Atlântica como promotores de permeação cutânea

Versão corrigida. O original encontra-se na Secretaria de Pós-Graduação

Comissão julgadora
da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
Orientador/ presidente

Prof. Dr. Airton Martin
1º examinador

Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista
2º examinador

Profa. Dra. Patrícia Santos Lopes
3º examinador

Prof. Dr. Jadir Nunes
4º examinador

São Paulo, 09 de outubro de 2014

AGRADECIMENTOS

- À minha mãe, pelo incentivo e paciência infinitos;
- Ao Kim, Mina, Sarah e Vera, pelo estímulo e auxílio em todas as horas;
- À Profa. Telma, minha orientadora querida e um exemplo de tantas virtudes e sabedoria, pela imensa oportunidade de desenvolver este projeto e pelo auxílio incansável durante todas as etapas do doutorado: obrigada;
- Às queridas amigas de todas as horas Marlene, Marisa e Margareth, pelo estímulo e incentivo constantes;
- Ao professor Paulo R.H. Moreno pela oportunidade de trabalhar com os óleos essenciais e pelos ensinamentos sobre o assunto;
- Ao professor Yoshio Kawano, pelo suporte na obtenção e interpretação dos dados de espectroscopia;
- À Profa. Cristina Helena dos Reis Serra e à Juliana Mazza Reis pelos ensinamentos sobre PAMPA;
- Ao José S. Sobrinho, pela disposição em ajudar nas rotinas do laboratório, sempre que precisei;
- À estagiária Bruna Vianna, pela imensa ajuda na realização dos experimentos;
- Aos secretários Jorge, David e Beth pelos esclarecimentos e paciência;
- À FAPESP, pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. OBJETIVO GERAL.....	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1. A pele como via de administração de fármacos.....	6
3.1.1. Estrutura da pele.....	8
3.1.2. Estrato córneo e função barreira.....	9
3.2. Permeação através do estrato córneo.....	15
3.2.1. Fatores que interferem na permeação de fármacos pela via tópica.....	17
3.3. Modelos <i>in vitro</i> para avaliação da permeação através da pele.....	19
3.3.1. Membranas lipídicas artificiais para estudos de permeação cutânea.....	21
3.4. Promotores de permeação cutânea.....	21
3.4.1. Terpenos como promotores de permeação cutânea.....	24
3.5. <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum.....	30
3.6. Métodos biofísicos para o estudo de promotores de permeação.....	33
3.6.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR- FTIR).....	34
3.6.2. Espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT- Raman).....	36

3.7. Sistema PAMPA para avaliação da permeabilidade da pele.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1. Material.....	45
4.1.1. Objeto de estudo.....	45
4.1.2. Substâncias químicas.....	45
4.1.3. Reagentes e solventes.....	46
4.1.4. Equipamentos e materiais.....	46
4.1.5. Infraestrutura.....	47
4.2. Métodos.....	48
4.2.1. Obtenção e caracterização do óleo essencial da <i>P.</i> <i>pseudocaryophyllus</i>	49
4.2.2. Avaliação a interação do óleo essencial e dos componentes majoritários com membrana natural por métodos biofísicos.....	51
4.2.3. Desenvolvimento sistema PAMPA com a membrana biológica artificial selecionada.....	53
4.2.4. Avaliação da segurança óleo essencial e dos componentes majoritários no sistema PAMPA.....	56
4.2.5. Avaliação do efeito do óleo essencial e dos componentes majoritários em diferentes concentrações na promoção da permeação do diclofenaco de potássio no sistema PAMPA.....	57

4.2.6. Avaliação da eficácia do óleo essencial e dos componentes majoritários na permeação do diclofenaco de potássio em formulação.....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1. Obtenção e caracterização do óleo essencial da <i>P. pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum.....	62
5.1.1. Obtenção dos óleos essenciais.....	66
5.1.2. Composição química dos óleos essenciais.....	67
5.2. Avaliação da interação dos óleos essenciais e dos componentes majoritários com membrana natural modelo para estrato córneo humano (pele de muda de cobra), por métodos biofísicos.....	70
5.2.1. Espectroscopia FT-Raman.....	71
5.2.2. Espectroscopia ATR-FTIR.....	76
5.3. Desenvolvimento do sistema PAMPA com a membrana biológica artificial.....	80
5.3.1. Desenvolvimento de camada lipídica que mimetize a composição dos lipídeos do estrato córneo humano.....	80
5.3.2. Teste de Integridade das membranas biológicas artificiais.....	85
5.4. Avaliação da segurança dos óleos essenciais e dos componentes majoritários com sistema PAMPA.....	92
5.5. Avaliação da eficácia óleo essencial e dos componentes majoritários na permeação do diclofenaco de potássio (marcador) com PAMPA.....	96
5.5.1. Avaliação da eficácia do óleo essencial e dos componentes majoritários na permeação do diclofenaco de potássio em formulações.....	99
6. CONCLUSÃO.....	110
7. REFERÊNCIAS.....	111

8. ANEXOS..... 123

ANEXO 1 - Certificado de premiação de pôster na Conferência da IFSCC.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática de corte histológico da pele.....	9
FIGURA 2 - Esquema de sugestão para a organização dos lipídeos no estrato córneo.....	11
FIGURA 3 - Ceramidas do estrato córneo humano.....	13
FIGURA 4 - Rotas intercelular e transcelular através do estrato córneo.....	17
FIGURA 5 - Representação esquemática da ação dos promotores de permeação na matriz lipídica intercelular.....	24
FIGURA 6 - Representação esquemática do sistema PAMPA.....	39
FIGURA 7 - Fluxograma dos ensaios.....	49
FIGURA 8 - Cavidades secretoras. Folha íntegra, não corada – planta procedente do Morro da Cataia.....	63
FIGURA 9 - Vista frontal da epiderme em corte paradérmico: Morro da Cataia (A) e Cananéia(B).....	63
FIGURA 10 - Corte paradérmico abaxial: complexos estomáticos, cavidade secretora e drusas (Morro da Cataia).....	64
FIGURA 11 - Corte paradérmico abaxial: tricomas tectores unicelulares (Morro da Cataia).....	64
FIGURA 12 - Corte paradérmico abaxial: cavidade secretora mostrando par de células reniformes e células em arranjo radial (Cajati).....	65
FIGURA 13 - Corte paradérmico abaxial: drusas e estômatos; ausência de tricomas tectores unicelulares (Cananéia).....	65
FIGURA 14 - Corte paradérmico abaxial: cavidades secretoras, drusas e complexos estomáticos (A) e coloração de material lipídico com Sudam III (B) (Cananéia).....	65
FIGURA 15 - Espectros FT-Raman de membrana natural tratada com: (A) água e (B) propilenoglicol.....	72
FIGURA 16 - Espectros FT-Raman de membrana natural tratada com óleo essencial procedente de Cajati em propilenoglicol (p/p): (A) 0,25% , (B) 0,5% , (C) 1,0% e (D) 2,0%.....	73

FIGURA 17 - Espectros dos FT-Raman de membrana natural tratada com óleo essencial de <i>P.pseudocaryophyllus</i> procedente da Cananéia, em propilenoglicol (p/p): (A) 0,25% , (B) 0,5% , (C) 1,0% e (D) 2,0%.....	74
FIGURA 18 - Espectros dos FT-Raman de membrana natural tratada com óleo essencial de <i>P.pseudocaryophyllus</i> procedente de Morro Grande, em propilenoglicol (p/p): (A) 0,25% , (B) 0,5% (C) 1,0% e (D) 2,0%.....	75
FIGURA 19 - Espectros ATR-FTIR de membrana natural tratada com: (A) água desmineralizada - controle; (B) propilenoglicol (C) etanol, por 24 h.....	77
FIGURA 20 - Espectros ATR-FTIR de membrana natural tratada com citrônolol: (A) puro; (B) 2,0% (p/p) em propilenoglicol:água (80:20); (C) 2,0% (p/p) em etanol:água (40:60) por 24 h.....	78
FIGURA 21 - Espectros ATR-FTIR de membrana natural tratada com eugenol: (A) puro; (B) 2,0% (p/p) em propilenoglicol:água (80:20); (C) 2,0% (p/p) em etanol:água (40:60) por 24 h.....	79
FIGURA 22 - Espectros Raman confocal das membranas biológicas artificiais A a F.....	82
FIGURA 23 - Espectros Raman confocal do filtro de PVDF com impregnação dos lipídeos individuais.....	83
FIGURA 24 - Absorbância do corante Azul Cresil Brilhante permeada através de filtros PVDF impregnados com lipídicos individuais.....	86
FIGURA 25 - Absorbância do corante Azul Cresil Brilhante permeada através das membranas biológicas artificiais (misturas lipídicas).....	86
FIGURA 26 - Absorbância do corante Azul Cresil Brilhante permeado através das membranas biológicas artificiais (misturas lipídicas).....	87
FIGURA 27 - Fluorescência do corante Amarelo Lúcer permeada através de filtros de PVDF.....	88
FIGURA 28 - Fluorescência do Amarelo Lúcer Amarelo Lúcer permeada através das membranas biológicas artificiais (escala 0 - 7000), expressa em Unidades Relativas de Fluorescência (URF).....	88
FIGURA 29 - Fluorescência do Amarelo Lúcer permeada através das membranas biológicas artificiais (escala 0 - 70,00), expressa em Unidades Relativas de Fluorescência (URF).....	89
FIGURA 30 - Absorbância do diclofenaco de potássio permeada através das membranas A a F tratadas com óleo essencial das diferentes procedências, compostos majoritário e etanol, sem hidratação prévia e com 1 h de contato do fármaco, e com o sistema PAMPA sem agitação.....	98

FIGURA 31 - Espectro de absorção de solução de diclofenaco de potássio a 10,0 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato pH 7,4.....	100
FIGURA 32 - Gráfico dos da regressão linear.....	102
FIGURA 33 - Gráfico dos resíduos (valores previstos x valores experimentais).....	104
FIGURA 34 - Gráfico Normal-plot para avaliar normalidade dos resíduos.....	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Proporção molar das misturas lipídicas para preparação das membranas biológicas artificiais.....	53
Quadro 2- Concentração das soluções estoques de lipídeos e respectivas dos lipídeos e massas moleculares.....	54
Quadro 3: Composição das misturas lipídicas a partir de soluções estoque dos lipídeos individuais.....	54
Quadro 4 – Fórmula do emulgel com diclofenaco de potássio.....	59
Quadro 5: Estatística da regressão linear.....	102
Quadro 6 – Avaliação dos resíduos.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da extração do óleo essencial da <i>P. pseudocaryophyllus</i>	67
Tabela 2: Composição química do óleo essencial da <i>P. pseudocaryophyllus</i> procedente de do município de Cajati (A) ; município de Cananéia (B); e da Reserva Natural de Morro Grande, Município de C.....	69
Tabela 3 - Teste de integridade de membranas biológicas artificiais, com e sem hidratação prévia, para valores médios de absorbância do Azul Cresil Brilhante permeado, analisados por variância ANOVA e teste t-Student	90
Tabela 4 - Teste de integridade de membranas biológicas artificiais, com e sem hidratação prévia, para valores médios de fluorescência do amarelo Lúcifer permeado, analisados por variância ANOVA e teste t-Student.....	91
Tabela 5 - Teste de segurança dos óleos essenciais e compostos majoritários com os valores médios de leituras de absorbância do permeado através membranas biológicas artificiais A a F, analisados por variância ANOVA e teste t-Student.....	93
Tabela 6 - Comparação entre membranas biológicas artificiais A a F no teste de segurança dos óleos essenciais e componentes majoritários com os valores médios de leituras de absorbância do permeado, analisados por variância ANOVA e teste t-Student.....	95
Tabela 7 - Condições do ensaio para definir as condições experimentais a serem utilizadas na avaliação da permeação do diclofenaco de potássio para as membranas A.B.C,D, E e F	97
Tabela 8 - Absorbância de soluções de diclofenaco de potássio em tampão pH 7,4 a 275 nm.....	101
Tabela 9 – Absorbâncias de soluções de diclofenaco de potássio em tampão pH 7,4 obtidas a 275 nm para cálculo da precisão.....	106
Tabela 10 – Absorbâncias de soluções de diclofenaco de potássio em tampão pH7,4 (275 nm) e resultados obtidos com cálculo pela curva analítica para cálculo da exatidão.....	107
Tabela 11 - Comparação entre membranas biológicas artificiais A a F no teste de eficácia do óleo essencial de Morro Grande, citrônolol e etanol a 0,125% (p/p) em gel aquoso, com os valores médios de leituras de absorbância do permeado, analisados por variância ANOVA e teste t-Student	108

.Tabela 12 - Concentração do diclofenaco de potássio $\mu\text{g}/100\ \mu\text{L}$ em formulações, com diferente promotores de permeação, avaliados através das membranas biológicas artificiais A a F.....	109
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

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
Cv	concentração do soluto no veículo
d	dia
D	coeficiente de difusão do soluto através da membrana
DMSO	dimetil sulfóxido
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
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
HTS	high-throughput system
J	fluxo através da membrana
Km	coeficiente de partição membrana/solvente
L	litro
<i>L</i>	“lag time” – tempo para estabelecer gradiente de concentração uniforme através da membrana
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
p/p	relação peso/peso
p/v	relação peso/volume
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay,
PEG	polietilenoglicol
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
Raman confocal	espectroscopia Raman confocal
SI	Sistema Internacional
UV	ultravioleta
v/v	relação volume/volume
ΔC	variação da concentração do soluto nos dois lados da membrana
μm	micrômetro
®	marca registrada

RESUMO

LACERDA, A.C.L. **Avaliação dos óleos essenciais de plantas nativas da Mata Atlântica como promotores de permeação cutânea.** 143 p Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum de pl: **xiii** de populações naturais de três ecossistemas, localizados na **Ilha de Cananéia**, região de restinga, no **Morro da Cataia**, cidade de Cajati, região de encosta, ambas em área de Mata Atlântica, e na **Reserva Natural Morro Grande**, cidade de Caldas, região de campos montanos, foram avaliados como promotores de permeação cutânea do diclofenaco de potássio. Os óleos essenciais foram extraídos de partes aéreas das plantas e o rendimento do processo foi entre 0,90% (p/p) e 2,7% (p/p). A análise da composição química mostrou diferenças, indicando tratar-se de três quimiotipos diferentes. A interação dos óleos essenciais e dos componentes majoritários com membrana biológica natural foi avaliada por FT-Raman e ATR- FTIR, indicando a interação com as porções lipídicas do tecido. Foram desenvolvidas seis membranas biológicas artificiais, compostas por ceramidas, ácidos graxos e colesterol em proporções equimolares, que foram caracterizadas por espectroscopia Raman confocal e foram consideradas semelhantes. As membranas foram utilizadas no desenvolvimento do sistema PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) para avaliar a segurança e eficácia dos óleos essenciais e componentes majoritário como promotores de permeação do diclofenaco de potássio. Os resultados dos ensaios com o sistema PAMPA foram estatisticamente avaliados. A segurança foi avaliada com o critério de permeação mínima dos óleos através das membranas do sistema PAMPA, verificada pela absorbância mínima do eugenol na solução aceptora. Os óleos essenciais e componentes majoritários foram utilizados no pré-tratamento das membranas, nas concentrações de 0,125%, 0,25%, 0,50% e 2,00% (v/v) em etanol. Ensaio de permeação do diclofenaco de potássio no sistema PAMPA indicaram efeito de promoção da permeação para todos os compostos avaliados. O método de doseamento do fármaco por UV foi validado e utilizado para os ensaios de permeação de formulações de gel em base aquosa contendo o diclofenaco de potássio (1,0% p/p). As amostras de gel foram preparadas com o óleo procedente de Morro Grande, selecionado na etapa de avaliação de segurança, a 0,125% (p/v). Adicionalmente, foram preparadas formulações com citrônolol e etanol, na mesma concentração. O óleo essencial da Reserva Natural Morro Grande teve efeito de promoção da permeação superior ao do citrônolol e etanol, que foram equivalentes.

Palavras chave: *Pimenta pseudocaryophyllus*, promotores de permeação, PAMPA, métodos biofísicos, diclofenaco de potássio.

ABSTRACT

LACERDA, A.C.L. **Evaluation of essential oils of plants native to the Atlantic Forest as skin permeation enhancers.** 143 p – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2014.

The essential oils of the species *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum collected from natural populations of three existing ecosystems in the **Cananéia Island**, located at sea level, **Cajati** city, located in hillside region, both in the Atlantic Forest areas, as well as species collected in the **Morro Grande Natural Reserve**, region of montane fields, were evaluated as skin permeation enhancers of potassium diclofenac. Essential oils were extracted from the aerial parts of the plants and the process yield was between of 0.90% (w/w) and 2.7% (w/w). The chemical composition analysis showed differences between the plants of three origins, indicating that they are different chemotypes. The interaction of the essential oils and their major components with natural biological membrane was evaluated by FT- Raman and ATR-FTIR, indicating interaction with the lipid portions of the natural membrane. Six artificial biological membranes have been developed, consisting of ceramides, cholesterol and fatty acids in equimolar proportions, which were characterized by confocal Raman spectroscopy and found to be similar. The membranes were used in developing the PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) system to evaluate the safety of the potential permeation enhancers. The test results with PAMPA system were statistically evaluated. Safety was evaluated with the criterion of minimum permeation of the essential oil through the membranes, checked by the minimum absorbance of eugenol in the acceptor solution. The essential oils and the major components were used in the pretreatment of the membranes, at concentrations of 0.125%, 0.25%, 0.50% and 2.00% (v/v) in ethanol. Results indicated permeation enhancement effect for all compounds evaluated. The analytical method for the quantification of potassium diclofenac was validated and used for the evaluation of the permeation of aqueous based gel formulations containing potassium diclofenac (1.0% w/w). The gel samples were prepared with the oil from Morro Grande Natural Reserve, selected in the safety evaluation step, at 0.125% (w/v). In addition, formulations were prepared with citronellol and ethanol at the same concentration. The essential oil of Morro Grande Natural Reserve was more efficient as permeation enhancer than citronellol and ethanol under the test conditions.

Keywords: *Pimenta pseudocaryophyllus*, permeation enhancers, PAMPA, biophysical methods, diclofenac potassium.

1. INTRODUÇÃO

A veiculação de fármacos pela via tópica apresenta diversas vantagens sobre a via oral ou sistêmica, porém, a baixa permeabilidade da pele limita sua utilização como via de administração. O estrato córneo é a camada mais externa da pele e a principal barreira à permeação de substâncias. É formado por camadas de células achatadas, mortas e queratinizadas, denominadas corneócitos, que estão embebidos por uma matriz lipídica. A porção lipídica compõe a única via contínua para a permeação através do tecido e é considerada a principal barreira à difusão de substâncias. A matriz lipídica é organizada em microestruturas ou arranjos moleculares na forma de lamelas, orientadas de forma paralela à superfície da pele e estão intimamente relacionados à função barreira (RODRIGUEZ et al., 2010; GROEN, 2008; BOUWSTRA, 2002; WATANABE et al., 2010; GOORIS; BOUWSTRA, 2007). As principais classes de lipídeos do estrato córneo são as ceramidas, os ácidos graxos de cadeia longa e o colesterol, que estão presentes em uma mistura aproximadamente equimolar (ROBSON et al., 1994; WATANABE et al., 2010; GROEN et al., 2008; GOORIS; BOUWSTRA, 2007).

Lembrando que o estrato córneo é considerado a principal barreira à difusão de substâncias pela pele, a abordagem mais amplamente utilizada para vencer esta limitação é a utilização de promotores químicos de permeação. Esses são um grupo de substâncias que aumentam o fluxo de uma molécula através da pele e devem atuar reduzindo de forma reversível a resistência do estrato córneo (WATANABE et al., 2010; ANJOS; NETO; ALONSO, 2007; WILLIAMS; BARRY, 2004).

Numerosos compostos têm sido avaliados quanto à atividade de promoção da permeação da pele, entre eles os terpenos. Pesquisas vêm sendo feitas para identificar promotores de permeação seguros e eficazes, tanto de fontes naturais quanto sintéticas (KANG et al., 2007; SAPRA; JAIN; TIWARY, 2008). Neste sentido, o estudo dos terpenos é relevante. Esses são os principais componentes dos óleos essenciais e são compostos químicos de baixa irritabilidade cutânea, quando utilizados em baixa concentração (1-5%), possuem baixa toxicidade sistêmica e são considerados promissores como promotores de permeação (SONGKRO; RADES;

BECKET, 2009; MONTI et al., 2002; KUNTA et al., 1997; SAPRA,JAIN; TIWARY, 2008; AQIL et al., 2007).

Como uma classe, os terpenos são constituídos por diferentes grupos químicos tais como álcoois, óxidos, cetonas e hidrocarbonetos. Alguns são consagrados pelo uso e reconhecidamente inócuos sendo classificados pelo *Food and Drug Administration*, FDA (ESTADOS UNIDOS a) como *Generally Recognized as Safe* (GRAS). Vários terpenos têm mostrado aumento da permeação cutânea tanto de fármacos hidrofílicos quanto de fármacos lipofílicos e existem numerosos trabalhos na literatura referentes à avaliação desta classe de compostos como promotores de permeação (AQIL et al., 2007; BOIX et al., 2005; WILLIAMS;BARRY, 2004 ; JAIN et al., 2008; SONGKRO et al., 2009; YAMANE; WILLIAMS; BARRY,1995; FANG et al., 2004; MONTI et al., 2002; KANG et al., 2007).

Como anteriormente mencionado, as terpenos estão distribuídos na natureza principalmente como constituintes dos óleos essenciais de diversas espécies vegetais. Os óleos essenciais são formados por uma mistura complexa de substâncias orgânicas voláteis (VALLILO; BUSTILLOS; AGUIAR, 2006).

A *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum é uma mirtácea nativa pertencente à subtribo *Myrtinae* e é a única espécie do gênero *Pimenta* Lindl. existente no Brasil. Em publicação de 1986, Landrum apresenta uma importante revisão do gênero e, de acordo com as possibilidades ao seu alcance na época, reconheceu a existência de três subgrupos distintos, considerando todas variações dentro da mesma espécie (LANDRUM; KAWASAKI. 1997). Ocorre na floresta ombrófila densa (Mata Atlântica) desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, e de forma rara em regiões do cerrado brasileiro. O óleo essencial desta espécie, rico em monoterpenos e sesquiterpenos, é candidato para a avaliação como promotor de permeação cutânea de fármacos. Na literatura não existem dados referentes a este uso potencial do óleo essencial da espécie, sendo relevante o estudo de sua influência sobre a pele por meio de métodos de avaliação da permeação de fármacos.

A literatura referente à pesquisa em permeação cutânea descreve em sua maioria estudos realizados em animais de experimentação ou em modelos *in vitro* (FRANZ;LEHMAN; McGUIRE, 1993; MAJMUDAR;SMITH, 1998; BEHL et al.,1993; SINKÓ et al., 2009). A metodologia *in vitro* mais frequentemente utilizada se baseia em células de difusão de dois compartimentos, ou células de Franz (MARTIN, 1993;

BRONAUGH; COLLIER, 1993). Embora existam equipamentos automatizados, esta técnica requer longos períodos de tempo para a realização das medidas e não é adequada para avaliações rápidas necessárias nas etapas iniciais de triagem de compostos, que requerem sistemas de alto desempenho (OTTAVIANI; MARTEL; CARRUPT, 2006).

O uso de membranas paralelas artificiais em estudos de permeabilidade vem sendo relatado na literatura de forma crescente ao longo dos últimos anos, desde a publicação do primeiro trabalho sobre o assunto por Kansy e colaboradores (1998). São ensaios denominados *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA. Este sistema é utilizado para ensaios rápidos e de alta eficiência, conceito denominado *high-throughput system* (HTS), aplicados na avaliação da permeabilidade intestinal transcelular passiva de fármacos, como alternativa ao sistema de monocamada de células Caco-2, principalmente pela rapidez e menor custo de implantação. O modelo é formado por um microfiltro impregnado com fosfolipídeos solubilizados em um solvente lipofílico, sendo um sistema biológico sintético. Este foi desenvolvido com a utilização de microplacas com 96 poços, possibilitando a avaliação simultânea de vários compostos (REIS; SINKO; SERRA, 2010).

A aplicação da técnica PAMPA a ensaios de avaliação da permeabilidade da pele é ainda incipiente e existem poucos trabalhos na literatura relativos ao assunto. (OTTAVIANI; MARTEL; CARRUPT, 2007; SINKÓ et al. 2009).

O sistema PAMPA pode ser utilizado também na avaliação preliminar da segurança de promotor de permeação pela sua retenção na membrana artificial, pois é desejável que haja a permeação do fármaco e a permanência do promotor no *stratum corneum*. Visando a segurança e utilizando esse conceito Fujikawa e colaboradores (2009) desenvolveu método para avaliação da bio-acumulação de agroquímicos (FUJIKAWA et al., 2009).

Entre os métodos biofísicos úteis para avaliar a interação de promotores de permeação com o estrato córneo estão os métodos espectroscópicos Raman com transformada de Fourier (FT-Raman), a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR- FTIR) e a espectroscopia Raman Confocal (OBATA et al., 2010; GUILLARD et al., 2009); WILLIAMS et al., 1993;

WILLIAMS; BARRY, 1994; BABY et al. , 2006 a; BABBY et al., 2006 b; BABY et al. 2007; BABY et al., 2008; BABY et al., 2009).

O diclofenaco de sódio é um agente antiinflamatório não esteroide, de interesse para uso em formulações tópicas, entretanto pela característica hidrófila deste fármaco é conhecida a dificuldade de administração por essa via. Desta forma, tem sido eleito modelo de fármaco hidrofílico utilizado como marcador em estudos de permeação na literatura (OBATA et al., 1993; CHUASUWAN et al., 2009).

Diante do exposto, a avaliação dos óleos essenciais da *P. pseudocaryophyllus*, procedente de três ecossistemas distintos, como promotor de permeação do diclofenaco de potássio é relevante. Além disso, o desenvolvimento de sistema PAMPA baseado em membrana biológica artificial para a avaliação da segurança e eficácia desses óleos essenciais e componentes majoritários auxilia na triagem de compostos eficazes e seguros.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção e avaliação da eficácia do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum e dos seus componentes majoritários como promotores de permeação cutânea do diclofenaco de potássio, por meio da utilização de métodos biofísicos e por ensaios de permeação em membrana natural e biológica artificial.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar o **óleo essencial** da *P. pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum.
- Avaliar a interação do **óleo essencial e dos componentes majoritários** com membrana natural e com candidatas a membrana biológica artificial, a qual mimetize a composição lipídica do *stratum corneum* humano, por métodos biofísicos.
- Desenvolver sistema PAMPA com a membrana biológica artificial selecionada.
- Avaliar a segurança **óleo essencial e dos componentes majoritários** no sistema PAMPA.
- Avaliar o efeito do **óleo essencial e dos componentes majoritários** em diferentes concentrações na promoção da permeação do diclofenaco de potássio no sistema PAMPA.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A pele como via de administração de fármacos

A veiculação de fármacos pela via tópica apresenta vantagens sobre as vias oral e sistêmica e tem atraído considerável interesse nos últimos anos. A veiculação de fármacos por esta rota apresenta diversas vantagens sobre a via oral ou sistêmica, tais como prevenção da etapa inicial de metabolização hepática do fármaco, possibilidade de administração contínua e efeitos colaterais potencialmente menores. Porém, a baixa permeabilidade da pele em relação a outros tecidos biológicos torna limitada sua utilização como via de administração, uma vez que limita a eficácia de formulações tópicas (AQIL et al., 2007; ANIGBOGU et al., 1995; PARK et al., 2000; ALVAREZ-ROMÁN et al. 2004; MOSER, 2001; BARRY, 2001; SINKÓ et al., 2012).

Tal limitação se deve ao fato de que a pele humana atua como uma barreira eficiente 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; CORNWELL et al., 1996; WILLIAMS; BARRY, 2004 a; SAPRA; JAIN ; TIWARY, 2008).

A camada mais externa da pele, a epiderme, e em particular o estrato córneo, representa a principal barreira à penetração de substâncias. Essa camada é formada por células mortas e queratinizadas, denominadas corneócitos, circundadas por uma matriz lipídica, que preenche a região intercelular. A matriz intercelular contém uma mistura complexa de lipídeos, organizados de forma ordenada em estruturas de multicamadas conhecidas como lamelas lipídicas, compostas principalmente por ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol, em proporções equimolares (ANIGBOGU et al., 1995; BARRY, 2001; SAPRA; JAIN; TIWARY, 2008; BARRY, 1983).

Os produtos dermatológicos de uso tópico têm sido desenvolvidos tanto para a veiculação de fármacos para tratamentos locais de problemas na pele, quanto para a obtenção de efeitos sistêmicos, sendo neste caso denominados transdérmicos. Em ambos os casos, é o estrato córneo, camada mais externa da pele, a barreira limitante para a permeação e biodisponibilidade dos fármacos.

Existem atualmente no mercado sistemas transdérmicos para diversos fins, como terapia de reposição hormonal, controle da dor, tratamento de angina e tratamentos neurológicos, entre outros (SINKÓ et al., 2012). A passagem rápida do fármaco através da pele, com um mínimo de retenção local são características importantes para neste tipo de preparação (BARRY, 1983).

Por outro lado, nos produtos dermatológicos de ação local visando o tratamento de problemas dérmicos, as características principais são o fluxo mínimo do fármaco através da pele e máxima retenção local, minimizando a exposição a efeitos sistêmicos e mantendo uma concentração adequada na pele pelo período de tempo necessário para produção do efeito farmacológico (ZATZ, 1993).

A pele é o tecido que recobre o corpo humano e é o mais facilmente acessível. É elástica, flexível e, nas condições fisiológicas normais, tem capacidade de regeneração. Sua espessura é de apenas alguns milímetros e sua principal função, embora não a 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 microrganismos, agentes químicos e várias formas de radiação, mantendo os tecidos e fluídos corporais em seu interior (CHIEN, 1992; ZATZ, 1993). A barreira à permeação da água não é absoluta e o há movimento normal da água através do estrato córneo para a atmosfera, denominada de perda transepidérmica de água (*transepidermal water loss-TEWL*), que representa parte da água perdida de forma imperceptível (MADISON, 2003).

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 por secreção glandular e regulação da pressão sanguínea. A pele não é um tecido homogêneo, pois possui folículos pilosos, terminações nervosas, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e vasos sanguíneos (BARRY, 1983).

3.1.1. Estrutura da pele

A função barreira da pele está relacionada diretamente à sua estrutura e composição, em particular à composição e arranjo das moléculas de lipídeos da sua camada mais externa, o estrato córneo. Assim, o conhecimento da estrutura e das propriedades do estrato córneo a nível molecular é de fundamental importância para o estudo da penetração de fármacos através do tecido e para o desenvolvimento racional de novos sistemas de liberação tópica (KESSNER et al., 2008; MADISON, 2003).

Em termos anatômicos, a pele é formada por camadas histológicas que podem ser agrupadas em três tecidos: epiderme, derme e tecido subcutâneo. O tecido subcutâneo é a porção mais interna e se espalha por todo o corpo como uma camada fibro-gordurosa. É o local de síntese e armazenamento de compostos energéticos facilmente disponíveis. A derme está sobreposta a este tecido, e é formada essencialmente por uma matriz de tecido conectivo composto por proteínas fibrosas envolvidas por uma substância amorfa de mucopolissacarídeos. Vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos passam através desta matriz. Aí estão também localizados os apêndices cutâneos: glândulas sudoríparas e unidades pilo-sebáceas, corpúsculos responsável pelas sensações táteis superficiais e profundas (corpúsculos de Meissner e Pacini, respectivamente) A derme necessita de suprimento sanguíneo abundante para regular a temperatura e a pressão, transportar nutrientes e remover metabólitos. A epiderme se sobrepõe à derme e é a camada mais externa da pele. Esta camada é formada por células epiteliais estratificadas, que se distinguem das células epiteliais dos demais órgãos por sofrerem um processo de diferenciação. A epiderme é composta por diferentes camadas, sendo a mais interna denominada camada basal ou estrato germinativo, que é a camada regenerativa formada por células nucleadas (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 um estado metabolicamente ativo na camada basal ou estrato germinativo até se tornarem células mortas e queratinizadas no estrato córneo (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992; BARRY, 1983). A migração e diferenciação celular envolvem a passagem sequencial das células através das camadas da epiderme: o estrato espinoso, o estrato granuloso e o estrato lúcido, até a formação da camada mais

externa e última etapa da diferenciação celular, o estrato córneo (CHIEN, 1992). O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme e é formado por células achatadas, anucleadas e desprovidas das organelas habituais e denominadas corneócitos, agrupados de forma tangencial à superfície da pele. Os espaços intercelulares são preenchidos principalmente por uma dupla camada de lipídeos, com importante papel na função barreira do estrato córneo. Na região do estrato granuloso ocorre intensa atividade bioquímica e mudanças morfológicas. (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992; BARRY, 1983). A Figura 1 apresenta o desenho representativo da pele.

Figura 1 – Representação esquemática de corte histológico da pele (Fonte: The Pharmaceutical Codex, p. 136, com adaptação pela autora)

3.1.2. Estrato córneo e função barreira

O estrato córneo 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 (DENNIS, 1990; LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992). A busca pela compreensão completa das bases moleculares da função barreira na pele saudável é relevante, considerando a possibilidade de melhorar a eficiência da barreira cutânea em casos de indivíduos com patologias da pele, idosos ou recém-nascidos,

juntamente com a necessidade de superar a barreira cutânea à permeação de fármacos e é uma área de pesquisa que tem gerado numerosos estudos envolvendo a matriz lipídica do estrato córneo (MOTTA et al., 1993; DAMIEN; BONCHEVA, 2010)

A matriz lipídica representa a única via contínua para a permeação de substâncias através do estrato córneo. É organizada em microestruturas ou arranjos moleculares na forma de lamelas, formadas por bicamadas lipídicas orientadas na direção paralela à superfície da pele e estão intimamente relacionados à função barreira (RODRIGUEZ et al., 2010; GROEN, 2008; BOUWSTRA, 2002; WATANABE et al., 2010; GOORIS; BOUWSTRA, 2007; ENGSTROM et al., 2000; DENNIS, 1990).

Os lipídeos são moléculas de natureza anfipática, formadas por uma parte hidrofóbica ou apolar e uma parte hidrofílica ou polar que interage prontamente com a água. A auto-organização das porções hidrofóbicas minimiza a superfície total que está em contato com a água e resulta em uma situação energeticamente mais estável (SIMONS; SAMPAIO, 2011).

Os lipídeos presentes nos espaços intercelulares são originados dos grânulos lamelares presentes nas células no estágio de diferenciação correspondente ao estrato granuloso. São pequenas organelas túbulo-vesiculares secretoras que contêm lamelas lipídicas em seu interior, organizadas em forma empilhada, compostas por fosfolípidos, colesterol e glucosil ceramidas, que são os precursores dos lipídeos presentes no estrato córneo. Nos estágios finais da diferenciação celular, na transição das células granulares para corneócitos, estes grânulos lamelares se fundem com a membrana celular e descarregam seu conteúdo, as lamelas lipídicas, nos espaços intercelulares. São também secretadas algumas hidrolases responsáveis pela metabolização dos fosfolipídeos e pela conversão das glicosil ceramidas em ceramidas, além de proteases que modulam o processo de descamação da pele. Paralelamente à complexa alteração da composição lipídica que se segue após o lançamento do conteúdo dos grânulos lamelares no espaço intercelular, as lamelas lipídicas se reorganizam formando estruturas lamelares de dimensões maiores (MADISON, 2003). Esta organização está representada na Figura 2 a seguir.

Figura 2. Esquema de sugestão para a organização dos lipídeos no estrato córneo. (Fonte: FRIEBERG et al., (1991) com adaptação pela autora)

A efetividade da função barreira do estrato córneo tem sido atribuída à estrutura altamente organizada das bicamadas lipídicas observadas nos espaços intercelulares. Assim, o mecanismo de auto-organização das bicamadas bem como as suas propriedades físico-químicas tem sido objeto de considerável interesse (MIZUSHIMA; FUKASAWA; SUZUKI, 1996).

A composição dos lipídeos presentes no estrato córneo é complexa, mas as três classes predominantes são o colesterol, as ceramidas e os ácidos graxos de cadeia carbônica longa, presentes em quantidades aproximadamente equimolares (FENSKE, 1994; MADISON, 2003; GOORIS; BOUWSTRA, 2007; NORLEN; SIMONSEN; DESCOUTS, 2007; LEE et al. , 2009; BOUWSTRA;GOORIS, 2010). Pequenas quantidades de sulfato de colesterol e de oleato de colesterol também podem estar presentes. (NORLEN; SIMONSEN; DESCOUTS, 2007; FENSKE et al.,1994). Esta composição lipídica difere da composição encontrada na maioria das demais biomembranas, nas quais os fosfolipídeos estão presentes (LEE et al. , 2009; SCHROTER et al., 2009).

As ceramidas são formadas por uma base esfingóide ligada a um ácido graxo por ligação amida. As porções polares das moléculas são pequenas e contém grupos funcionais capazes de formar pontes de hidrogênio. As cadeias alquílicas variam de tamanho, podendo conter entre 16 e 26 átomos de carbono. A função barreira exercida por esta matriz lipídica sobre a permeabilidade da pele depende não só dos tipos de lipídeos, mas também da proporção relativa entre eles (SINKÓ et al., 2009). Tanto as

variações nas cadeias carbônicas dos ácidos graxos quanto na estrutura da base esfingóide resulta em um grande número de subclasses de ceramidas, com diferentes tamanhos de cadeias carbônicas. A classificação para as diferentes ceramidas mais aceita segue a sugestão proposta por MOTTA et. al. (1993), baseada em agrupamentos de estruturas similares utilizando códigos comuns. Atualmente, estão descritas na literatura 12 subclasses de ceramidas, porém com os avanços das técnicas de separação e análise, é possível que este número aumente no futuro (VAN SMEDEN, et al., 2011; OCHALEK et al., 2012). Uma nova classe de ceramidas epidérmicas, 1-O-acilceramidas foi descrita recentemente (RABIONET et al., 2013).

As bases esfingóides das ceramidas presentes no estrato córneo podem ser de quatro tipos: esfingosina (S), fitoesfingosina (P), 6-hidroxiesfingosina (H) ou dihidroxiesfingosina (D). Todas as bases possuem entre 16 e 22 átomos de carbono. Os ácidos graxos ligados quimicamente às bases esfingóides podem, por sua vez, possuir três variações de estrutura, sendo denominados de ácidos graxos não hidroxilados (N), ácido graxo α -hidroxilado (A) ou ácido graxo ω -hidroxilado e possuem uma cadeia carbônica excepcionalmente longa, com até 34 átomos de carbono. A combinação das quatro bases esfingóides com os ácidos graxos tipo N e A resultam em 8 tipos de ceramidas, denominadas AS, AP, AH, AD e NS, NP, NH e ND. Foi identificada também no estrato córneo uma ceramida na qual uma molécula de ácido linoleico está ligada grupo ω -hidroxi (EO), resultando em três outros tipos de ceramidas com estruturas bastante excepcionais, denominadas EOS, EOH e EOP. As moléculas de ceramidas possuem em seu extremo, grupos que podem formar pontes de hidrogênio com as moléculas adjacentes (BOUWSTRA; GOORIS, 2010; GOORIS; BOUWSTRA, 2007; GROEN et al., 2008).

Todos os ácidos graxos e cadeias graxas com ligação na função amida nas ceramidas são lineares e saturados. Esta estrutura permite um arranjo lateral compacto e a formação de membranas altamente ordenadas, que são menos fluidas e menos permeáveis do que as membranas biológicas típicas, nas quais os fosfolípidos estão presentes (MADISON, 2003). A Figura 3 mostra as estruturas químicas das ceramidas presentes no estrato córneo.

Figura 3 - Ceramidas do estrato córneo humano (Fonte: VÁVROVÁ et al. (2005), com adaptação pela autora)

Existe outra denominação utilizada para identificar as ceramidas humanas baseada na numeração em algarismos arábicos de 1 até 9, de acordo com a posição que ocupam em placas de cromatografia em camada delgada (ROBSON et al., 1994) e as mais abundantes são CER 2, CER 5 e CER 7 (WATANABE et al., 2010; GROEN et al., 2008; GOORIS; BOUWSTRA, 2007).

Embora se acredite que as ceramidas desempenhem um papel fundamental na formação da estrutura e na manutenção da função barreira do estrato córneo, a função de cada subclasse ainda não está totalmente elucidada (KESSNER et al., 2008).

Os ácidos graxos presentes na matriz lipídica do estrato córneo são predominantemente saturados e não ramificados. As referências existentes na literatura quanto ao tamanho das cadeias carbônicas variam dentro de uma faixa estreita. Segundo Ochaleck e colaboradores (2012), as cadeias carbônicas variam de

tamanho entre 16 a 30 átomos de carbono, sendo que as espécies mais abundantes são cadeias carbônicas com 22, 24 e 26 átomos de carbono; para FENSKE et al., 1994 a predominância é de cadeias com 22 e 24 átomos de carbono. O colesterol é o lipídeo presente no estrato córneo em maior quantidade individualmente, uma vez que as ceramidas e os ácidos graxos apresentam diversidades de tamanhos de cadeias carbônicas, representando diferentes tipos de moléculas. O colesterol interage nas interfaces de sistemas de bicamadas lipídicas entre diferentes regiões da superfície, de forma similar a ação de um agente tensoativo, promovendo a estabilização das estruturas. Estudos realizados com bicamadas lipídicas preparadas apenas com ácidos graxos e ceramidas indicaram que a organização das bicamadas sem a presença do colesterol é limitada (ENGSTROM et al., 2000).

A região lipídica intercelular é o único meio contínuo presente no tecido. É atualmente aceito que as bicamadas lipídicas sejam responsáveis pela função barreira do estrato córneo. Normalmente os lipídeos se organizam em forma de bicamadas simples, com todas as porções hidrofóbicas (cadeias carbônicas apolares) voltadas umas para as outras e com as porções polares (grupos funcionais polares) voltados para fora da bicamada (LÉVÉQUE, RIBAUD e GARSON, 1992; GOORIS & BOUWSTRA, 2007). No estrato córneo, porém, as moléculas de lipídeos estão empilhadas umas sobre as outras de forma alternada, formando uma estrutura muito mais impermeável do que as bicamadas lipídicas em geral (IWAI et al., 2012).

A organização dos lipídeos no estrato córneo vem sendo estudada com o uso de várias técnicas, tais como microscopia eletrônica, espectroscopia no infravermelho, difração de raio-X e difração de elétrons (GOORIS; BOUWSTRA, 2007). Estes estudos revelaram que os lipídeos estão organizados formando duas fases lamelares, sendo uma fase de periodicidade curta (*short periodicity phase* – SPP) com periodicidade de aproximadamente 6 nm e uma fase de periodicidade longa (*long periodicity phase* – LPP), com periodicidade de aproximadamente 13 nm. Estas duas fases lamelares estão distribuídas tridimensionalmente em apenas uma direção. Em um plano perpendicular a estas fases lamelares podem ser identificadas outras formas de organização dos lipídeos, denominadas de arranjo lateral, que pode formar fase líquida (estado líquido), hexagonal (gel) ou ortorrômbica (estado sólido cristalino). O arranjo lateral é predominantemente ortorrômbico, embora também tenha sido observado arranjo hexagonal. Alterações na organização destas estruturas interferem

na função barreira da pele (VOEGELI; RAWLINGS, 2013; GROEN et al., 2010; BOUWSTRA; GOORIS, 2010).

3.2. Permeação através do estrato córneo

O processo de permeação através do estrato córneo pode ser descrito pelas leis da física aplicáveis para a difusão passiva. O processo de difusão passiva envolve a movimentação de uma substância através de uma membrana, de uma região para outra, no interior de um sistema, segundo gradiente de concentração e de acordo com um movimento molecular randômico; é termodinamicamente espontâneo e irreversível. A descrição matemática do processo é conhecida como Lei de Fick (RIEGER, 1993; BARRY, 1983).

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), conforme representado na Equação 1:

$$J = \frac{dc}{dH} \quad (1)$$

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 conforme Equação 2 (MARTIN, 1993; RIEGER, 1993; BARRY, 1983; MOGHIMI, WILLIAMS e BARRY, 1996 (b); SCHEUPLEIN & BLANK, 1971).

$$J = \frac{K_m D \Delta C}{H} \quad (2)$$

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

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 se torna 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 já foi estabelecida *in vivo* e *in vitro* pela passagem de fármacos através de estrato córneo isolado, de epiderme e de pele total. Nestes tipos de experimentos, o receptor, que pode ser um líquido artificialmente constituído ou um fluido corporal, deve manter uma concentração do fármaco permeante constantemente baixa, sendo esta condição denominada de *sink condition* (RIEGER, 1993).

No estado de equilíbrio é possível assumir que a concentração do permeante é nula na interface receptora, ou seja, *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 ;BARRY, 1996(a); SCHEUPLEIN & BLANK, 1971), conforme Equação 3.

$$J = \frac{K_m D C_v}{H} \quad (3)$$

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 (C_v) é expresso em moles/cm³ (SCHEUPLEIN & BLANK, 1971; RIEGER, 1993).

Existem três rotas potenciais para a veiculação de moléculas desde a superfície da pele até as suas camadas mais internas, que são via folículos pilosos e glândulas sudoríparas ou via estrato córneo contínuo (BARRY, 2001; ZATZ, 1993).

A permeação através dos folículos pilo-sebáceos e dos ductos de glândulas sudoríparas, denominados *shunts*, também ocorre, mas é pouco significativa uma vez os *shunts* representam apenas cerca de 0,1% da área superficial total da pele (BARRY,2001; ZATZ, 1993).

No estrato córneo contínuo, por sua vez, existem duas alternativas para a penetração pela barreira cutânea, que são a rota intercelular, passando apenas através da fase lipídica intercelular e a rota transcelular, que envolve a passagem alternada através das proteínas celulares e dos lipídeos intercelulares, conforme ilustrado na Figura 4 (MOGHIMI *et al.*,1996; ZATZ,1993; BARRY,2001; ELIAS *et al.*,1981;BARRY,1983). Neste sistema de dois compartimentos a única fase contínua é a região lipídica intercelular (MOGHIMI *et al.*,1996).

Figura 4 - Rotas intercelular e transcelular através do estrato córneo (Fonte: MOGHIMI *et al.*,(1996), com adaptação pela autora)

3.2.1. Fatores que interferem na permeação de fármacos pela via tópica

O efeito farmacológico produzido por uma forma de farmacêutica de aplicação tópica ocorre após uma sequência complexa de processos, que envolvem a liberação do fármaco do veículo, a penetração na ou através da pele e a ativação da resposta farmacológica desejada no tecido alvo. Entre as características físico-químicas do

fármaco, são fatores importantes o tamanho molecular, o coeficiente de partição, a solubilidade e o pH da formulação. A concentração do fármaco na formulação é fator fundamental, uma vez que a taxa ou fluxo de penetração é proporcional à concentração, de acordo com a Lei de Fick. Em geral, a permeação através da pele é favorecida para moléculas de dimensões inferiores a 500 Da, que apresentem características tanto lipofílicas e hidrofílicas e que estejam presentes na formulação em forma não ionizada (RIVIERE, 1993; BARRY, 2001).

A principal característica relacionada à formulação que pode afetar a permeação através da pele é a liberação do fármaco, a partir da fórmula, para a superfície da pele. A liberação é influenciada pela afinidade do fármaco pelo veículo da formulação e pelas propriedades físico-químicas do próprio fármaco, como a solubilidade e o coeficiente de partição. O coeficiente de partição é o parâmetro que mede a afinidade relativa do fármaco pelo estrato córneo e pelo veículo e representa a característica mais importante referente à formulação que influencia na permeação e distribuição através da pele. Em situações onde uma membrana representa a principal resistência à difusão, como é o caso dos processos de absorção pela pele, o coeficiente de partição do fármaco entre o veículo e o estrato córneo é de fundamental importância no estabelecimento de concentrações iniciais adequadas do fármaco na camada mais externa da pele. Se a afinidade do fármaco pelo veículo é muito grande, o coeficiente de partição com o estrato córneo é reduzido e a liberação do fármaco do veículo pode ser a etapa limitante do processo de absorção (BARRY, 1993).

Os ensaios de liberação de fármacos *in vitro* são ferramentas importantes para esta avaliação. No momento, ainda não existem procedimentos oficiais descritos em farmacopeias para a condução de ensaios de liberação em formulações tópicas, porém o *Food and Drug Administration*, FDA, publicou um guia sobre o assunto (*Guidance for Industry on Scale Up and Post-Approval Changes for Semisolid*) (UNITED STATES), que preconiza a realização de estudos de liberação em células de difusão vertical (células de Franz) para fins caracterização biofarmacêutica e controle de qualidade. O ensaio é conduzido com uso de uma membrana de material sintético inerte, que deve oferecer a menor resistência possível à difusão do fármaco, de forma que o fator limitante seja a liberação do ingrediente ativo da formulação.

Outros fatores relacionados à formulação que podem afetar a permeação de fármacos pela via tópica são os excipientes e/ou a presença de promotores de permeação.

A permeação pela via tópica sofre também a influência das características da pele do local de aplicação. Em geral, a permeabilidade da pele está aumentada nas regiões afetadas por doenças relacionadas à alteração da formação do estrato córneo, como é a psoríase (BARRY, 1983; RIVIERE, 1993; LANGER; WISE, 1984). A idade do indivíduo, os sítios regionais e o estado de hidratação da pele são outros fatores de natureza biológica que afetam com a permeabilidade da pele (LANGER; WISE, 1984; RIVIERE, 1993; ELIAS, et al., 1981).

3.3. Modelos *in vitro* para avaliação da permeação através da pele

O modelo científico ideal para estudos de permeação cutânea de fármacos pressupõe a realização de testes de avaliação em seres humanos, porém estes modelos são de alto custo, trabalhosos e demorados; existe também o risco de ocorrência de reações adversas desconhecidas envolvendo novos produtos, tornando este modelo de difícil aplicação. Experimentos *in vivo* em humanos representam apenas uma pequena porcentagem dos estudos conduzidos nesta área. A literatura referente à pesquisa em permeação cutânea descreve, em sua maioria, estudos realizados em animais de experimentação ou em modelos *in vitro* (FRANZ, LEHMAN; MAJMUDAR, 1998; BEHL et al., 1993; SINKÓ et al., 2012).

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).

Considerando os modelos para estudos *in vitro*, a membrana de escolha para estudos é preferencialmente o estrato córneo humano, obtido em geral de cirurgias ou de autópsias. O uso deste material é, porém, limitado pelas dificuldades na obtenção e no armazenamento, além das restrições relativas aos aspectos éticos. Tais limitações levaram à busca de materiais alternativos de origem biológica para utilização como modelo de membrana (ITOH, et al., 1990a; ITOH et al., 1990b; LOPES; KANEKO, 2000).

A pele de animais de experimentação é mais fácil de ser obtida; 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 do que a pele humana (ITOH, et al., 1990a, RIGG; BARRY, 1990). Existem os aspectos éticos a serem considerados na utilização de animais de experimentação.

A pele artificial desenvolvida com base na cultura de células é também alternativa ao uso de pele humana ou de animais de experimentação. Estes modelos de membrana são úteis para estudos de triagem em permeação cutânea. Alguns modelos comercialmente disponíveis são *SkinEthic Rhe* e *EpiSkin* comercializados pela empresa SkinEthic; *Epiderm* da empresa MatTek; *StrataTest* da empresa StrataTech e *Epidermal Skin Test 1000 (EST1000)* da empresa CellSystems Biotechnologie GmbH (ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2012).

Entre os materiais biológicos alternativos, a pele de muda de cobra pode ser um modelo útil para o estrato córneo humano. Diversos pesquisadores têm avaliado a aplicabilidade da pele de cobra em estudos de permeação, com diferentes graus de sucesso (RIGG; BARRY, 1990; LOPES, KANEKO, 2000; WIDLER, SIGRIST e GAFNER, 2002; BABY et al., 2006 a; BABY et al., 2006 b; BABY et al., 2007; BRITO et al., 2009). A pele de cobra fornece uma barreira similar ao estrato córneo 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. O material biológico é de fácil armazenamento e não sofre degradação microbiológica. É composto por estrato córneo puro, não viável e é desprovido de folículos pilosos (ITOH et al., 1990a; ITOH et al., 1990b).

A principal diferença morfológica entre o estrato córneo humano e a pele de muda de cobra reside na existência de uma camada externa composta basicamente por β queratina, inexistente no estrato córneo humano. Esta camada pode ser removida com a aplicação do processo de *tape stripping* em porções ventrais da pele de muda de cobra, aumentando a similaridade do material com o estrato córneo humano (BABY et al., 2006(a); BABY et al., 2008; BABY et al., 2007).

3.3.1. Membranas lipídicas artificiais para estudos de permeação cutânea

Os avanços no conhecimento da composição e da organização molecular dos lipídeos presentes no estrato córneo humano, aliados ao entendimento do papel destes compostos na função barreira da pele, tem despertado o interesse pelo desenvolvimento de membranas lipídicas artificiais similares ao estrato córneo humano para uso em estudos de permeação *in vitro*. (OCHALEK et al. 2012 (a); OCHALEK et al. 2012 (b); ENGELBRECHT et al., 2012; LEE et al., 2009; GOORIS; BOUWSTRA, 2010; KESSNER et al., 2008; SINKÓ et al., 2012). Estes modelos representam a porção lipídica localizada nos espaços intercelulares do estrato córneo, que compõe a única via contínua para a permeação de substâncias através do tecido (RODRIGUEZ et al., 2010; GROEN, 2008; WATANABE et al., 2010; GOORIS; BOUWSTRA, 2007). Esta abordagem permite também o desenvolvimento de modelos de membrana contendo as proporções de lipídeos encontradas em algumas doenças da pele relacionadas a alterações na função barreira decorrentes de alterações na porção lipídica como, por exemplo, a psoríase (GOORIS; BOUWSTRA, 2007). Em geral, estas membranas são obtidas pela impregnação de filtros sintéticos porosos e inertes com misturas lipídicas de composição similar à do estrato córneo.

3.4. Promotores de permeação cutânea

Lembrando que a função barreira da pele está relacionada à composição e ao arranjo estrutural complexo dos lipídeos do estrato córneo, a abordagem mais amplamente utilizada na atualidade para vencer a barreira da pele visando à veiculação de fármacos tem sido a utilização de promotores químicos de permeação.

Um promotor de permeação deve reduzir reversivelmente a barreira da pele sem causar danos às células viáveis. A relação de substâncias estudadas para este fim é extensa e a pesquisa é permanente, frente à necessidade da seleção de substâncias eficazes e seguras (YAMANE, 1995).

Um promotor de permeação ideal deve reunir as seguintes propriedades (FINNIN; MORGAN, 1999; BARRY, 1983; GANEM-QUINTANAR, 1997; WILLIAMS; BARRY, 2004a):

- 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- Início de ação rápido, efeito com duração previsível e adequada ao fármaco utilizado;
- 4- O estrato córneo deve recuperar completamente suas propriedades normais após a remoção do promotor;
- 5- A diminuição da função barreira do estrato córneo 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 por exemplo, através do aumento da atividade termodinâmica do fármaco no veículo com o uso de co-solventes ou através do aumento do coeficiente de partição do fármaco, favorecendo desta forma sua liberação do veículo para a pele. Nestes casos, porém, as substâncias envolvidas não são consideradas como promotores de permeação (FINNIN ; MORGAN,1999; BARRY,1983; GANEM-QUINTANAR,1997; WILLIAMS; BARRY,2004a).

Os promotores de permeação podem atuar sobre o estrato córneo de diferentes formas, segundo o conceito de ação via lipídeo-proteína-partição, que sugere que os promotores atuam por uma ou mais rotas dentre estas três principais (BARRY, 2001; GANEM-QUINTANAR et al.,1997), conforme segue:

- Ação sobre os lipídeos: rompendo a organização estrutural dos lipídeos do estrato córneo, tornando-o mais permeável. As moléculas do promotor penetram nas

bicamadas, promovendo sua rotação, vibração e translocação, formando micro-cavidades 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. O dimetil sulfóxido (DMSO) a Azone[®], alguns terpenos, ácidos graxos e álcoois atuam por este mecanismo. Alguns solventes como o DMSO e o etanol podem extrair lipídeos fazendo o estrato córneo mais permeável pela formação de canais aquosos.

- Ação sobre as proteínas: compostos com os tensoativos iônicos e DMSO interagem fortemente com a queratina dos corneócitos, 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 estrato córneo e aumentam o coeficiente de partição membrana/soluto (K_m), favorecendo a partição de uma segunda molécula.

A Figura 5 ilustra os sítios de ação dos promotores de permeação na porção lipídica do estrato córneo.

Figura 5 – Representação esquemática da ação dos promotores de permeação na matriz lipídica intercelular (Williams e Barry (2004) com adaptação pela autora)

A interação com os lipídeos intercelulares é fator de importância para a eficácia dos promotores de permeação, uma vez que esta é a única rota contínua para a passagem através do estrato córneo. O mecanismo de ação destas moléculas nas bicamadas lipídicas envolve a interação dos promotores de permeação com dois sítios, que são os grupos polares dos lipídeos e/ou as cadeias carbônicas apolares das bicamadas (FINNIN; MORGAN,1999 ; ANJOS; SOUSA NETO; ALONSO,2007; WILLIAMS; BARRY,2004a; SAPRA;JAIN ;TIWARY, 2008; GUILLARD et al., 2009). Desta forma, o mecanismo de ação dos promotores de permeação que atuam sobre a porção lipídica do estrato córneo depende da polaridade da molécula.

3.4.1. Terpenos como promotores de permeação cutânea

Numerosos compostos têm sido avaliados quanto à atividade de promoção da permeação da pele, entre eles os sulfóxidos (dimetil sulfóxido, DMSO), Azonas (laurocapran), pirrolidonas (2-pirrolidona), álcoois (etanol), glicóis (propilenoglicol), os surfactantes e os terpenos. Uma vez que a pele tem a função de atuar como uma barreira à entrada de compostos do meio externo no organismo, a segurança dos

promotores químicos de permeação é de fundamental importância para a manutenção da integridade do meio interno (EL-KATTAN, 2001; BARRY, 2001). Pesquisas vêm sendo feitas para identificar promotores de permeação seguros e eficazes, tanto de fontes naturais quanto sintéticas (KANG, 2007; SAPRA; JAIN; TIWARY, 2008). Neste sentido, o estudo dos terpenos é relevante. Os terpenos são os principais componentes dos óleos essenciais e são compostos químicos de baixa irritabilidade cutânea quando utilizados em baixa concentração (<5%), possuem baixa toxicidade sistêmica e são considerados promissores como promotores de permeação (EL-KATTAN et al., 2001; SONGKRO; RADES; BECKET, 2009; ARELLANO et al., 1996; GAO; SINGH, 1998; MONTI et al., 2002; OHARA; TAKAYAMA; NAGAI, 1995; KUNTA et al., 1997; AQIL et al., 2007).

Os compostos desta classe possuem moléculas pequenas, não ionizadas e lipofílicas, que penetram o estrato córneo com facilidade (CAL, 2006). São constituídos por diferentes grupos químicos tais como álcoois, óxidos, cetonas e hidrocarbonetos e são formados apenas por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. Alguns terpenos e alguns óleos essenciais são classificados pelo *Food and Drug Administration*, FDA, como *Generally recognized as safe* (GRAS - FDA) (UNITED STATES). Existem trabalhos na literatura que referenciam a essa citação como relevante (GODWIN; MICHNIAK, 1999; ANJOS; SOUSA NETO; ALONSO, 2007; YAMANE; WILLIAMS; BARRY, 2004; NOKHODCHI et al., 2006).

Os terpenos são derivados do metabolismo secundário das plantas e acredita-se que tenham uma função de defesa na sobrevivência das plantas e em diferentes interações destas com os ecossistemas. Embora exista uma enorme diversidade estrutural e complexidade química entre os compostos desta classe, todos estão unidos pela mesma rota de biossíntese, o que permite o agrupamento em categorias baseadas na quebra das moléculas em unidades estruturais com 5 átomos de carbono (C_5H_8), denominada isopreno. São também denominados como isoprenóides ou terpenóide e são classificados como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (DEWICK, 2009).

Os monoterpenos e sesquiterpenos são geralmente voláteis e, quando ocorrem como únicos terpenos, são geralmente denominados óleos essenciais, assim conhecidos pelas características de essência ou fragrância típicas destes dois tipos de terpenos. A presença de monoterpenos ou sesquiterpenos como a única fração de

terpenóides é mais comum em plantas herbáceas e arbustos e ocorre raramente nas espécies que se desenvolvem como árvores. A maioria dos terpenos é modificada por reações de ciclização, embora o arranjo original com a estrutura do isopreno ainda possa ser reconhecido na estrutura cíclica. Representam o maior grupo de produtos naturais, com mais de 35.000 compostos conhecidos. Além dos terpenos, os fenilpropanóides são também derivados do metabolismo secundário de plantas que podem estar presentes nos óleos essenciais, porém são originados por uma via biossintética diferente dos terpenos, sendo derivados do ácido cinâmico ou fenilpropano, composto que possui um anel benzênico (C6) e uma cadeia lateral propílica (C3) (DEWICK, 2009; LANGENHEIM, 2003; AQIL et al., 2007; SINHA; KAUR, 2000).

Vários terpenos têm mostrado aumento da permeação cutânea, tanto de fármacos hidrofílicos quanto de fármacos lipofílicos. Embora ainda não se conheça completamente seu mecanismo de ação, na maioria das moléculas avaliadas, a ação envolve a ruptura da estrutura lipídica do estrato córneo, a extração de lipídeos do tecido ou o aumento da sua hidrofiliidade (AQIL et al., 2007; SAPRA, JAIN; TIWARY, 2008; BOIX et al., 2005; ARELLANO et al., 1996; WILLIAMS; BARRY, 2004; CAL; SZNITOWAKA, 2003; JAIN et al., 2008; SONGKRO et al., 2009; GODWIN; MICHNIAK, 1999; CORNWELL; BARRY, 1994; YAMANE; WILLIAMS; BARRY, 1995; FANG et al., 2004; FANG et al., 2003; KANG et al., 2007; SAPRA; JAIN; TIWARY, 2008).

Williams e Barry (2004) realizaram uma revisão sobre o assunto, na qual constam algumas informações sobre relações estrutura-atividade já identificadas. Segundo os autores, os terpenos com estrutura de hidrocarbonetos são menos eficientes na promoção da permeação de fármacos hidrofílicos em comparação com terpenos com estrutura contendo função álcool ou cetona e a maior eficácia é atribuída aos terpenos com grupo óxido e aos terpenóides. Dentro do grupo dos óxidos, os éteres cíclicos são mais eficazes do que os epóxidos. Para fármacos mais lipofílicos, os terpenos com estrutura de hidrocarboneto são, em geral, mais eficientes. Existe também a correlação entre a eficácia e o tamanho da molécula, sendo que os terpenos com moléculas menores são mais eficazes do que os sesquiterpenos (WILLIAMS, BARRY, 2004).

Os monoterpenos são os terpenos mais frequentemente avaliados como promotores de permeação e, dentro desta classe, os terpenos cíclicos tem sido mais estudados do que os acíclicos (CAL; SZNITOWSKA, 2003).

O efeito de promoção da permeação de monoterpenos e sesquiterpenos sobre o fármaco 5-fluorouracil, com características hidrofílicas, foi avaliado por Yamane, Williams e Barry (1994) utilizando pele humana em ensaio *in vitro*. Os terpenos foram utilizados para pré-tratamento de amostras de estrato córneo e foram utilizados puros ou solubilizados em propilenoglicol; o fármaco foi aplicado como uma solução saturada. Observou-se que a interação dos terpenos com a membrana, considerando a aplicação dos óleos puros, depende apenas da solubilidade do óleo no estrato córneo, enquanto a captura do terpeno a partir de uma solução depende da partição do terpeno entre a solução e o estrato córneo. Os resultados indicaram que o propilenoglicol teve efeito sinérgico no efeito promotor da permeação do fármaco exercido pelos terpenos.

A utilização da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi utilizada por Jain e colaboradores (2002) para elucidar o mecanismo de ação dos terpenos mentol, terpineol, cineol e mentona como promotores de permeação sobre o fármaco cloridrato de imipramina em epiderme de ratos *in vitro*. Todos os terpenos avaliados possuem átomo de oxigênio em sua estrutura, pertencentes às classes químicas éteres, álcoois e cetonas. O solvente utilizado para os terpenos foi a mistura etanol:água na proporção de 2:1. Observou-se aumento da permeação do fármaco e após tratamento da pele com os terpenos, foram observadas alterações na região de 1650 cm^{-1} (Amida I), associada às pontes de hidrogênio das ceramidas. Esta alteração indicou que a quebra das pontes de hidrogênio das ceramidas do estrato córneo pode ser um mecanismo de ação para as classes de terpenos avaliadas.

Estudos realizados por Cornwell e Barry (1993) utilizando pele humana *in vitro* avaliaram o efeito de promoção da permeação de 12 sesquiterpenos para o fármaco 5-fluorouracil. Foram avaliados compostos lineares e cíclicos, contendo ou não oxigênio na molécula, que foram aplicados sobre a pele como pré-tratamento. Os resultados indicaram que os compostos avaliados favoreceram a permeação do fármaco hidrofílico. Observaram também que os sesquiterpenos contendo grupos funcionais polares foram, em geral, mais eficazes do que aqueles com estrutura de hidrocarboneto e também que os compostos com moléculas menos ramificadas foram mais eficientes, possivelmente pela facilidade de alinhamento nas bicamadas lipídicas. O mecanismo de ação envolvido parece ser a atuação sobre os lipídeos intercelulares, promovendo a separação lateral das cadeias lipídicas com a criação de

canais hidrofílicos na membrana, de forma similar ao mecanismo de ação observado para o ácido oleico, promotor de permeação amplamente estudado.

Cornwell e colaboradores (1996) estudaram o mecanismo de ação dos terpenos na pele humana *in vitro* utilizando técnica de calorimetria exploratória diferencial, difração de raio-X e estudo de retenção na pele, para limoneno (monoterpeno cíclico), cineol (éter cíclico) e nerolidol (sesquiterpeno oxigenado); avaliaram também a sinergia entre os terpenos e o propilenoglicol. Com as técnicas utilizadas, foi possível observar que o propilenoglicol puro não promoveu alterações na conformação dos lipídeos do estrato córneo, porém os resultados indicaram que as alterações promovidas pelos terpenos sobre os lipídeos do estrato córneo são mais intensas na presença do propilenoglicol. O mecanismo que governa esta sinergia, porém, ainda não está esclarecido. Os estudos de retenção dos terpenos no estrato córneo, realizados após contato de 12 h com os terpenos, indicaram ocorrência de retenção, sendo que os valores obtidos, com base peso/peso para o tecido seco foram de 8,9% para o limoneno, 26,2% para o cineol e 39,6% para o nerolidol. Estudos de retenção de promotores de permeação não são encontrados com frequência na literatura, mas são relevantes por possibilitar a verificação da existência de *pool* dessas substâncias no tecido.

O efeito de promoção da permeação do diclofenaco de sódio a partir de formulação de gel com carbômero e propilenoglicol foi conduzido por Arellano e colaboradores (1996). Os ensaios de permeação foram realizados *in vitro*, em pele abdominal de ratos. Foram avaliados oito tipos terpenos, de diferentes classes químicas, compreendendo hidrocarbonetos, álcoois, cetonas e óxidos; aromáticos e alifáticos e um sesquiterpeno, o nerolidol, na concentração de 1,0% p/p na fórmula. O melhor resultado de promoção da permeação do fármaco foi verificado para o terpeno geraniol, um monoterpeno acíclico contendo a função álcool.

A influência da formulação sobre o efeito de promoção da permeação exercido por 5 tipos de terpenos foi avaliada por Cal (2006). A absorção dos terpenos é em geral demonstrada indiretamente pelo aumento da permeabilidade de fármacos através da pele tratada. Nesse estudo, porém, o efeito da formulação sobre a penetração do terpeno na pele foi avaliado, comparando o uso de diferentes veículos dermatológicos: emulsão óleo em água, solução oleosa e gel aquoso para veicular o promotor de permeação. A técnica utilizada foi o *tape stripping* de pele humana, em ensaios *in vitro*. Os resultados indicaram que os terpenos avaliados tiveram maior

penetração na pele quando incorporados em fórmula de gel aquoso, uma vez que este tipo de formulação favoreceu a partição das moléculas dos terpenos com o estrato córneo.

Além dos terpenos isolados, a aplicação de óleos essenciais como promotores de permeação tem sido objeto de estudo.

Fang e colaboradores (2004) avaliaram o efeito promotor da permeação do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum*) para os fármacos indometacina e fluorouracil. O óleo essencial foi extraído e processado de forma a obter duas frações com características de polaridades diferentes. Os ensaios foram realizados em células de Franz utilizando pele de rato. As duas frações do óleo apresentaram efeito positivo na permeação dos fármacos, sendo que a fração com de polaridade mais baixa teve efeito promotor mais acentuado para os dois fármacos. O mecanismo de ação do óleo parece estar relacionado ao aumento da partição do fármaco com o estrato córneo.

O óleo de manjeriço foi avaliado como promotor de permeação por Jain e colaboradores (2008) para o fármaco cloridrato de labetalol, comparando o efeito do óleo com os terpenos individuais cânfora, geraniol, timol e com o óleo de cravo, utilizando a mistura etanol:água 60:40 como solvente. O linalool, um álcool, é o principal constituinte do óleo de manjeriço e representa 62% dos componentes. O eugenol é um fenilpropanóide presente nos dois óleos essenciais avaliados. Os ensaios foram conduzidos em células de difusão horizontal e pele abdominal de rato. O efeito de promoção da permeação mais acentuado foi observado para o óleo de manjeriço comparativamente aos demais compostos. O mecanismo de ação sugerido para o óleo de manjeriço como promotor de permeação do fármaco foi a criação de canais hidrofílicos na estrutura lipídica do estrato córneo.

O óleo essencial do Alecrim Pimenta (*Lippia sidoides* Cham) foi avaliado por Brito e colaboradores (2009) como promotor de permeação para ácido salicílico utilizando pele de muda de cobra como membrana. Os resultados indicaram a existência de efeito significativo no aumento da permeação do fármaco. Foram obtidos espectros no infravermelho (FT-IR) para as amostras de pele tratada, onde foi evidenciada a redução na intensidade dos sinais em $2920\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$, associada aos estiramentos CH_2 de lipídeos. Dados obtidos por calorimetria exploratória diferencial evidenciaram também a redução do teor de lipídeos no tecido. Estas observações sugerem a ocorrência de extração de lipídeos causada pelo óleo essencial como um possível mecanismo de ação.

Assim, frente aos diversos trabalhos publicados, fica evidenciado que eficácia de diferentes tipos de terpenos como promotores de permeação para um determinado fármaco não é a mesma e o efeito de aumento da permeação está relacionado às características físico-químicas do fármaco, ao tipo de terpeno e ao veículo utilizado (ARELLANO et al., 1996).

3.5. *Pimenta pseudocaryophyllus*

Os óleos essenciais são encontrados em estruturas especializadas, como pêlos glandulares e bolsas secretoras, principalmente nas folhas e flores das plantas. São formados por uma mistura complexa de substâncias orgânicas voláteis, de viscosidade semelhante à dos óleos, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Compreendem, além dos terpenos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos entre outros compostos (VALLILO; BUSTILLOS; AGUIAR, 2006).

Do ponto de vista farmacológico, a literatura descreve o elevado potencial biológico apresentado pelos óleos essenciais e seus componentes majoritários de diversas espécies vegetais, principalmente a atividade antibacteriana e antifúngica (BROCHINI; LAGO, 2007). Os produtos naturais de origem vegetal são uma importante fonte de substâncias bioativas e muitos deles se constituem em modelos para síntese de fármacos. Os produtos encontrados na natureza apresentam grande diversidade em relação à estrutura e às propriedades físico-químicas e biológicas, no entanto, apesar do aumento dos estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que aproximadamente apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto o seu potencial (PINTO et al., 2002).

O Brasil tem quase um terço da flora mundial representada em dez biomas com uma biodiversidade exuberante. Entretanto, muito pouco tem sido realizado para transformar esse potencial em vantagem competitiva, em produtos e patentes, principalmente se considerarmos o desenvolvimento como forma de inserção social e de proteção e manutenção desses ecossistemas (VILLAS BÔAS; GADELHA, 2007).

Um dos principais biomas brasileiros é a Mata Atlântica, denominação mais geral para a formação florestal localizada na região costeira do Brasil. É atualmente a segunda maior floresta tropical úmida do país, só comparável à floresta Amazônica. Da área original de aproximadamente 1,3 milhões de km², restam apenas 52.000 km²

ou cerca de 5% da extensão original. A vegetação é conhecida principalmente por sua exuberância e diversidade e é uma das mais ricas do planeta. Ocupava originalmente 16% do território brasileiro, distribuída por 17 Estados. Atualmente este ecossistema está reduzido a menos de 7% de sua extensão original, dispostos de forma fragmentada ao longo da costa brasileira, no interior das regiões Sul e Sudeste (PROGRAMA EDUCAR)

Essa região de floresta é rica em espécies arbóreas que produzem óleos essenciais. Já foram obtidos óleos essenciais de mais de 300 espécies, para muitos dos quais se dispõe atualmente de informações quanto à composição química e atividade biológica referente à ação antimicrobiana, antiinflamatória e citotóxica, indicando o potencial farmacológico para algumas espécies. Entre elas pode ser citada a *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, espécie endêmica da região de Mata Atlântica (LIMA et al., 2006).

A *P. pseudocaryophyllus*, é uma *Myrtaceae* nativa e a única espécie de *Pimenta* Lindl. nativa. Sua ocorrência é registrada desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, principalmente em áreas de Mata Atlântica; ocorre também de forma rara em regiões do cerrado brasileiro (BARROS et al., 1991). Além do Brasil, a espécie também foi coletada na Bolívia (LANDRUM, 1986). A *P. pseudocaryophyllus* é conhecida popularmente como “Cataia”, “Craveiro” ou “Louro do Mato”. Estudos indicam um alto teor de óleos essenciais nas folhas, variando entre 1-2% em massa (SAKITA et al., 1994; LIMA et al., 2006; PAULA et al., 2006).

A família *Myrtaceae* é formada por cerca de 3.500 espécies subordinadas a aproximadamente 100 gêneros de árvores e arbustos. Ocorrem em todos os continentes, exceto na Antártica, com nítida predominância nas regiões tropicais e sub-tropicais (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006; JORGE, 1992; DUARTE, 2003). É uma das famílias mais importantes na estrutura das florestas brasileiras e em especial na floresta ombrófila densa ou Mata Atlântica, onde costuma ser a família dominante. Acredita-se que ocorram aproximadamente 1.000 espécies no país, sendo encontradas cerca de 320 espécies no Estado de São Paulo (DUARTE, 2003; JORGE, 1992). LANDRUM; KAWASAKI, 1997; STAGGEMEIER; MORELLATO; GALETTI, 2007; DUARTE, 2003).

As mirtáceas são uma das famílias mais complexas do ponto de vista taxonômico, com grande número de espécies e poucos estudos sobre as mesmas (FARIAS et al., 2009). Segundo Landrum e Kawasaki (1997), estima-se que menos

da metade das espécies brasileiras tenham sido estudadas. Uma das principais dificuldades encontradas para a realização de estudos da família tem sido a identificação da espécie, fato que desencoraja potenciais pesquisadores. Os autores ressaltam a necessidade de criação de instrumentos úteis à identificação das mirtáceas devido à urgência de realização de estudos em ecossistemas que podem rapidamente desaparecer. As mirtáceas brasileiras em geral não produzem madeiras de valor, sendo mais aproveitadas para fornecimento de lenha para a população local ou para confecção de pequenos objetos. As espécies frutíferas são numerosas e algumas já são comercialmente exploradas há muito tempo, como por exemplo, a goiabeira, *Psidium guajava* L., a jabuticabeira, *Myrciaria cauliflora* Mart. O. Berg, e a pitangueira, *Eugenia uniflora* L.. A família ainda apresenta um grande potencial econômico a ser explorado. Algumas espécies estão desaparecendo da natureza antes mesmo que se tenha um conhecimento básico da sua biologia (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006). Cardoso e Sajo (2006) estudaram a nervação foliar de 44 espécies pertencentes a 22 gêneros da família *Myrtoidae* e ressaltaram que apesar da importância da família *Myrtaceae* nos ecossistemas brasileiros, a morfoanatomia foliar de seus representantes é pouco estudada.

As espécies pertencentes à família *Myrtaceae* encontradas no Brasil são plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas com folhas opostas, simples e inteiras e de enervação penínervia sendo frequente a presença de nervura marginal proeminente. Os tricomas são simples, unicelulares ou bicelulares. Quando observadas contra uma fonte luminosa, as folhas deixam ver por transparência pontos translúcidos, indicativos da presença de estruturas secretoras contendo óleos essenciais (JORGE, 1992; LANDRUM; KAWASAKI, 1997). A presença de cavidades secretoras é característica frequente na família (METCALF; CHALK, 1950; DANATO; MORRETES, 2007).

O gênero *Pimenta* compreende um grupo árvores de pequeno a médio porte ou menos frequentemente arbustos. Está confinado à região do Caribe e América Central, com exceção da espécie *P. pseudocaryophyllus*, que é nativa da região sudeste do Brasil. Existem outras 14 espécies de *Pimenta* que são nativas do Caribe e América Central (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

O botânico americano Leslie Landrum realizou uma importante revisão do gênero em 1986 e reconheceu a existência de 3 subgrupos distintos da espécie no Brasil, representando variedades dentro da mesma espécie. Estas variedades foram chamadas *P. pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus*, *P. pseudocaryophyllus*

var. *fulvescens* e *P. pseudocaryophyllus* var. *hoehnei*. (LANDRUM, 1986; LIMA et al., 2006; MORGANTE et al., 2010).

O melhor conhecimento da diversidade morfológica da *P. pseudocaryophyllus* adquirido ao longo de vários anos após a revisão de Landrum em 1986 deram indícios de que a variação morfológica considerada pelo botânico pode representar mais de uma espécie brasileira de *Pimenta*. No entanto, a confirmação da existência de espécies diferentes poderá ser feita apenas com estudos do material genético (MORGANTE et al., 2010).

Existem na literatura trabalhos referentes o estudo farmacognóstico das folhas de *P. pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (PAULA et al., 2005; PAULA et al. 2008; FARIAS et al., 2009) e também estudo farmacognóstico da casca da espécie (PAULA et al., 2006).

Assim, estudos que contribuem para a ampliação do conhecimento relativo às características e aos usos potenciais da *P. pseudocaryophyllus* são relevantes.

3.6. Métodos biofísicos para o estudo de promotores de permeação

Ao longo das últimas décadas, vários métodos biofísicos foram empregados no estudo da morfologia e da dinâmica do estrato córneo com o objetivo de compreender a correlação entre sua estrutura e suas funções. Uma vez que os lipídeos representam um papel importante na permeabilidade da pele, vários métodos biofísicos como a difração de raio-X, calorimetria exploratória diferencial, ressonância magnética nuclear, espectroscopia vibracional como espectroscopia no infravermelho e espectroscopia Raman, entre outros métodos, tem sido utilizados para estudos *in vitro* dos lipídeos do estrato córneo humano e de animais. Esses métodos também têm sido utilizados para estudos conduzidos em modelos de misturas lipídicas biomiméticos ao estrato córneo, contribuindo para o esclarecimento do papel de cada componente individual na formação da função barreira (BERNARD et al., 2007).

A espectroscopia vibracional tornou-se uma das técnicas qualitativas mais utilizadas na determinação de estruturas de moléculas biológicas e no monitoramento de suas alterações de conformação (DIEM, 1993).

A natureza ordenada da estrutura molecular do estrato córneo favorece a utilização da espectroscopia vibracional. A maioria dos estudos espectroscópicos

conduzidos avalia o comportamento dos modos vibracionais das ceramidas e dos ácidos graxos, em especial dos estiramentos e deformações de grupos metileno (CH_2), que são bastante sensíveis às alterações de ordenamento ou arranjo lateral das cadeias carbônicas dos lipídeos. A espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman), a espectroscopia Raman confocal e a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR- FTIR) são métodos de ampla utilização no estudo do estrato córneo. A utilização destes métodos em conjunto tem auxiliado na compreensão do mecanismo de ação de promotores de permeação contribuindo para a seleção racional de compostos para esta aplicação (PERCOT;LAFLEUR, 2001;LEOPOLD;LIPPOLD, 1994; GOLDEN et al.,1986; WILLIAMS et al.,1993; RINTOUL et al., 1998; BABY et al. , 2006 a; BABY et al., 2006 b; BABY et al. 2007; BABY et al., 2008). As duas técnicas são complementares, sendo que em geral a espectroscopia no infravermelho é útil na avaliação de grupos polares e de pontes de hidrogênio das moléculas, ao passo que a espectroscopia Raman é mais adequada para a caracterização de porções não polares das moléculas, como por exemplo, o arranjo e o grau de ordem das cadeias carbônicas dos lipídeos (VÁVROVÁ; ZBYTOVSKÁ; HRABÁLEK, 2005).

3.6.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR- FTIR)

A ATR-FTIR é uma técnica bem estabelecida e útil ao estudo da pele. As vibrações moleculares observadas experimentalmente refletem de forma direta as características do estrato córneo. Assim, as vibrações moleculares derivadas dos lipídeos são uma boa referência para a avaliação da microestrutura e da organização das lamelas intercelulares desta camada da epiderme, que representam um dos principais pontos de permeação de fármacos na pele. Em geral, mudanças na frequência de absorção refletem mudanças no arranjo conformacional de grupos funcionais, possibilitando a observação de interação de promotores de permeação com esta camada da pele. As amostras podem ser prontamente utilizadas sem nenhuma preparação prévia (OBATA et al., 2010; GROEN et al., 2008; BERNARD et al.,2007).

Na espectroscopia ATR-FTIR, as frequências fundamentais observadas na região de $4000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ 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} , associadas às cadeias carbônicas dos lipídeos do estrato córneo (STUART,1997).

As frequências 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 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 vibrações 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 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 cm^{-1} e vibração de deformação em 1650-1580 cm^{-1} . Em amidas, a vibração de estiramento do grupo C=O ocorre em 1700-1640 cm^{-1} e do grupo N-H ocorre em 3500-3100 cm^{-1} (STUART,1997).

São de particular interesse no estudo dos lipídeos do estrato córneo as bandas observadas entre 2800 e 3000 cm^{-1} correspondentes às vibrações de estiramento C-H, associadas às cadeias carbônicas dos lipídeos. Estas absorbâncias ocorrem próximo a 2920 cm^{-1} para as vibrações CH_2 assimétricas e em 2850 cm^{-1} para as simétricas. Perturbações na organização das bicamadas provocam variações nas frequências típicas (BERNARD et al.,2007).

3.6.2. Espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman)

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). A região do espectro eletromagnético no qual

o efeito Raman é observado depende da energia da radiação incidente e dos níveis de energia moleculares envolvidos (BULKIN, 1991). É uma técnica de particular interesse no estudo de moléculas biológicas principalmente devido a pouca influência provocada pela presença da água, se presente 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; NIEMAN, 2002; HANH, et al., 2000; ANIGBOGU et al., 1995; CASPER et al., 2001).

A caracterização do estrato córneo por espectroscopia FT-Raman foi realizada por Williams, Edwards e Barry (1992), com a descrição dos modos vibracionais característicos das moléculas de lipídeos (WILLIAMS; EDWARDS; BARRY, 1992).

No estudo do estrato córneo, são de particular interesse os modos vibracionais do C-H em $3100-2700\text{ cm}^{-1}$; 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 ($1030-1126\text{ cm}^{-1}$) têm sido utilizadas para a avaliação da organização das bicamadas lipídicas em membranas biológicas modelo. A banda de estiramento C-H em 3060 cm^{-1} permanece no estrato córneo 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 estrato córneo 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).

A espectroscopia Raman confocal é uma técnica inovadora que associa um espectrômetro Raman a um microscópio confocal e possibilita a obtenção de informações em regiões micrométricas. Ao contrário dos microscópios convencionais,

onde todo o campo é iluminado, o sistema confocal mede a intensidade da luz transmitida ou refletida em uma unidade de área muito pequena da amostra. Uma das vantagens deste sistema é a redução da influência da fluorescência, fenômeno que pode ocorrer com algumas amostras em análises por FT-Raman, e a alta resolução, permitindo segmentações espaciais da amostra (GOTTER; FAUBEL; NEUBERT, 2008).

3.7. Sistema PAMPA para avaliação da permeabilidade da pele

O modelo experimental *in vitro* mais frequentemente utilizado para a avaliação da liberação e penetração de fármacos pela via tópica é baseado em células de difusão vertical de dois compartimentos, conhecidas como células de Franz. Este modelo experimental mimetiza o processo de difusão passiva que ocorre *in vivo* (OTTAVIANI; MARTEL; CARRUPT, 2006; SINKÓ et al. 2012).

As células de Franz são formadas por um sistema de dois compartimentos, geralmente confeccionados em vidro borossilicato, separados entre si por uma membrana permeante. O compartimento doador fica localizado na parte superior e recebe a solução do fármaco ou a forma farmacêutica em estudo. O compartimento receptor, localizado abaixo da membrana permeante, é preenchido com um fluido receptor, que é continuamente agitado; no decorrer do processo de permeação, amostras são coletadas deste compartimento em intervalos de tempo pré-determinados, por uma abertura lateral para doseamentos e determinação da taxa de permeação do fármaco (MARTIN, 1993; BRONAUGH & COLLIER, 1993). Estes modelos *in vitro* podem utilizar membranas biológicas ou artificiais e são úteis como procedimento para a dedução de parâmetros físico-químicos referentes ao processo de permeação cutânea, tais como determinação do fluxo, coeficiente de partição e coeficiente de difusão (BARRY, 1983; HAIGH & SMITH, 1994; SINKÓ et al., 2009).

A técnica é de difícil padronização, uma vez que diferentes laboratórios utilizam condições experimentais bastante diversas, o que pode causar divergências entre os resultados, tanto intra-laboratoriais quanto inter-laboratoriais. Embora existam equipamentos automatizados, o uso deste modelo experimental requer longos períodos de tempo para a realização das medidas e não é adequado para avaliações rápidas, necessárias nas etapas iniciais da triagem de compostos, que requerem

sistemas de alto rendimento (OTTAVIANI, MARTEL & CARRUPT, 2006; SINKÓ et.al, 2009; SINKÓ et al.,2012).

O conceito de sistemas de alto rendimento (*high-throughput system* – HTS) em ensaios de permeação surgiu na indústria farmacêutica no final dos anos 1990, advindo da necessidade de obtenção de dados de permeação gastrointestinal para grande número de compostos, nos estágios iniciais de descoberta e desenvolvimento, quando a demanda é da ordem de 500-1000 compostos por dia. O método tradicionalmente usado para a avaliação da permeabilidade passiva transcelular *in vitro*, baseado em sistema de monocamada de células Caco-2, foi considerado trabalhoso e não adequado para ensaios em larga escala. Visando atender a esta demanda, Kansy, Senner e Gubernator (1998), pesquisadores da indústria F.Hoffmann-La Roche Ltd. publicaram um trabalho pioneiro descrevendo o uso de um sistema HTS para avaliação da permeabilidade gastrointestinal passiva, denominado pela sigla “PAMPA” (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) (KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K, 1998; OTTAVIANI, MARTEL; CARRUPT, 2006).

O sistema PAMPA descrito por Kansy e colaboradores (1998) foi desenvolvido utilizando duas placas de microtitulação de 96 poços, sendo a primeira preenchida com solução tampão (pH 7,4 ou pH 6,5) , que é recoberta por outra placa de microtitulação contendo filtro hidrofóbico imobilizado, em uma montagem do tipo “sanduiche”. No experimento, o filtro foi impregnado com 1 a 20% de uma solução de lecitina de ovo em solventes inertes, representando a barreira gastrointestinal e reproduzindo o transporte passivo transcelular. O processo de transporte se iniciou com a transferência de 100 – 200 µL de solução estoque do fármaco a 250 ou 500 µM para a placa superior contendo o filtro (placa doadora). As análises foram realizadas por espectroscopia no ultravioleta, com a determinação direta das amostras nas placas aceptoras da permeação, garantindo o conceito de alto rendimento do sistema. O sistema se mostrou adequado para a avaliação rápida do efeito de variáveis sobre o processo de transporte como alterações de pH, composição de fosfolipídeos, solubilidade e uso de tensoativos (KANSKY et al., 1998). A Figura 6 a seguir ilustra a configuração do sistema PAMPA.

Figura 6 – Representação esquemática do sistema PAMPA (Fonte: REIS, 2013, adaptado pela autora)

A permeabilidade efetiva (P_e) pode ser calculada através das Equações 4 e 5. A permeabilidade calculada é efetiva quando, além da quantidade de fármaco presente nos compartimentos doador e receptor, a quantidade retida na membrana é também considerada (REIS, 2013).

$$P_e = \{-\ln [1 - C_A(t) / C_{\text{equilíbrio}}]\} / \{A \cdot (1/V_D + 1/V_A \cdot t)\} \quad (4)$$

Onde: P_e = taxa de permeabilidade em cm/s; A = área efetiva do filtro (= $f \times 0,3 \text{ cm}^2$, sendo que f = porosidade aparente do filtro); V_D = volume da solução doadora; V_A = volume da solução aceptora; t = tempo de incubação (s); $C_A(t)$ = concentração do composto na solução aceptora no tempo t ; $C_D(t)$ = concentração do composto na solução doadora no tempo t (s), sendo:

$$C_{\text{equilíbrio}} = [C_D(t) \cdot V_D + C_A(t) \cdot V_A] / (V_D + V_A) \quad (5)$$

A retenção de massa na membrana pode ser calculada pela Equação 6.

$$R = 1 - [C_D(t) \cdot V_D + C_A(t) \cdot V_A] / (C_0 \cdot V_D) \quad (6)$$

Onde: C_0 = concentração inicial do composto na solução doadora. Para a porosidade aparente do filtro de PVDF (Fluoreto de polivinilideno), o valor de $f = 1$ tem sido descrito na literatura (CHEN, 2007; AVDEEF, 2002).

Desde a primeira publicação referente ao sistema PAMPA por Kansy e colaboradores (1998) e em decorrência da versatilidade da técnica, muitas empresas farmacêuticas desenvolveram suas próprias versões do sistema. Além de versátil, as vantagens do sistema são a rapidez na realização dos ensaios o baixo custo de implantação e a possibilidade de padronização da técnica. A literatura descreve sistemas projetados para diferentes aplicações em estudos de permeação, baseados em variações nas composições lipídicas das membranas e nas condições experimentais (KANSY et al., 2004; FALLER, 2008; OTTAVIANI; MARTEL; CARRUPT, 2006; DI et al, 2003; FUJIKAWA et al.,2009).

A falta de padronização nos protocolos de condução de ensaios *in vitro* para a avaliação da permeabilidade torna os resultados disponíveis na literatura pouco confiáveis ou inconclusivos, de acordo com Reis, Sinkó e Serra (2010). Os autores realizaram uma comparação entre resultados da literatura para permeabilidade de 16 moléculas, obtidos com modelos de PAMPA com diferentes membranas lipídicas e variações nas condições de incubação para as mesmas moléculas frente aos resultados obtidos com células Caco-2 e jejuno humano, considerados como referências. Os modelos de PAMPA contemplados na avaliação foram: a) Tri-Layer PAMPA com composição lipídica formada por hexadecano/mistura de fosfolipídeos e hexano em uma configuração em camada tripla, incubação a temperatura ambiente e sem agitação por 5 a 4 h; b) PAMPA biomimético, composto por 0,8% de fosfatidilcolina, 0,8% de fosfatidiletanolamina/ 0,2% de fosfatidilserina/ 0,2% fosfatidilinositol/ 1,0% de colesterol/ 97,0% de 1,7 octadieno, incubação a 30 °C, sem agitação por 2 a 15 h; c) PAMPA 10% de lecitina de ovo, com 10% de lecitina em 1,9 decadieno, incubação a 25 °C sem agitação por 2,5 ou 24 h; d) PAMPA 1,0% lecitina de ovo em n-dodecano, incubação à temperatura ambiente, agitação orbital por 2 h; e) PAMPA *in combo* composto por solução de uma mistura de lecitina com compostos carregados negativamente, em alceno, com incubação à temperatura ambiente e agitação individual dos poços da placa por 30 m ou 15 h. Entre as considerações advindas da comparação, foi possível apontar o sistema PAMPA Biomimético como o

de melhor correlação com os valores obtidos pelo método Caco-2 (REIS; SINKÓ; SERRA, 2010).

O modelo PAMPA para a avaliação da permeabilidade através da barreira hematoencefálica foi desenvolvido por Di e colaboradores (2003). O sistema utiliza uma mistura de lipídeos de cérebro de porco, disponível comercialmente. Os ensaios de permeabilidade com este sistema mostraram-se úteis para a triagem de fármacos desenvolvidos para a penetração na barreira hematoencefálica com base no transporte passivo, com alto rendimento, reprodutibilidade e baixo consumo de materiais (DI et al., 2003).

A utilização do sistema PAMPA como método para a determinação do fator de bioconcentração de pesticidas foi avaliada por Fujikawa et al. (2009). A determinação do fator de bioconcentração de compostos é longa e de alto custo, o que tem levado ao uso de métodos computacionais baseados na relação estrutura-atividade (QSAR – *quantitative structure-activity relationship*) para a obtenção de valores estimados, baseados principalmente no coeficiente de partição 1-octano/água (P_{oct}) dos compostos. Substâncias com alto fator de bioconcentração tendem a se acumular em membranas lipídicas. Esta característica de afinidade por membranas lipídicas possibilitou utilizar o sistema PAMPA para estimar o fator de bioconcentração de 10 pesticidas organofosforados. A membrana lipídica utilizada foi preparada com solução de lecitina em 1,9-decadieno. Foram calculados os coeficientes de permeabilidade através da membrana ($P_{app-pampa}$) e os coeficientes de partição na membrana (P_M). Os resultados indicaram boa correlação entre $\log P_M$ e $\log P_{oct}$, um tradicional indicador de bioconcentração. O sistema PAMPA mostrou ser útil na avaliação da bioconcentração de vários pesticidas de forma rápida e com a utilização de amostras pequenas. Outra vantagem apontada pelo estudo foi a possibilidade da avaliação concomitante da bioconcentração e da permeabilidade dos pesticidas, parâmetros úteis para a avaliação da exposição de humanos a produtos químicos e agroquímicos (FUJUKAWA et al., 2009)

A primeira descrição da aplicação do sistema PAMPA para avaliação da permeabilidade da pele foi publicada por Ottaviani e colaboradores (2006). A membrana utilizada foi desenvolvida com a mistura de silicone e miristato de isopropila (MI) como mistura lipídica e o sistema foi denominado skin-PAMPA. O dimetil polisiloxano foi o silicone de escolha por favorecer a formação de uma barreira inerte, hidrofóbica e não porosa. O MI foi utilizado por ser um composto com porção polar e

apolar na mesma molécula, mimetizando de forma simples os lipídeos do estrato córneo e sua adição ao silicone propicia a formação de sistema com maior polaridade. A proporção entre os dois componentes utilizada foi de 70% de silicone e 30% de MI. A permeabilidade de 8 compostos foi avaliada com o sistema PAMPA e os coeficientes de permeabilidade efetiva ($\log P_c$) foram calculados. A comparação dos valores obtidos nos experimentos frente aos resultados de literatura obtidos com células de difusão utilizando membranas de silicone (Silastic®), para os mesmos compostos, mostrou uma boa correlação. Foram também realizados ensaios de permeabilidade para 19 compostos utilizando membranas formadas com quantidades crescentes de variáveis dos dois componentes, com 100% de silicone, 100% de MI, 50% de cada componente, 90% de silicone/10% de MI e 70% de silicone/30% de MI na mistura, tendo sido observado que a membrana com a proporção de 70%/30% mostrou as melhores correlações com relação ao coeficiente de permeabilidade comparativamente aos resultados reportados na literatura para a pele humana. Adicionalmente, o ensaio PAMPA também possibilitou discriminar compostos com baixa ou nenhuma retenção na membrana e compostos com alta retenção na membrana, com resultados que refletem a afinidade dos compostos pelo estrato córneo, informações relevantes para estudos de liberação de fármacos, avaliação de riscos associados ao contato com substâncias tóxicas e para fins cosméticos (OTTAVIANI; MARTEL; CARRUPT, 2006).

Tendo em vista que o modelo de skin-PAMPA desenvolvido por Ottaviani, Martel e Carrupt (2006) se baseia em mistura de silicone e MIP para formação da membrana lipídica, que não são componentes naturais da pele, Sinkó e colaboradores (2009) desenvolveram um modelo de skin-PAMPA utilizando componentes similares aos existentes na pele que são responsáveis pela função barreira. A mistura lipídica utilizadas para recobrir os filtros foi composta por ácido esteárico e colesterol em combinação com 4 tipos de compostos sintéticos análogos as ceramidas, denominados certramidas. Os ensaios de permeação foram realizados para os fármacos ciprofloxacina, nifedipina e verapamil. As certramidas foram desenvolvidas com variações no tamanho de uma das cadeias alquílicas, com número de átomos de carbonos entre 8 e 18 (CRT C₁₈-C₁₆; CRT C₁₆-C₁₆; CRT C₁₂-C₁₆ e CRT C₈-C₁₆). Estes análogos de ceramidas são estruturalmente similares às ceramidas naturais, com tamanho molecular, capacidade de formação de pontes de hidrogênio e lipofilicidade similares aos compostos naturais. A principal diferença estrutural é a ausência de

duplas ligações na cadeia lateral, fator que estabiliza as moléculas contra a degradação e facilita o manuseio e armazenamento. A reprodutibilidade do modelo foi avaliada com a realização de 6 medidas em tempos diferentes e com 3 experimentos para cada placa totalizando 18 experimentos. O desvio padrão para os dados de permeabilidade, considerando $-\log Pe$ (logaritmo negativo da permeabilidade efetiva [$-\log \text{ cm. s}^{-1}$]) foi inferior a 1,5% evidenciando boa reprodutibilidade. A certramida CTR(C₁₂–C₁₆) foi o composto com os melhores resultados, que podem estar associados à proporção das cadeias carbônicas da molécula 3:4, similares à das ceramidas naturais. A comparação deste modelo PAMPA-skin com modelo preparado com ceramidas naturais e com resultados de permeabilidade “in vivo” em humanos ainda requer novos estudos.

A permeabilidade de 7 fármacos foi avaliada com o modelo skin-PAMPA desenvolvido por SINKÓ et al., (2012) com membrana lipídica similar à composição do estrato córneo. As membranas foram preparadas com misturas lipídicas compostas por certramida, que são análogos sintéticos das ceramidas naturais e de menor custo, colesterol e ácido esteárico, em diferentes proporções. Foram utilizadas 10 certramidas diferentes quanto aos tamanhos de cadeia alquílicas, entre 8 e 18 átomos de carbono. As certramidas 10 foram avaliadas em 3 diferentes proporções nas membranas lipídicas, totalizando 30 tipos de membrana. Visando aumentar a aderência dos lipídeos ao filtro e evitar a formação de canais hidrofílicos, foi adicionado silicone à composição lipídica descrita. Os experimentos foram conduzidos com e sem utilização de agitação nas placas aceptoras. A agitação, quando presente, foi realizada com barras magnéticas colocadas em cada poço utilizando placas STIRWELL PAMPA™ da empresa Pion Inc., com período de incubação de 4 h; nos experimentos sem agitação, a incubação foi de 24-40 h. A determinação dos fármacos foi realizada por espectroscopia no ultravioleta. Os dados de permeabilidade foram analisados com programas de software PAMPA Explorer™, PAMPA Evolution™ (pION INC) e pCEL-X™. Os resultados de permeabilidade obtidos com o skin-PAMPA foram comparados com dados de permeação em pele humana de 3 bancos de dados, sendo um deles gerado pelo próprio laboratório e os dois outros de literatura. Foi selecionada uma membrana entre as avaliadas, porém sua composição completa não foi informada. Os dados de permeabilidade obtidos com o uso da membrana selecionada apresentaram boa correlação com os dados de literatura. A homogeneidade da distribuição dos lipídeos da membrana selecionada sobre os filtros

foi avaliada por espectroscopia Raman com leituras tomadas entre 1000 - 3000 cm^{-1} ; foram obtidos 390 espectros e a comparação entre eles sugeriu a presença dos mesmos componentes em todos os espectros, indicando que a membrana selecionada tem superfície homogênea e reproduzível. O sistema skin-PAMPA é de fácil padronização entre e parece ser também útil para a avaliação da permeabilidade de formulações.

Embora o modelo de sistema PAMPA para estudo da permeabilidade dérmica desenvolvido por Sinkó e colaboradores (2012) seja mais representativo como modelo de estrato córneo comparativamente ao sistema proposto por Ottaviani, Martel e Carrupt, (2006), as ceramidas utilizadas na composição da mistura lipídica das membranas são estruturalmente diferentes das ceramidas naturais e ainda não representa um sistema biomimético.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Objeto de estudo

Os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* Gomes (Landrum) foram obtidos de partes aéreas de plantas de procedentes da **Ilha de Cananéia**, região de restinga, e do **Morro da Cataia**, na cidade de Cajati, região da encosta, situados no sul do Estado de São Paulo, e especificamente da Mata Atlântica, a qual apresenta cobertura vegetal de floresta ombrófila densa, assim como de espécie coletada na **Reserva Morro Grande**, na cidade de Caldas, região de campos montanos, no Estado de Minas Gerais.

As espécies foram identificadas pela Doutora. Inês Cordeiro e pelo Doutor Marcos Sobral (Instituto de Botânica – SP) e as exsicatas das plantas estão depositadas no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo sob os números: Moreno 34 (Ilha de Cananéia), Moreno 253 (Morro da Cataia) e Moreno 311 (Reserva Morro Grande).

4.1.2. Substâncias químicas

Todas as substâncias químicas utilizadas neste projeto são padrões primários ou secundários com pureza superior a 99% e dentro do prazo de validade.

- Diclofenaco de potássio: fornecedor: Galena, lote: DFK/16070021.
- Citronelol: fornecedor: Merck Millipore Brasil, lote:MKBC0518.
- Eugenol: fornecedor, Merck Millipore Brasil lote: MKBD3216.
- Ceramida-1-O-C18:1(1-oleoil-N-heptadecanoil-D-eritro-esfingosina) - (CAS number 1246303-19-4): fornecedor: Avanti Polar Lipids, lote: 170CER181-10.
- Ceramida C 22 (N-behenoil-D-eritro-efingosina) -(CAS number 27888-44-4): fornecedor: Avanti Polar Lipids, lote: 220CER-10.
- Ceramida C 20 – (araquidonil-D-eritro-esfingosina) - (CAS number 123482-93-9): fornecedor: Avanti Polar Lipids, lote: 200CER13
- Ácido graxo C 20 (eicosanóico) (CAS number 312. 53): fornecedor: Sigma-Aldrich, lote:030M1689V.

- Ácido graxo C 24 (lignocérico) (CAS number 557-59-5): fornecedor: Sigma-Aldrich, lote:061M5202V
- Colesterol (CAS number 57-88-5): fornecedor: Sigma-Aldrich, lote:010M5303

4.1.3. Reagentes e solventes:

- Hexano – Sigma-Aldrich
- Etanol anidro – Sigma-Aldrich
- Propilenoglicol – Galena
- Amarelo Lúcifer – Sigma-Aldrich
- Azul Cresil Brilhante – Sigma- Aldrich
- Hidrogenofosfato de potássio monobásico - Sigma-Aldrich
- Hidróxido de anidro - Sigma-Aldrich
- Polímero carboxivinílico (Carbopol® Ultrez10) – Fabricante: Lubrizol
- Álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl®AWS) – Fornecedor: Croda
- Cocoato de glicerila PEG-7 (Cetiol® HE) – Fornecedor: Innovadex
- Pele de muda de cobra da espécie *Bothrops jararaca* – Instituto Butantan
- Água destilada

4.1.4. Equipamentos e materiais

- pHmetro
- Balança analítica
- Balança semi-analítica
- Aparelhagem de Clevenger para hidro-destilação acoplado a banho termostático

- Rotavapor
- Micropipeta automática 8 canais capacidade 10-100 μL – Eppendorf
- Micropipeta automática 8 canais capacidade 30-300 μL – Eppendorf
- Ponteiras descartáveis com volumes variados – Eppendorf
- Microplaca 96 poços doadora modelo MAIPN4550 Placa Multiscreen IP contendo membrana hidrofóbica em PVDF (Fluoreto de polivinilideno) 0.45 μm , transparente, não estéril - Millipore
- Microplaca 96 poços aceptora modelo MATRNPS50, em estireno, não estéril – Millipore
- Microplaca 96 poços para leitura de UV, modelo UV-Star – Greiner Bio-One Brasil Ref. 675801
- Agitador orbital de placas – Marca Bio Shake iQ LifeScience Unlimited
- Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (CG-DIC) em um cromatógrafo Varian® (modelo CP 3380), com coluna DB-5 (30 m x 25 μm x 0,25 μm).
- Espectrofotômetro (ATR)-FTIR BOMEN MB Series Arid-Zone™
- FT-Raman BRUKER RFS 100/S, software OPUS
- Raman Confocal River Diagnostics BV Rotterdam, the Netherlands – modelo 3510 :10 DERM – software versão 2.52
- Espectrofotômetro UV/fluorescência Spectra-Max M4 Molecular – Software SoftMax Pro 6.1

4.1.5 Infraestrutura

O presente trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Controle Biológico de Medicamentos e Cosméticos do Departamento de

Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), exceto as seguintes etapas:

- Obtenção dos óleos essenciais da *P.pseudocaryophyllus* - Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química Fundamental – Instituto de Química – USP.
- Análise da composição química dos óleos essenciais - Instituto de Botânica /SP.
- Avaliação das membranas lipídicas por Raman confocal – Laboratório de Espectroscopia Vibracional – Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos/SP.
- Análise das membranas biológicas naturais por ATR-FTIR e FT-Raman – Departamento de Química Fundamental – Instituto de Química USP
- Leituras das microplacas de PAMPA UV/Fluorescência – Laboratório de Química Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos do Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da USP e Laboratório de Permeabilidade e Biodisponibilidade - Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP)

4.2. Métodos

O fluxograma dos experimentos realizados é apresentado na Figura 7:

Figura 7 – Fluxograma dos experimentos

4.2.1. Obtenção e caracterização do óleo essencial da *P. pseudocaryophyllus*

a) Extração dos óleos essenciais das partes aéreas das plantas por hidro-destilação

A *P. pseudocaryophyllus* colhida foi seca à temperatura ambiente por 2 semanas e foram separadas as folhas dos caules. O estudo anatômico das folhas foi realizado em corte à mão livre, transversal e longitudinal e os cortes dos caules jovens foram realizados à mão livre e com auxílio de micrótomo de mesa.

Na preparação dos cortes, as folhas foram imersas em água morna por cerca de 30 minutos. Em seguida foram feitas seções de pedaços de mais ou menos 1,0 cm de largura por 0,5 cm de comprimento no terço médio inferior. Os caules foram

imersos em água por 24 horas antes do início das preparações (OLIVEIRA; AKISSUE, 1989).

Para a preparação das lâminas, os cortes foram submetidos a processo de coloração com azul de Astra para coloração de paredes celulares celulósicas e lignificadas e foram também realizados testes histoquímicos com dupla coloração utilizando azul de Asta e um dos seguintes reagentes: safranina para a identificação de lignina, Sudam III para a identificação de materiais lipófilos e cloreto férrico para a identificação de compostos fenólicos.

Após a caracterização farmacognóstica, procedeu-se a extração dos óleos essenciais da *P. pseudocaryophyllus* por hidro-destilação utilizando um aparelho de Clevenger modificado. As partes aéreas da planta foram previamente picadas manualmente e uma quantidade de cerca de 250,0 g foi pesada em balança semianalítica e colocada em balão de fundo redondo, com capacidade para 6 litros. Foram adicionados cerca de 3,0 L de água purificada no balão, o qual foi conectado a um sistema de destilação com aparelhagem de Clevenger ligado a um banho termostático. A extração foi mantida por 4 horas e o fim do processo, o sistema foi lavado com dietil éter para extração do óleo retido nas paredes. Foi adicionado sulfato de sódio anidro, em quantidade suficiente, para adsorver a água eventualmente contida no óleo coletado. O óleo essencial obtido foi transferido cuidadosamente para um sistema de rotavapor e mantido sob vácuo, por cerca de 20 minutos, para a retirada do solvente. O óleo essencial obtido foi armazenado em frasco âmbar, com tampa esmerilhada em freezer (-25 °C) até o momento da utilização.

O cálculo do rendimento foi realizado conforme Equação 7:

$$Rendimento (\%) = \frac{Massa \text{ óleo (g)}}{Massa \text{ folhas (g)}} \times 100 \quad (7)$$

b) Caracterização por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG/EM)

A análise da composição química das amostras dos óleos foi realizada com a diluição do óleo em acetona, na razão de 1:100 (v/v). Uma alíquota de 1,0 µL da amostra diluída foi injetada no cromatógrafo a gás que foi quantificada e os componentes foram identificados por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em um cromatógrafo Agilent® (série 6890) acoplado a um espectrômetro

de massas com sistema quadrupolo (Agilent® 5973 *Network Mass Selective Detector*) em uma coluna HP-5MS (30 m x 25 µm x 0,25 µm), de acordo com metodologia descrita na literatura (ADAMS, 2007). O injetor (com divisão de fluxo - *split/splitless*) foi programado para 250 °C (razão de divisão 1:20) com temperatura inicial de 40 °C e final de 240 °C com aumento de 3 °C/min. O tempo total de análise foi de 80 minutos. O gás de arraste utilizado foi hélio, com uma pressão de 80 Kpa e velocidade linear de 1 mL por minuto. Nitrogênio, ar sintético e hidrogênio foram utilizados como gases auxiliares, na razão de 1:1:10, respectivamente. A identificação dos componentes do óleo foi baseada na comparação entre o índice de retenção e o espectro de massas com amostras autênticas e dados retirados da literatura (ADAMS, 2007).

A comparação entre os tempos de retenção dos diferentes compostos foram obtidos utilizando o índice de retenção de Kovats (KI) (SANDRA & BICCHI, 1987), utilizado em separações isotérmicas e obtido pela Equação 8.

$$KI = 100n + 100 \left(\frac{(\log t'_{R(i)} - \log t'_{R(n)})}{(\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)})} \right) \quad (8)$$

Onde:

KI = índice de Kovats.

n= número de carbonos do padrão adjacente menos retido

n+1= número de carbonos do padrão adjacente mais retido

i= analito

t'_R = tempo de retenção ajustado (tempo retenção do pico menos o tempo de eluição do pico de um composto não retido pela coluna)

4.2.2 Avaliação a interação do óleo essencial e dos componentes majoritários com membrana natural por métodos biofísicos

a) Ensaios biofísicos com membrana biológica natural

- Soluções dos óleos essenciais da *P. pseudocaryophyllus* e dos compostos majoritários: Preparou-se soluções a 0,25%, 0,5%, 1,0% e 2,0% (p/p) dos óleos essenciais obtidos, citronelol e eugenol em propilenoglicol. Para o eugenol e o

citronelol, preparou-se também soluções a 2,0% (p/p) com os solventes propilenoglicol/água (80:20) e etanol/água (40:60), respectivamente.

- Preparação da membrana para ensaios por espectroscopia FT-Raman e espectroscopia ATR (FTIR)

As porções ventrais de pele de muda da cobra *Bothrops jararaca* foram utilizadas como modelo de membrana biológica natural. As membranas preparadas foram recortadas com tesoura e lavadas em água corrente; permaneceram imersas em água destilada em placas de Petri por 1 hora, para re-hidratação. Após este período, as membranas biológicas foram secas entre folhas de papel filtro quantitativo, mantendo-se à temperatura ambiente por 30 minutos. As mudas de pele secas foram submetidas ao processo de tape-stripping uma única vez, com fita adesiva Transpore® 3M. Aplicou-se essa na superfície exterior da membrana, com leve compressão, e retirando-a em seguida para promover a remoção mecânica de camadas superficiais de células (BABY et al., 2006a).

Porções de aproximadamente 2,0 cm² de membrana, foram preparadas para ensaios por espectroscopia FT-Raman e espectroscopia ATR (FTIR). Essas foram imersas nas mistura e permaneceram por 8 h. Após este período, as amostras foram removidas, secas entre folhas de papel filtro com leve compressão e mantidas entre lâminas para microscopia em dessecador na temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C, até o momento da utilização.

- Avaliação da interação dos óleos essenciais com membrana natural por FT-Raman

As amostras tratadas foram acondicionadas no compartimento do instrumento destinado à análise. Os dados foram salvos entre 3500 a 200 cm⁻¹. Foram obtidas 256 co-adições correspondentes aos espectros das amostras. As condições do experimento foram as seguintes:

- Potência de saída do laser: 250 mW
- Resolução espectral: 4 cm⁻¹
- Ganho: 4
- Comprimento de onda de excitação: 1064 nm
- Abertura: 7 mm

- Avaliação da interação dos óleos essenciais com membrana natural por (ATR) -FTIR:

Os espectros (ATR)-FTIR foram realizados na faixa espectral de 4000 a 1000 cm^{-1} , com 20 varreduras com resolução de 8 cm^{-1} . As amostras foram colocadas sobre um suporte apropriado para ATR.

4.2.3 Desenvolver sistema PAMPA com a membrana biológica artificial selecionada

a) Preparação das soluções e misturas lipídicas

- Solução tampão fosfato pH 7,4: A preparação da solução foi segundo a Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2010) e as soluções de misturas lipídicas utilizadas neste trabalho foram preparadas conforme descrito a seguir.

- Mistura lipídica: As composições das misturas lipídicas utilizadas na preparação das membranas biológicas artificiais estão descritas no Quadro 1.

Componente da mistura lipídica	Relação molar					
	Mistura A	Mistura B	Mistura C	Mistura D	Mistura E	Mistura F
Colesterol	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Ceramida-1-O-C18:1	0,33	0,25	0,50	0,25	0,33	0,33
Ceramida C22	0,33	0,50	0,25	0,25	0,33	0,33
Ceramida C20	0,33	0,25	0,25	0,50	0,33	0,33
Ácido graxo C20	0,50	0,50	0,50	0,50	0,75	0,25
Ácido graxo C24	0,50	0,50	0,50	0,50	0,25	0,75

Quadro 1. Proporção molar das misturas lipídicas para preparação das membranas biológicas artificiais

As misturas lipídicas foram preparadas na concentração final de 0,15 mg de lipídeos/mL com os solventes hexano/etanol na proporção de 2:1. Esta concentração é recomendação geral para o sistema PAMPA. Para a obtenção dessas misturas, em proporções equimolares, foram preparadas soluções estoque de cada lipídeo, em quantidade apropriada (Quadro 1) que foram mantidas a -20 °C até o momento de utilização.

As massas moleculares consideradas para os cálculos estão descritas no Quadro 2.

Lipídeo	Massa molecular (g/mol)*	Solução estoque (mg/mL)
Colesterol	386,65	1,0
Ceramida-1-O-C18:1	816,37	0,5
Ceramida C22	662,06	0,5
Ceramida C20	594,01	0,5
Ácido graxo C20	312,53	1,0
Ácido graxo C24	368,64	1,0

Quadro 2- Concentração das soluções estoques de lipídeos e respectivas massas moleculares

Para cada mistura lipídica, preparou-se 2,0 mL, para ser utilizado nos estudo do PAMPA, conforme Quadro 3 apresentado a seguir.

Volumes da solução estoque dos lipídios individuais (µL) para 2,0 mL de mistura final	Misturas lipídicas					
	A	B	C	D	E	F
Colesterol	82,20	82,22	80,03	83,22	83,02	81,39
Ceramida-1-O-C18:1	114,55	86,80	168,97	87,85	115,70	113,42
Ceramida C22	92,90	140,78	68,52	71,25	93,83	91,98
Ceramida C20	83,35	63,15	61,47	127,85	84,18	82,53
Ácido graxo C20	33,22	33,23	33,34	33,63	50,33	16,45
Ácido graxo C24	39,18	39,19	38,15	39,67	19,79	58,20
Volume total de soluções (µL)	445,39	445,36	449,48	443,48	446,85	443,96
Volume adicionado de mistura solvente (µL)	1554,61	1554,64	1550,52	1556,52	1553,15	1556,04

Quadro 3: Composição das misturas lipídicas a partir de soluções estoque dos lipídeos individuais

b) Avaliação das misturas lipídica por espectroscopia Raman confocal

Cada uma das misturas lipídicas e os lipídeos individuais foram depositados, no volume de 10 μL , sobre discos de PVDF, que apresentavam a espessura de 125 μm e o tamanho de poro de 0,45 μm , de placas doadoras de 96 poços, com o auxílio de pipeta automática, de forma a posicionar a ponteira no centro do filtro sem tocá-lo. Após a secagem do solvente por período de cerca de 20 minutos, à temperatura ambiente, as membranas foram formadas. Ressalta-se que a partir dessa etapa as misturas lipídicas A, B, C, D, E e F, em conjunto com filtro de PVDF impregnado, foram denominadas de membranas biológicas artificiais A, B, C, D, E e F. Essas foram recortadas, retiradas das placas, com auxílio de um bisturi, e colocadas em célula apropriada do espectrofotômetro para a obtenção dos espectros Raman Confocal. Os espectros foram obtidos nas condições ambientais de 19,1 °C e 47 % de umidade relativa, utilizando laser estabilizado em 785 nm, com tempo de integração de 10 segundos e 2 acumulações e potência de 250 mW.

c) Ensaio para avaliação da integridade das membranas biológicas artificiais no sistema PAMPA

A preparação das placas para os ensaios de integridade se iniciou com adição de 300 μL de tampão pH 7,4 às placas aceptoras e com a impregnação dos filtros das placas doadoras com 10 μL das misturas lipídicas A,B,C,D,E e F para a formação das respectivas membranas biológicas artificiais. Após 20 minutos, 150 μL da solução em avaliação foram adicionados à placa doadora, as duas placas foram acopladas para formar o “sanduiche” PAMPA e deixadas em incubação por 1 h ou por 3 h em temperatura de 25 °C.

As membranas biológicas artificiais A a F foram avaliadas quanto à integridade, seguindo o protocolo proposto pela empresa Millipore (MILLIPORE, 2005). Utilizou-se solução de marcadores de permeabilidade que continha mistura dos corantes Azul Cresil Brilhante e Amarelo LúCIFer preparados conforme descrito no ítem (a) a seguir.

a) Preparação das soluções de corantes para ensaios de integridade das membranas: Pesou-se 0,1 g do corante Azul Cresil Brilhante e dissolveu-se em q.s.p. 1L de solução tampão fosfato pH 7,4 com agitação por 1 h, no mínimo, até completa dissolução. Para o corante Amarelo LúCIFer, dissolveu-se 100 mg em 100 mL do mesmo solvente.

Misturou-se as duas soluções estoque na proporção de 9:1 (Azul Cresil Brilhante: Amarelo LúCIFer) e obteve-se a solução final corante para os testes de integridade da membrana.

b) Ensaio propriamente dito: Após formação das membranas biológicas artificiais, foram adicionados 150 μ L da solução final dos corantes em cada poço da placa doadora. As placas foram acopladas para formar o “sanduiche” PAMPA e após incubação por 1 h ou 3 h, retirou-se a quantidade de 120 μ L de cada poço da placa acceptora, transferiu-se para placas de leitura e para avaliar a absorbância do azul cresil brilhante em 610 nm. As leituras de fluorescência para verificação da rejeição do corante Amarelo LúCIFer foram realizadas com excitação a 425 nm e emissão a 528 nm. Foram considerados valores aceitáveis de fluorescência aqueles menores do que três vezes a média da fluorescência de fundo. De acordo com o protocolo, espera-se absorbâncias mínimas do corante Azul Cresil Brilhante, controle positivo de permeabilidade, as quais devem ser da ordem de 0,012; resultados mais elevados indicam membrana não íntegra.

d) Análise estatística dos resultados

Os valores de absorbância/fluorescência em cada comprimento de onda foram expressos como média e desvio padrão ($n = 3$). Comparações estatísticas entre dois grupos foram realizadas utilizando o teste t-Student, após avaliar a constância das variâncias pelo teste F. Comparações múltiplas de três ou mais grupos foram efetuadas por meio da análise de variância de um fator. Quando o valor de probabilidade foi menor que 5%, o teste de diferença mínima significativa de Fisher foi empregado para avaliar diferenças entre as médias dos grupos (Granato; Calado; Harvis, 2014).

4.2.4. Avaliação da segurança óleo essencial e dos componentes majoritários no sistema PAMPA

As membranas biológicas artificiais A, B, C, D, E e F foram pré tratadas com 10 μ L das soluções de óleos essenciais estudados, de citronelol e de eugenol na concentração de 0,125%, 0,25%, 0,5% e 2,0 % (v/v) em etanol, preparados no momento do uso. Após período de secagem de 10 minutos, foram adicionados 300

μL de solução tampão fosfato pH 7,4 aos poços das placas aceptoras e 150 μL às placas doadoras e ambas foram acopladas para formação do sistema PAMPA. A incubação ocorreu por 3 h e após este período, foram coletados 120 μL de cada poço da placa aceptora e transferidos para uma placa de leitura de UV. As leituras de absorbância foram a 280 nm para detecção da presença do eugenol, o qual foi considerado o composto marcador, por estar presente em todos os óleos essenciais avaliados neste projeto.

O critério de segurança de promotor de permeação foi a absorbância mínima do eugenol na solução aceptora, pois era indicativa da não passagem através da membrana biológica artificial.

A análise estatística dos resultados obtidos nessa etapa foi de acordo com o item 4.2.3 c).

4.2.5. Avaliação do efeito do óleo essencial e dos componentes majoritários em diferentes concentrações na promoção da permeação do diclofenaco de potássio no sistema PAMPA

Os ensaios foram realizados com diclofenaco de potássio em soluções saturadas de 1,5% (p/v) em tampão fosfato preparadas no momento de uso. Foram utilizadas as membranas A,B,C,D,E e F no sistema PAMPA, as quais foram preparadas conforme o item 4.2.2 c). Para as avaliações dos óleos essenciais ou dos componentes majoritários candidatos a promotor de permeação, as concentrações de 0,125%, 0,25%, 0,50% e 2,00% (v/v) em etanol foram usadas. Essas foram preparadas previamente e armazenadas na temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

a) Avaliação do efeito de promotor de permeação

Aplicou-se 10 μL /poço das soluções dos óleos essenciais e dos compostos majoritários nas membranas. Após período de 10 minutos, para a evaporação do solvente, foram adicionados 150 μL de solução saturada de diclofenaco de potássio (1,5%, p/v) a cada poço do compartimento doador. No compartimento receptor foram previamente adicionados 300 μL de solução tampão fosfato pH 7,4 e as placas

doadora e receptora foram acopladas para formação do sistema PAMPA. A permeação ocorreu nas condições de 1h sem agitação ou 3 h com e sem agitação orbital das placas. Foram realizados também ensaios com a hidratação das membranas biológicas artificiais por 12 h em tampão fosfato pH 7,4 e à temperatura ambiente, antes da adição das soluções dos óleos essenciais às membranas. A umidade do sistema foi mantida pela colocação de papel filtro, levemente umedecido, sob a tampa recobrimdo a placa doadora e o sistema foi embalado em filme plástico.

Ao final do período de incubação, cerca de 120 μ L das soluções dos compartimentos doador e receptor presentes em cada poço foram transferidos para diferentes placas de 96 poços apropriadas para leitura em UV. As placas foram mantidas a -20 °C e mantidas à temperatura ambiente 24 h antes da leitura para quantificação do diclofenaco de potássio em 275 nm ou 280 nm para detecção do eugenol.

b) Validação do método de doseamento do diclofenaco

A validação do método de doseamento do fármaco por espectrofotometria no ultravioleta foi baseada na RESOLUÇÃO-RE Nº 899, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA em maio 2003, que traz o "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". O guia se aplica a técnicas analíticas que façam uso de métodos de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); métodos não cromatográficos, desde que ofereçam uma seletividade aceitável, com é o caso da titulometria e da espectrofotometria ultravioleta e visível (UV/VIS), além de teste bioanalíticos. Segundo o documento, métodos destinados a testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (categoria I) devem ser validados considerando os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade), exatidão e robustez.

A robustez do método não foi avaliada no presente trabalho.

- Análise estatística dos dados experimentais da validação

Foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Hartley, respectivamente. Para a qualidade do ajuste

matemático foi usado os seguintes parâmetros estatísticos: coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}), valor de probabilidade da regressão (p-valor), baseada na análise de variâncias, e análise de resíduos. Os resíduos foram analisados, quanto à sua independência, pelo teste de Durbin-Watson e o também pelo teste de normalidade (Souza; Junqueira, 2005). As análises foram obtidas utilizando o programa Statistica v. 7 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

4.2.6. Avaliação da eficácia do óleo essencial e dos componentes majoritários na permeação do diclofenaco de potássio em formulação

O efeito de promoção da permeação dos óleos essenciais e componentes majoritários exercidos sobre o diclofenaco de potássio, em formulação tópica de gel, foi avaliado pela técnica PAMPA utilizando as membranas biológicas artificiais.

A fórmula do gel utilizada e a técnica de preparação estão descritas no Quadro 4.

Componente	% (p/p)
Polímero carboxivinílico (Carbopol® Ultrez10)	0,5
Cocoato de glicerila PEG-7 (Cetiol® HE)	0,8
Álcool cetílico etoxilado (e) propoxilado (Procetyl® AWS)	3,0
Diclofenaco de potássio	1,0
Água destilada q.s.p.	100,0

Quadro 4 – Fórmula do emulgel com diclofenaco de potássio

O polímero carboxivinílico foi disperso em q.s. de água destilada e permaneceu em repouso por 3 h, a fim de completar a hidratação. Após esse período, o Cetiol® HE e Procetyl®AWS foram adicionados e homogeneizados no sistema. Dispersou-se cuidadosamente o diclofenaco de potássio e a formulação foi pesada, completando-se a massa com água destilada e corrigindo-se o valor do pH para 6,0-6,5 com auxílio do hidróxido de sódio a 20% (p/p) em água.

Após a preparação, as amostras de emulgel foram mantidas em geladeira (2 °C a 8 °C) até o momento do uso. Os óleos essenciais e os componentes majoritários foram incorporados à formulação no momento do uso.

Os ensaios foram realizados em 6 réplicas. Os filtros de PVDF das placas doadoras de 96 poços foram impregnados com as misturas lipídicas conforme descrito no item 4.2.3. Após a secagem do solvente, foram adicionados 50 μL do emulgel /poço. Ao compartimento receptor foram adicionados 300 μL de solução tampão fosfato pH 7,4 e as placas doadora e receptora foram acopladas para formação do sanduiche e incubadas por períodos de 1h sem agitação das placas. Ao final do período de incubação, as soluções aceptoras foram diluídas em tampão fosfato pH 7,4, em placas de 96 poços de poço fundo, para a concentração da faixa de linearidade do método e cerca de 120 μL foram transferidos para placas de 96 poços transparentes para leitura em UV para leitura das absorbâncias a 275 nm.

A análise dos resultados foi de acordo com o item 4.2.3. d

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pele humana atua como uma barreira eficiente 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. A camada mais externa da pele, a epiderme, e em particular o estrato córneo, 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).

A abordagem mais utilizada para vencer tal limitação é a utilização de promotores químicos de permeação, que são substâncias que aumentam o fluxo de moléculas através da pele, sem provocar danos às células viáveis, e facilita a veiculação de fármacos. Os terpenos têm sido avaliados quanto à atividade de promoção da permeação da pele em diversos trabalhos na literatura. São compostos considerados seguros para esta aplicação, sendo que alguns já foram classificados pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) como *Generally recognized as safe* (GRAS) (UNITED STATES). Diversas espécies vegetais nativas da Mata Atlântica, dentre elas a *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, produzem óleos essenciais ricos em terpenos. Em populações naturais, essa espécie é encontrada como três quimiotipos. Não existem na literatura dados referentes à composição química dos óleos essenciais destes três diferentes quimiotipos da espécie e nem referentes à eficácia e a segurança do seu uso como promotores de permeação cutânea. O componente majoritário comum aos três quimiotipos é o eugenol sendo que o citrônol é um dos componentes majoritários de um dos quimiotipos.

O presente trabalho avaliou a eficácia do óleo dessa espécie e dos seus componentes majoritários eugenol e citrônol na permeação *in vitro* do diclofenaco de potássio, utilizando membrana natural e biológica artificial. O óleo essencial

utilizado foi extraído de plantas provenientes de populações naturais de *P. pseudocaryophyllus* no Estado de São Paulo e de Minas Gerais.

5.1. Obtenção e caracterização do óleo essencial da *P. pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum

Os óleos essenciais utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram obtidos das folhas da planta *P. pseudocaryophyllus*, procedentes de populações naturais existentes em três localidades, representando ecossistemas distintos, sendo elas os municípios de Cananéia e Cajati, na região sul do Estado de São Paulo e a Reserva Natural Morro Grande, no município de Caldas, Estado de Minas Gerais. A cidade de Cananéia está situada em um ambiente de restinga (planície ao nível do mar) em região de Mata Atlântica e a cidade de Cajati situa-se em uma área de encosta de serra (cerca de 600 m de altitude) e também em região de Mata Atlântica. A Reserva Natural Morro Grande se localiza em uma região de campos montanos, em floresta estacional à cerca de 1.500 m de altitude.

Antes do início dos trabalhos de extração e análise da composição química dos óleos essenciais, foram realizadas as análises macroscópica e microscópica das folhas das plantas procedentes de Cananéia e de Cajati. As análises foram realizadas no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), sob a coordenação da Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato.

A descrição macroscópica da planta coletada na região de encosta (Cajati) apresentou folhas inteiras, pecioladas, contorno lanceolado, de base atenuada, ápice foliar agudo e margem crenada, padrão de nervação do tipo camptódromo-broquidódromo, com nervura marginal em arcos; coreáceas. O tamanho foi variável entre 4,0 e 8,0 cm de comprimento. As folhas, quando atritadas entre os dedos, desprenderam odor agradável, forte, aromático, típico da espécie. As folhas secas assumem forma enrolada e tornam-se friáveis. A planta coletada na região de restinga (Cananéia) apresentou folhas inteiras, pecioladas, contorno elíptico, de base atenuada, ápice foliar emarginado e margem inteira, padrão de nervação do tipo camptódromo-broquidódromo, com nervura marginal em arcos; coreáceas. O tamanho foi variável entre 4,5 e 10,0 cm de comprimento.

Na observação da lâmina foliar das folhas das plantas procedentes de ambas as localidades geográficas contra fonte luminosa, foram observadas inúmeras cavidades secretoras identificadas como áreas translúcidas (Figura 8).

Figura 8: Cavidades secretoras - folha íntegra, não corada – planta procedente do Morro da Cataia

Na vista frontal de cortes paradérmicos corados com Azul de Asta, foram observadas células epidérmicas de tamanhos e formatos irregulares, aproximadamente retangulares, com paredes espessas. As folhas de ambas as localidades apresentaram o mesmo aspecto (Figuras 9A e 9B).

A

B

Figura 9: Vista frontal da epiderme em corte paradérmico: Morro da Cataia (A) e Cananéia(B)

A face abaxial da folha da planta proveniente de Cajati apresentou células epidérmicas com paredes espessas e de tamanhos diferentes, com inúmeros complexos estomáticos que aparentam ser do tipo anomacíticos. Foi possível observar também a presença de inúmeras cavidades secretoras e drusas presentes em grande quantidade (Figura10). Podem ser observados inúmeros tricomas tectores

unicelulares (Figura 11). A planta proveniente de Cananéia não apresentou tricomas tectores unicelulares, sendo sua folha glabra (Figura 13).

Figura 10: Corte paradérmico abaxial: complexos estomáticos, cavidade secretora e drusas (Cajati)

Figura 11: Corte paradérmico abaxial: tricomas tectores unicelulares (Cajati)

As cavidades secretoras são recobertas por um par de células de formato reniforme circundadas por células epidérmicas, que estão dispostas ao redor do par de células em arranjo radial. Esta configuração foi observada nas folhas das plantas das duas procedências (Figura 12).

Figura 12: Corte paradérmico abaxial: cavidade secretora mostrando par de células reniformes e células em arranjo radial (Cajati)

Figura 13: Corte paradérmico abaxial: drusas e estômatos; ausência de tricomas tectores unicelulares (Cananéia)

A coloração do corte com Sudam III permitiu a visualização de gotículas de óleo essencial coradas em vermelho (Figura 14A e 14B).

Figura 14: corte paradérmico abaxial: cavidades secretoras, drusas e complexos estomáticos (A) e coloração de material lipídico com Sudam III (B) (Cananéia)

A planta procedente da região de campos montanos (Reserva Natural Morro Grande) não foi submetida à análise macroscópica, porém observou-se que, quando atritadas entre os dedos, desprendem odor agradável, forte, aromático, típico da espécie.

Os resultados indicaram aspectos morfológicos diferentes para as plantas das plantas procedentes de Cajati e Cananéia, especialmente no que se refere ao tamanho médio das folhas, contorno e ápice foliar. Na avaliação microscópica, também foram observadas diferenças entre as plantas das duas procedências, sendo que a principal diferença foi quanto à presença de tricomas tectores unicelulares. Na planta procedente de Cananéia (região de restinga) os tricomas estão ausentes, estando presentes em grande número na planta procedente de Cajati (região de encosta). Outra diferença observada foi quanto ao aspecto do parênquima lacunoso, mais frouxamente organizado nas folhas da planta procedente de Cananéia, que também apresentou maior quantidade de cavidades secretoras. Segundo Landrum e Kawasaki (1997), existem três variedades de *P. pseudocaryophyllus*. As diferenças macro e microscópicas observadas no presente estudo são indicativas de que as plantas utilizadas são de variedades diferentes. Embora as amostras de *P. pseudocaryophyllus* sejam provenientes de regiões geográficas relativamente próximas e de região de floresta ombrófila densa (Mata Atlântica), as regiões diferem quanto às características de solo e altitude. A região de Cananéia é uma região de restinga e, portanto, de planície, cujo solo sofre a influência da salinidade do oceano e cuja altitude é ao nível do mar. A região de Cajati é uma região de encosta, com altitude aproximada de 600 metros e solo que não sofre a influência da salinidade do oceano.

5.1.1. Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos por processo de hidrodestilação, a partir das folhas da planta procedentes das localidades de Cajati, Cananéia e Reserva Natural Morro Grande.

As quantidades de óleo obtidas e o rendimento do processo de extração estão na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados da extração do óleo essencial da *P. pseudocaryophyllus*

	Rendimento médio (%) (massa óleo/massa folhas)*	Número de extrações
Cajati	1,15	18
Cananéia	2,70	8
Reserva Natural Morro Grande	0,90	8

*Referente à média dos rendimentos do total das extrações de cada lote de planta

O rendimento médio do processo de hidrodestilação obtido para o material botânico coletado na região de Cananéia foi o mais elevado entre as plantas das três procedências e ficou acima da média descrita na literatura para a espécie, que é de 1,0 a 2,0%, o que já é considerado como um alto teor de óleo essencial (SAKITA et al., 1994; LIMA et al., 2006; PAULA et al., 2006).

Após a extração, os óleos essenciais foram acondicionados em recipientes de vidro âmbar e mantidos a - 20 °C até o momento da utilização.

5.1.2. Composição química dos óleos essenciais

Os resultados obtidas na análise da composição química dos óleos essenciais mostraram que os mesmos, das plantas das três procedências, são diferentes em relação ao número e aos tipos de terpenos e terpenóides (Tabela 2). Considerando como componentes majoritários aqueles cinco compostos presentes em maior quantidade nos óleos essenciais, o eugenol, um fenilpropanóide, foi um dos componentes majoritários nos três óleos obtidos. Foi o componente majoritário para os óleos essenciais extraídos das plantas procedentes de Cananéia e da Reserva Natural Morro Grande, correspondendo respectivamente a 31,5% e 19,6% da composição, e o segundo mais abundante na amostra do óleo essencial da planta procedente de Cajati, correspondendo a 17,9% da composição. O citrionelol é um terpeno acíclico que possui um grupo funcional álcool e está presente no óleo das plantas coletadas na Reserva Natural Morro Grande na proporção de 9,7%; outro terpeno acíclico identificado entre os componentes majoritários foi o mirceno, que é um hidrocarboneto. Os demais terpenos majoritários identificados foram o paracimeno (hidrocarboneto aromático cíclico), α -pineno e β -pineno (monoterpenos bicíclicos), 1,8-cineol (éter cíclico), espatulenol (sesquiterpeno cíclico com função

álcool), o terpinoleno (hidrocarboneto cíclico não aromático) e o α -terpineno (hidrocarboneto cíclico). O óleo essencial das plantas procedentes da Reserva Natural Morro Grande é o que possui o maior número de componentes, com 22 tipos de terpenos, indicando uma composição química mais diversificada comparativamente aos óleos das outras duas procedências.

Tabela 2: Composição química do óleo essencial da *P. pseudocaryophyllus* procedente de do município de Cajati (A) ; município de Cananéia (B); e da Reserva Natural de Morro Grande, Município de Caldas (C)

A		B		C	
Terpeno	%	Terpeno	%	Terpeno	%
para-cimeno	18,9	eugenol	31,5	eugenol	19,6
eugenol	17,9	Z-isoeugenol	14,8	1,8-cineol	14,0
terpinoleno	14,0	metil-eugenol	12,2	citronelol	9,7
α -terpineno	13,8	1,8-cineol	9,3	β -pineno	9,5
mircene	9,0	para-cimeno	5,8	espatulenol	9,4
E- β -ocimeno	6,7	terpinoleno	5,6	metil-eugenol	9,2
α -felandreno	4,2	α -pineno	4,0	α -pineno	4,8
α -tujeno	4,0	α -felandreno	3,6	citronelal	3,8
α -pineno	3,3	sabineno	2,9	geranial	2,7
1,8-cineol	2,4	γ -terpineno	2,4	cis-carveol	2,3
trans- β -terpineol	2,4	δ -3-careno	1,9	epóxido de humuleno II	2,2
δ -3-careno	1,7	α -tujeno	1,8	β -cariofileno	2,2
β -pineno	1,1	trans- β -terpineol	1,1	α -muurolol	2,1
α -terpineol	0,8	α -(E,E)-farneseno	1,0	cis- β -guaieno	1,7
		α -terpinoleno	0,8	muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	1,6
		β -pineno	0,7	neo-isopulegol	1,0
		(E)- β -ocimeno	0,7	α -humuleno	0,9
				α -terpineol	0,8
				γ -muuroleno	0,8
				β -elemeno	0,7
				(E)- β -ocimeno	0,7
				óxido de cariofileno	0,6
Total	100,0	Total	100,0	Total	100

Essa diferença na composição química indica tratar-se de quimiotipos diferentes, o que pode ser corroborado pelas diferenças morfológicas observadas nas avaliações macroscópica e microscópica das folhas das plantas procedentes de Cajati e Cananéia.

5.2. Avaliação da interação dos óleos essenciais e dos componentes majoritários com membrana natural modelo para estrato córneo humano (pele de muda de cobra), por métodos biofísicos

Diversos métodos biofísicos têm sido utilizados no estudo da morfologia do estrato córneo e na interação desse tecido com promotores de permeação, auxiliando na pesquisa dos mecanismos de ação. O conhecimento do mecanismo de ação de promotores de permeação é relevante, pois auxilia na seleção racional desses compostos (SINHA; KAUR, 2000). Entre os diferentes métodos biofísicos disponíveis ao estudo da interação entre promotores e estrato córneo, destacam-se os métodos espectroscópicos. O uso da espectroscopia vibracional é favorecido pela natureza ordenada da estrutura molecular do estrato córneo. Os métodos mais utilizados são a espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) e a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR) e, mais recentemente, a espectroscopia Raman confocal (VÁVROWA et al., 2005; LEOPOLD; LIPPOLD, 1994; GOLDEN et al., 1986; WILLIAMS et al., 1993; RINTOUL et al., 1998; BABY et al., 2006 a; BABBY et al., 2006 b; BABY et al. 2007; BABY et al., 2008; PERCOT; LAFLEUR, 2001). A rapidez e o uso de pequenas quantidades de amostra são vantagens adicionais associadas aos métodos biofísicos.

Os terpenos e os fenilpropanóides são os principais constituintes dos óleos essenciais. A intensidade da interação destes compostos com o estrato córneo e, como consequência, a ação como promotores de permeação, depende da estrutura das moléculas. Em geral, os terpenos com estruturas apolares são menos eficazes como promotores de permeação de fármacos hidrofílicos, quando comparados aos terpenos com moléculas mais polares, que possuem átomo de oxigênio, ou aos fenilpropanóides (WILLIAMS; BARRY, 2004). Um dos mecanismos propostos para a ação dos terpenos como promotores de permeação envolve a desorganização dos lipídeos das bicamadas intercelulares (GODWIN; MICHNIAK, 1999). O mecanismo de ação desta classe de promotores ainda não está, porém, completamente esclarecido (CAL; SZNITOWAKA, 2003; JAIN et al., 2008; SONGKRO et al., 2009; GODWIN; MICHNIAK, 1999).

5.2.1. Espectroscopia FT-Raman

A espectroscopia FT-Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional de particular interesse no estudo de materiais biológicos, principalmente devido ao fato de que a presença de água nas amostras influenciar pouco nos espectros. O perfil dos espectros FT-Raman de amostras de estrato córneo humano e de pele de muda cobra descritos na literatura são similares e apresentam regiões espectrais de vibrações características do tecido, com bandas de sinal forte em $3100\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$, referentes aos estiramentos C-H originados das cadeias carbônicas de lipídeos (CH_3 assimétrico, CH_2 assimétrico, CH_3 simétrico, CH_2 simétrico, CH). Podem-se observar também sinais na região de $1650\text{-}1672\text{ cm}^{-1}$ relativas ao estiramento C=O de Amida I de α -queratina e possivelmente de β -queratina, além de sinal na região de $1450\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$, possivelmente originário da deformação angular C-H para CH, CH_2 e CH_3 (WILLIAMS; BARRY, 1994). Uma vez que na técnica espectroscópica FT-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 (BABY et al. , 2006 a; BABY et al. 2007; BABY et al., 2008).

Os ensaios foram realizados com amostras de pele de muda de cobra como modelo de membrana natural. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2 –a.

A interação do óleo essencial com as estruturas do estrato córneo pode levar a modificações na organização original do tecido, causando modificações na topografia da superfície da membrana, que alteram a intensidade dos sinais FT-Raman observadas nos espectros, indicando a presença dos mesmos na membrana.

Foram obtidos os espectros FT-Raman para as amostras da membrana natural tratadas com soluções dos óleos essenciais em propilenoglicol em % (p/p), nas concentrações de 0,25%, 0,50%, 1,0% e 2,0%, por período de 8 h de contato. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2. Foram utilizadas amostras de óleos essenciais da *P. pseudocaryophyllus*, das procedências de Cajati, Cananéia e Reserva Natural Morro Grande, denominado óleo de “Morro Grande” a partir desta etapa.

No espectro FT-Raman obtido para a amostra do estrato córneo tratado com água destilada (Figura 15-A), as vibrações características do tecido foram observadas, com sinais de forte intensidade na região de $3100 - 2700 \text{ cm}^{-1}$, atribuídos aos estiramentos C-H originados das cadeias carbônicas de lipídeos (CH_3 assimétrico e simétrico, CH_2 assimétrico e simétrico e CH). Existem também sinais em $1650\text{-}1672 \text{ cm}^{-1}$, atribuídos ao estiramento C=O originado da amida I presente na α -queratina e possivelmente de β -queratina. Nos espectros obtidos para amostra tratada com propilenoglicol (Figura 15-B) podem ser observados os mesmos sinais característicos, mas com uma intensidade maior, indicando uma modificação na conformação da superfície da membrana

Figura 15 - Espectros FT-Raman de membrana natural tratada com: (A) água e (B) propilenoglicol

O espectro obtido para o tratamento da membrana com propilenoglicol (Figura 15-B) foi considerado como controle para as comparações com os demais tratamentos avaliados.

No espectro FT-Raman obtido para o estrato córneo tratado com o óleo essencial da planta procedente de Cajati não se observou aumento significativo da intensidade de sinais para as concentrações de 0,25% (p/p) e 0,50% (p/p), comparativamente ao controle (Figuras 16-A e 16-B); os espectros obtidos para as concentrações de 1,0% (p/p) e 2,0% (p/p) indicaram a ocorrência de interação com a porção lipídica do estrato córneo, evidenciada pelo aumento da intensidade dos sinais

na região de 3100-2700 cm^{-1} (Figuras 16-C e 16-D). Estes resultados indicam que a interação é mais intensa para concentrações mais elevadas deste óleo essencial na mistura.

Figura 16 - Espectros FT-Raman de membrana natural tratada com óleo essencial procedente de Cajati em propilenoglicol (p/p): (A) 0,25% , (B) 0,5% , (C) 1,0% e (D) 2,0%

Os espectros FT-Raman obtidos para a amostra de estrato córneo tratado com óleo essencial da planta procedente de Cananéia (figuras 17 A-D) foram observados aumentos dos sinais na região atribuída aos estiramentos C-H de lipídeos para as concentrações de 0,25% (p/p) e 0,50% (p/p); para as concentrações de 1,0% (p/p) e 2,0% (p/p), foram observadas alterações com a diminuição da intensidade dos sinais, que foi mais intensa para a maior concentração. Tal alteração pode estar associada à uma extração dos lipídeos da membrana, promovida pelo óleo essencial nestas concentrações (BRITO et al., 2009; SAPRA; JAIN; TIWARY, 2008).

A **B** **C** **D**

Figura 17- Espectros dos FT-Raman de membrana natural tratada com óleo essencial de *P.pseudocaryophyllus* procedente da Cananéia, em propilenoglicol (p/p): (A) 0,25% , (B) 0,5% , (C) 1,0% e (D) 2,0%

No tratamento de amostras de estrato córneo com óleo essencial da planta procedente de Morro Grande, os espectros FT-Raman obtidos indicaram a interação de todas as concentrações do óleo avaliadas com a membrana, conforme evidenciado pelo aumento das intensidades dos sinais em $3100 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ (Figuras 18 A – C). A maior interação foi observada para a concentração de 2,0% (p/p) do óleo (Figura 18-D).

Figura 18- Espectros dos FT-Raman de membrana natural tratada com óleo essencial de *P.pseudocaryophyllus* procedente de Morro Grande, em propilenoglicol (p/p): (A) 0,25% , (B) 0,5% , (C) 1,0% e (D) 2,0%

Frente aos dados obtidos nas análises dos espectros FT-Raman, foi observado que os óleos essenciais da *P. pseudocaryophyllus* procedentes das três localidades apresentaram alguma interação com o estrato córneo, podendo ser considerados candidatos a promotores de permeação.

As interações foram observadas apenas na região espectral atribuída ao estiramento C-H de cadeias carbônicas de lipídeos, em $3100 - 2700 \text{ cm}^{-1}$, e ocorreu de forma similar para todas as amostras, com pequenas variações.

As principais alterações nos espectros FT-Raman foram observadas para a concentração de 2,0% (p/p). Comparando-se o comportamento dos diferentes óleos essenciais para esta concentração, o óleo de Morro Grande foi o que apresentou um grau de interação mais acentuado. A análise da composição química do óleo essencial

da planta procedente de Morro Grande indicou uma composição mais diversificada em terpenos do que os óleos procedentes das duas outras origens (tabela 4), podendo ser a razão da interação mais acentuada com o estrato córneo, na concentração de 2,0% (p/p). Outro ponto relevante relativo à composição desse óleo é a presença do citrionelol, um terpeno linear com função álcool, que pode estar relacionada ao maior grau de interação, uma vez que os terpenos com moléculas com átomos oxigênio tem interação favorecida com o estrato córneo.

Nas concentrações de 0,25%(p/p) e 0,50% (p/p), o óleo essencial procedente de Cananéia teve o maior grau de interação com a membrana. Esta interação mais acentuada pode ser explicada pela proporção de eugenol presente nesse óleo, que é de 31,5%, enquanto o óleo procedente de Cajati contém 18,9% e o de Morro Grande, 19,6%, uma vez que os fenilpropanóides tem interação favorecida no estrato córneo, comparativamente a terpenos com estruturas menos polares ou lineares (WILLIAMS; BARRY, 2004). Para a concentração de 1,0% (p/p), os óleos procedentes de Cajati e Morro Grande tiveram interações similares e superiores ao óleo procedente de Cananéia.

5.2.2. Espectroscopia ATR-FITR

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR) é uma técnica espectroscópica útil para o estudo do processo de permeação de substâncias através da pele, pois permite a determinação de vibrações moleculares de substâncias presentes no estrato córneo em nível de grupos funcionais (OBATA et al.,2010).

Os espectros ATR-FTIR obtidos para as amostras de membrana natural tratadas com os compostos majoritários citrionelol e eugenol, puros e diluídos em etanol e propilenoglicol e os espectros obtidos para o tratamento com os solventes puros, possibilitaram a avaliação da interação destes compostos com as estruturas do estrato córneo. A membrana natural tratada com água destilada foi considerada como controle. Os espectros das amostras submetidas aos diferentes tratamentos foram obtidos para a região espectral entre 4000 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} e são apresentados a seguir.

No espectro das membranas tratadas com propilenoglicol (Figura 19-B) foi observado aumento do sinal na região de 3100-3200 cm^{-1} , relacionada a estiramentos O-H, que pode ser atribuído à presença do grupo hidroxila do propilenoglicol, que está retido no estrato córneo. Este sinal não é observado na amostra controle ou com a amostra tratada com etanol (Figuras 19-A e 19-C). O sinal observado em 1640-1620 cm^{-1} pode ser atribuído ao estiramento C=O originado de proteína; o sinal observado em 1550 cm^{-1} pode ser atribuído ao estiramento C-N e N-H. Os sinais observados a 2970-2900 cm^{-1} são atribuídos ao estiramento CH_2 originados dos lipídeos presentes nas bicamadas. Foram observadas alteração nesta região para o tratamento das amostras com propilenoglicol (Figura 19-B).

A **B** **C**

Figura 19. Espectros ATR-FTIR de membrana natural tratada com: (A) água desmineralizada - controle; (B) propilenoglicol; (C) etanol, por 24 h

No espectro ATR-FTIR obtido para as amostras tratadas com citronelol puro (Figura 20-A) foram observadas discretas alterações na intensidade dos sinais em $2970\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$, região relacionada aos estiramentos CH_2 , simétrico e assimétrico dos lipídeos do estrato córneo, relacionadas à presença do terpeno linear na membrana. Quando o terpeno foi associado ao propilenoglicol (Figura 20-B), observou-se aumento na intensidade do sinal na mesma região do espectro ($2970\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$), indicando a ocorrência de influência do solvente na interação com o estrato córneo; foram também observadas alterações dos sinais em $1640\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuído ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ originado de proteína e em 1550 cm^{-1} , relacionado ao estiramento C-N e N-H . O mesmo comportamento não foi observado quando o etanol foi utilizado como solvente do terpeno (Figura 20-C).

A **B** **C**

Figure 20. Espectros ATR-FTIR de membrana natural tratada com citronelol: (A) puro; (B) 2,0% (p/p) em propilenoglicol:água (80:20); (C) 2,0% (p/p) em etanol:água (40:60) por 24 h

Com relação aos espectros obtidos para as membranas tratadas com eugenol puro (Figuras 21-B e 21-C), foi observado comportamento similar ao descrito para o citrônolol, evidenciando a influência do solvente na interação do fenilpropanóide com o estrato córneo. No espectro obtido para o eugenol puro (figura 21-A) observou-se a ausência dos sinais em 2970-2900 cm^{-1} , indicando uma possível extração dos lipídeos promovida pelo fenilpropanóide.

A

B

C

Figura 21 - Espectros ATR-FTIR de membrana natural tratada com eugenol: (A) puro; (B) 2,0% (p/p) em propilenoglicol:água (80:20); (C) 2,0% (p/p) em etanol:água (40:60) por 24 h

A utilização da técnica de espectroscopia ATR-FTIR possibilitou a avaliação da interação da membrana natural com os compostos majoritários presentes no óleo da *P. pseudocaryophyllus*, o eugenol, presente nos óleos essenciais das plantas das três procedências, e o citrônolol; composto presente de Morro Grande. O eugenol, quando aplicado puro, promoveu redução dos sinais originados da região espectral

relacionada às cadeias carbônicas dos lipídeos, indicando uma possível extração. Efeito semelhante foi relatado na literatura por Brito e colaboradores (2009) e é considerado um possível mecanismo de ação dos terpenos e fenilpropanóides (BRITO et al., 2009).

Observou-se que os solventes interagiram de forma distinta com a estrutura da membrana natural, sendo que o propilenoglicol teve uma interação mais acentuada com a membrana natural.

Frente aos resultados, observa-se que o propilenoglicol não é um solvente adequado para utilizar em estudos de promotores de permeação, uma vez que interage de forma intensa com a estrutura do estrato córneo, dificultando a avaliação isolada do efeito do promotor. Existem na literatura trabalhos referentes ao estudo do efeito sinérgico entre o propilenoglicol e os terpenos, porém o mecanismo de ação envolvido nesta sinergia ainda não está esclarecido (YAMANE; WILLIAMS ; BARRY, 1994; CORNWELL et al., 1996). Neste sentido, o etanol foi considerado o solvente mais adequado para ser utilizado nas etapas seguintes do projeto.

5.3. Desenvolvimento do sistema PAMPA com a membrana biológica artificial

Nessa etapa foram definidas as condições do ensaio para avaliação da segurança e eficácia dos óleos essenciais e componentes majoritários, como promotores de permeação, e a seleção das composições lipídicas para uso na membrana biomimética ao estrato córneo humano.

5.3.1. Desenvolvimento de camada lipídica que mimetize a composição dos lipídeos do estrato córneo humano

A proposta do trabalho foi desenvolver seis misturas lipídicas com composição similar ao estrato córneo humano, para serem aplicadas na preparação das membranas biológicas artificiais.

O estrato córneo é principal barreira à penetração de substâncias (ANIGBOGU et al., 1995; BARRY, 2001). A porção lipídica localizada nos espaços intercelulares compõe a única via contínua para a permeação de substâncias através do tecido. A matriz lipídica é organizada em microestruturas ou arranjos moleculares na forma de lamelas, formadas por bicamadas lipídicas orientadas na direção paralela à superfície

da pele e estão intimamente relacionados à função barreira (RODRIGUEZ et al., 2010; GROEN, 2008; BOUWSTRA, 2002; WATANABE et al., 2010; GOORIS; BOUWSTRA, 2007; ENGSTROM et al., 2000; DENNIS, 1990).

Na composição lipídica do estrato córneo, as três classes de lipídeos predominantes são o colesterol, as ceramidas e os ácidos graxos de cadeia carbônica longa, presentes em quantidades aproximadamente equimolares (FENSKE, 1994; MADISON, 2003; GOORIS; BOUWSTRA, 2007; NORLEN; SIMONSEN; DESCOUTS, 2007; LEE et al. , 2009; BOUWSTRA;GOORIS, 2010). Ressalta-se que esta composição lipídica difere da composição encontrada na maioria das demais biomembranas, nas quais os fosfolipídeos estão presentes (LEE et al. , 2009; SCHROTER et al.,2009).

As seis misturas lipídicas preparadas foram desenvolvidas com combinação equimolar de lipídeos das classes ceramidas, ácidos graxos de cadeias longas e colesterol. Foram utilizados três tipos de ceramidas e dois tipos de ácidos graxos de cadeia carbônica longa (4.2.3-a). As misturas foram utilizadas para formação da camada lipídica das membranas biológicas artificiais e avaliadas por espectroscopia Raman confocal. Cada uma das misturas lipídicas (A, B, C, D, E e F) foi utilizada individualmente para impregnar filtros de PVDF e esses conjuntos foram nomeados “membranas biológicas artificiais” a partir dessa etapa. Assim, foram preparadas as membranas biológicas artificiais A, B, C, D , E e F, conforme a mistura lipídica utilizada. O procedimento adotado para a preparação das membranas biológicas artificiais seguiu o método descrito 4.2.3-b.

Os espectros Raman confocal foram obtidos na região de 800-1200 cm^{-1} . Esta região está associada aos estiramentos C-C de cadeias carbônicas dos lipídeos das bicamadas do estrato córneo. A intensidade do sinal Raman é expressa em unidades arbitrárias (UA). Os resultados são apresentados a seguir, na Figura 22, juntamente com o espectro obtido para o filtro de PVDF sem impregnação com as misturas lipídicas.

Filtro de PVDF sem lipídeos

Mistura A

Mistura B

Mistura C

Mistura D

Mistura E

Mistura F

Figura 22 – Espectros Raman confocal das membranas biológicas artificiais A a F

Adicionalmente às amostras das membranas biológicas artificiais, foram preparadas amostras de filtros de PVDF impregnados com os lipídeos individuais para fins comparativos e foram obtidos os espectros na mesma faixa de comprimento de onda. Os resultados são apresentados nas Figura 23 a seguir.

Figura 23 – Espectros Raman confocal do filtro de PVDF com impregnação dos lipídeos individuais

Os sinais Raman confocal originados das membranas biológicas artificiais estão relacionados ao número de moléculas presentes na superfície, que atuam no espelhamento da luz, de forma similar aos sinais originados por FT-Raman das membranas naturais e discutido no item 4. Alterações na intensidade dos sinais sugerem a ocorrência de modificações na topografia da superfície da membrana decorrente das alterações nas moléculas presentes.

Os espectros Raman confocal obtidos para as seis membranas biológicas artificiais mostraram sinais semelhantes, indicando a deposição de todas as misturas sobre o filtro de PVDF. Estes resultados estão em acordo com os dados da literatura relativos à composição dos lipídeos presentes no estrato córneo e na sua capacidade de auto-organização. A relação utilizada entre ceramida, ácido graxo de cadeia longa e colesterol na proporção molar de 1:1:1 possibilitou a obtenção de misturas lipídicas com capacidade de auto-organização à semelhança do que ocorre com os lipídeos do estrato córneo (MIZUSHIMA; FUKASAWA;SUZUKI, 1996; GOORIS; BOUWSTRA, 2007; NÓRLEN; SIMONSEN; DESCOUTS, 2007; LEE et al., 2009; BOUWSTRA;GOORIS, 2010). Desta forma, foi possível desenvolver seis membranas biológicas artificiais similares quanto aos espectros observados pela espectroscopia Raman confocal.

Considerando os resultados observados nos espectros obtidos para os lipídeos individuais, apenas o filtro impregnado com colesterol teve sinais Raman confocal similares aos obtidos para as misturas lipídicas A a F. Este fato pode estar relacionado à capacidade de auto-organização das moléculas de colesterol, possibilitando a impregnação dos filtros de forma similar à observada para as misturas lipídicas (HADLEY; McCABE,2012). Os demais lipídeos apresentaram sinais distintos daqueles observados para as misturas lipídicas, e também, distintas entre si.

Os resultados indicaram que a espectroscopia Raman confocal foi uma técnica útil para a avaliação comparativa das membranas biológicas artificiais. Os espectros obtidos indicaram que as seis misturas lipídicas desenvolvidas foram depositadas sobre os filtros de PVDF de forma equivalente. Tomando estes resultados como base, as misturas lipídicas A, B, C, D, E e F foram utilizadas na preparação do sistema PAMPA para as demais etapas do estudo.

5.3.2. Teste de integridade das membranas biológicas artificiais

As membranas biológicas artificiais A a F foram avaliadas quanto à integridade, para confirmação da formação de filme homogêneo de lipídeos sobre os filtros de PVDF, antes da realização de ensaios de permeação, segundo o protocolo preconizado pela empresa Millipore (MILLIPORE, 2005). Utilizou-se solução de marcadores de permeabilidade contendo mistura dos corantes Azul Cresil Brilhante (0,1 mg/mL) e o Amarelo Lúcifer (0,1 mg/mL), preparados de acordo com item 4.2.3.

De acordo com o protocolo, é esperada absorbância mínima no comprimento de onda do corante Azul Cresil Brilhante, controle positivo de permeabilidade; as absorbâncias devem ser da ordem de 0,012; resultados mais elevados indicam membrana não íntegra. Entretanto, os valores encontrados foram de 0,025, o que pode ser atribuído à diferenças de composição, uma vez que o protocolo foi desenvolvido para avaliação de membranas fosfolipídicas, típicas de epitélio intestinal, diferente do estrato córneo, o qual não contém fosfolipídeos (Figuras 24 a 26). Para o Amarelo Lúcifer, o resultado obtido atendeu o protocolo, evidenciando a rejeição do corante, pois as fluorescências medidas foram similares ao tampão (Figura 27).

Para uma avaliação mais criteriosa, foram testados inicialmente os componentes lipídicos individuais e verificou-se a não formação de membrana íntegra, pois houve permeação do corante Azul Cresil Brilhante para as ceramidas C 20 e ceramida C 22, mostrando valores altos de absorbância em relação às membranas biológicas artificiais (misturas lipídicas) (Figura 24). Entretanto, quando as membranas biológicas artificiais foram avaliadas, todas apresentavam comportamento semelhante, com passagem do corante Azul Cresil Brilhante em pequena quantidade e rejeição do corante Amarelo Lúcifer, mostrando a integridade da membrana formada (Figura 25).

Figura 24 - Absorbância do corante Azul Cresil Brilhante permeada através de filtros PVDF impregnados com lipídicos individuais

Figura 25 - Absorbância do corante Azul Cresil Brilhante permeada através das membranas biológicas artificiais (misturas lipídicas)

Com maiores detalhes, mudando-se a escala (10 vezes menor) é observado que as membranas biológicas artificiais desenvolvidas apresentaram permeação mínima do corante Azul Cresil Brilhante esperado segundo o protocolo, demonstrando a formação da membrana (Figura 26).

Figura 26 - Absorbância do corante Azul Cresil Brilhante permeado através das membranas biológicas artificiais (misturas lipídicas – escala 100 vezes)

Em relação à avaliação da fluorescência, foi determinada de forma semelhante à absorbância, indicando que os lipídios individuais não formaram membrana, confirmação esta obtida por meio da presença do corante Amarelo Lúcido na placa acceptora.

A Figura 27 mostra os resultados da fluorescência para os componentes lipídicos individuais e verifica-se que para colesterol, ácido graxo C20 e C24 não há emissão da fluorescência, indicando a não passagem do Amarelo Lúcido por estes pelos filtros impregnados por estes componentes. Entretanto, observa-se uma leitura de emissão acentuada do corante para a permeação através dos filtros impregnados com as ceramidas, indicando a não formação de membrana.

Figura 27 - Fluorescência do corante Amarelo Lúcer permeada através de filtros de PVDF impregnados com lipídicos individuais

A Figura 28 mostra os resultados da fluorescência para membranas biológicas artificiais mostrando a permeação do corante Amarelo Lúcer, quando comparada com os componentes lipídicos na mesma escala de determinação da fluorescência.

Figura 28 - Fluorescência do Amarelo Lúcer permeada através das membranas biológicas artificiais (escala 0 - 7000), expressa em Unidades Relativas de Fluorescência (URF)

Na Figura 29 observa-se a passagem do corante em escala 10 vezes menor em fluorescência, mostrando que as membranas tiveram comportamento similar, permitindo a baixa passagem do corante e de acordo com o protocolo, portanto sugere-se que não houve interação com a membrana (rejeição do corante pela membrana).

Figura 29 - Fluorescência do Amarelo Lúcer permeada através das membranas biológicas artificiais (escala 0 - 70,00), expressa em Unidades Relativas de Fluorescência (URF)

Os resultados mostram que todas as seis membranas biológicas artificiais avaliadas apresentaram comportamento semelhante frente aos dois corantes avaliados, indicando que todas formam estrutura íntegra, conforme avaliação pelo protocolo utilizado. Esses resultados confirmam os obtidos por espectroscopia Raman confocal, cujos espectros indicaram semelhança para as seis membranas.

Para o estudo mais criterioso da integridade das membranas foi avaliada a influência da hidratação prévia ao ensaio de permeação, pois de acordo com publicações (GROEN et al., 2001 e ENGELBRECHT et al., 2012), a hidratação é uma etapa utilizada na preparação de filmes lipídicos similares ao estrato córneo. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

Os resultados dos valores de absorbância das soluções corantes permeadas foram expressos como média, considerando o desvio padrão (n=3). Foram realizadas

comparações estatísticas entre dois grupos utilizando teste t-Student, após avaliar a constância das variâncias pelo teste F. As comparações múltiplas de três ou mais grupos foram conduzidas por meio da análise de variância de um fator e quando o valor de probabilidade foi menor que 5%, o teste de diferença mínima significativa de Fisher foi utilizado, avaliando-se diferenças entre as média dos grupos (GRANATO; CALADO; HARVIS, 2014).

Tabela 3 - Teste de integridade de membranas biológicas artificiais, com e sem hidratação prévia, para valores médios de absorbância do Azul Cresil Brilhante permeado, analisados por variância ANOVA e teste t-Student

Membrana	Ausência de hidratação prévia	Hidratação prévia	P-valor
A	0,0300	0,0300	0,9494
B	0,0300	0,0300	0,9215
C	0,0296	0,0300	0,0699
D	0,0296	0,0300	0,0147
E	0,0297	0,0301	0,0326
F	0,0295	0,0303	0,0438
P-valor	0,3270	0,4680	

Na comparação múltipla entre as absorbâncias do corante Azul Cresil Brilhante permeada, através das membranas A a F sem hidratação, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,327$). O mesmo comportamento foi observado para as membranas com hidratação ($p = 0,468$). Na comparação entre as membranas com e sem hidratação, por teste t-Student, verificou-se diferença estatística entre os tratamentos para as membranas D ($p=0,015$), E ($p=0,033$), e F($p=0,044$). Assim a hidratação prévia alterou a permeação do corante pela membrana, mas em conformidade com o protocolo.

Em relação ao corante Amarelo Lúcer no teste de integridade, os resultados são mostrados na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4 - Teste de integridade de membranas biológicas artificiais, com e sem hidratação prévia, para valores médios de fluorescência do amarelo Lúcyfer permeado, analisados por variância ANOVA e teste t-Student

Membrana	Ausência de hidratação prévia	Hidratação prévia	P-Valor
A	54,993 _a	54,211	0,6358
B	56,917 _a	81,798	0,1073
C	59,996 _{a,b}	59,363	0,8146
D	58,319 _{a,b}	60,920	0,6168
E	64,494 _b	57,195	0,0305
F	61,431 _{a,b}	66,751	0,2535
P-Valor	0,1306	0,036875	

As letras do alfabeto representam os grupos homogêneos

Na comparação múltipla entre as fluorescências do corante permeado através das membranas A a F, sem hidratação (Tabela 4), não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,131$), pela análise de variância (ANOVA). Entretanto, houve diferença ($p = 0,037$) entre as membranas hidratadas. Para essas, aplicou-se o teste de diferença mínima significativa de Fisher. Foram identificados dois grupos homogêneos (letras do alfabeto na tabela 4): membranas A,B,C, D e F; e membranas C,D,E e F.

Ressalta-se que quando se compara as duas condições, com e sem hidratação, pelo teste t-Student, houve diferença estatística somente para a membrana E ($p=0,030$). Adicionalmente, os resultados mostraram que sem hidratação prévia das membranas, os resultados de permeação do corante apresenta menor variação.

Pelos resultados expostos, as membranas formadas apresentaram-se integras, segundo os requisitos propostos no protocolo Millipore, e optou-se pela condição de não hidratação para prosseguir os ensaios.

5.4. Avaliação da segurança dos óleos essenciais e dos componentes majoritários com sistema PAMPA

O sistema PAMPA desenvolvido pode ser utilizado também na avaliação preliminar da segurança de promotor de permeação pela sua retenção na membrana artificial, pois é desejável que haja a permeação do fármaco e a permanência do promotor no estrato córneo. Visando a segurança e utilizando este conceito, Fujikawa e colaboradores (2009) desenvolveram método para avaliação da bio-acumulação de agroquímicos no sistema PAMPA.

O critério utilizado na avaliação da segurança dos óleos essenciais, como promotor de permeação, foi baseado na presença mínima dos óleos essenciais e compostos majoritários no compartimento receptor. Ressalta-se que ação dos promotores de permeação ocorre no estrato córneo, sendo esperada a passagem mínima para as camadas mais internas da pele. Segundo Cal e Sznitowska (2003), os terpenos são considerados não tóxicos, mas são sensibilizantes potenciais, portanto sua penetração através do estrato córneo deve ser controlada. A capacidade dos promotores de permeação de se manterem no estrato córneo é requisito desejado, pois indica menor risco para ocorrência de toxicidade, sendo, portanto indicativo de segurança.

Os resultados a seguir, na Tabela 5, mostram o teste de segurança dos óleos essenciais e componentes majoritários permeados, nas seis membranas biológicas artificiais propostas, por meio da detecção da presença destes, pela leitura de absorbância, no compartimento receptor.

Tabela 5 - Teste de segurança dos óleos essenciais e compostos majoritários com os valores médios de leituras de absorbância do permeado através membranas biológicas artificiais A a F, analisados por variância ANOVA e teste t-Student

Membranas						
A						
Concentração (%) (v/v)	Óleo essencial procedência			Composto majoritário		P-Valor
	Cajati	Cananeaia	Morro Grande	Citronelol	Eugenol	
0.125	0,2130 ^b	0,3078 ^c	0,1158 ^a	0,1234 ^a	0,6803 ^d	< 0,001
0.250	0,3179 ^b	0,6151 ^c	0,1422 ^a	0,1437 ^a	1,3337 ^d	< 0,001
B						
Concentração (%)	Óleo essencial procedência			Composto majoritário		P-Valor
	Cajati	Cananeaia	Morro Grande	Citronelol	Eugenol	
0.125	0,1916 ^b	0,3202 ^c	0,1100 ^a	0,1162 ^a	0,629 ^d	< 0,001
0.250	0,3300 ^{a,b}	0,5999 ^b	0,1401 ^a	0,1477 ^a	1,4006 ^c	< 0,001
C						
Concentração (%)	Óleo essencial procedência			Composto majoritário		P-Valor
	Cajati	Cananeaia	Morro Grande	Citronelol	Eugenol	
0.125	0,2122 ^a	0,3487 ^b	0,1230 ^a	0,1336 ^a	0,7763 ^c	< 0,001
0.250	0,3258 ^b	0,5994 ^c	0,1342 ^a	0,1370 ^a	1,2043 ^d	< 0,001
D						
Concentração (%)	Óleo essencial procedência			Composto majoritário		P-Valor
	Cajati	Cananeaia	Morro Grande	Citronelol	Eugenol	
0.125	0,2241 ^b	0,3656 ^c	0,1227 ^a	0,1197 ^a	0,6916 ^d	< 0,001
0.250	0,3364 ^b	0,6167 ^c	0,1442 ^a	0,1502 ^a	1,3578 ^d	< 0,001
E						
Concentração (%)	Óleo essencial procedência			Composto majoritário		p-Valor
	Cajati	Cananeaia	Morro Grande	Citronelol	Eugenol	
0.125	0,2643 ^b	0,4115 ^c	0,1362 ^a	0,1375 ^a	0,7976 ^d	< 0,001
0.250	0,3942 ^b	0,6537 ^c	0,1558 ^a	0,1514 ^a	1,3157 ^d	< 0,001
F						
Concentração (%)	Óleo essencial procedência			Composto majoritário		P-Valor
	Cajati	Cananeaia	Morro Grande	Citronelol	Eugenol	
0.125	0,2593 ^b	0,4050 ^c	0,1263 ^a	0,1295 ^a	0,8429 ^d	< 0,001
0.250	0,3759 ^b	0,6930 ^c	0,1559 ^a	0,1574 ^a	1,3957 ^d	< 0,001

As letras do alfabeto representam os grupos homogêneos

Destaca-se que as leituras de absorvâncias das amostras puras nas mesmas condições foram todas superiores a 2,000. A Tabela 5 mostra que há diferenças significativas entre a permeação das amostras, nas concentrações de 0,125 e 0,250 % (v/v), em todas as membranas. O óleo que apresentou menor permeação foi o procedente de Morro Grande, cujas leituras média de absorvância à 0,125 e 0,250 % (v/v) em etanol variaram entre 0,110 a 0,132 e 0,1342 a 0,1559, respectivamente.

Estes resultados corroboram as observações obtidas das análises dos espectros FT-Raman das amostras de membrana natural tratadas com os óleos essenciais das três procedências, onde foi observado que todos interagiram com o estrato córneo, embora com diferentes intensidades (item 5.2). Neste ensaio, observou-se redução significativa das absorvâncias no compartimento receptor do sistema PAMPA, comparativamente às absorvâncias dos óleos puros, evidenciando a retenção dos mesmos na membrana.

A menor absorvância observada para o óleo de Morro Grande é provavelmente decorrente da maior afinidade desse óleo pelos lipídeos da membrana devido à sua composição química, mais diversificada em termos de tipos de terpeno (Tabela 1). Esta afinidade pelo estrato córneo também foi observada na avaliação dos espectros FT-Raman para a contração de 2,0% (p/p) em propilenoglicol; esse óleo foi o que apresentou maior interação com a membrana natural.

No teste variância significativa de Fisher para avaliar diferenças entre as médias do grupo, verificou-se que em todas as condições o óleo essencial de Morro Grande e o citrônol pertencem ao mesmo grupo homogêneo. Esse resultado corrobora, mais uma vez, com os obtidos na caracterização química dos óleos essenciais, pois o citrônol é um dos compostos majoritários nesse óleo e está ausente nos outros (Tabela 1). Destaca-se também que é esse óleo essencial apresenta maior número de terpenos que totaliza 22 tipos.

Dessa forma os resultados mostram a importância na avaliação da segurança, pois foi possível detectar a presença dos terpenos diretamente no compartimento receptor, de forma diferente do que ocorre nos estudos convencionais, em que a absorção dos terpenos é em geral demonstrada indiretamente pelo aumento de permeação de fármacos (CAL, 2006). Assim, o teste de segurança proposto fornece parâmetro útil para selecionar os óleos essenciais seguros. Pelos resultados

apresentados o óleo proveniente de Morro Grande foi o mais adequado a uso como promotor, uma vez que permeou em menor quantidade em todas as membranas estudadas e nas concentrações avaliadas. A seleção de promotores de permeação considera o balanço entre eficácia e segurança. Um promotor de permeação deve reduzir reversivelmente a barreira da pele sem causar danos às células viáveis (YAMANE, 1995). Assim, a interação com o estrato córneo é condição necessária para a eficácia, porém a permeação através da membrana deve ser mínima para garantir segurança no uso de um promotor de permeação.

Na análise da comparação entre as membranas (Tabela 6), verifica-se que as membranas A,B e C podem ser consideradas intercambiáveis, considerando que as três membranas pertencem ao mesmo grupo homogêneo para os óleos essenciais de Cajati e Cananéia. Para as demais amostras não foram constatada diferenças significativas entre as membranas.

Tabela 6 - Comparação entre membranas biológicas artificiais A a F no teste de segurança dos óleos essenciais e componentes majoritários com os valores médios de leituras de absorbância do permeado, analisados por variância ANOVA e teste t-Student

Membrana	Óleos essenciais procedência			Componentes majoritários	
	Cajati	Cananéia	Morro Grande	Citronelol	Eugenol
A	0,2130 ^a	0,3078 ^a	0,1158	0,1234	0,6803
B	0,1916 ^a	0,3202 ^{a,b}	0,1100	0,1162	0,6290
C	0,2122 ^a	0,3487 ^{a,b}	0,1230	0,1336	0,7763
D	0,2241 ^{a,b}	0,3656 ^{b,c}	0,1227	0,1197	0,6916
E	0,2643 ^c	0,4115 ^c	0,1362	0,1375	0,7976
F	0,2593 ^{b,c}	0,4050 ^c	0,1263	0,1295	0,8424
P-Valor	0,0060	0,0030	0,0150	0,0750	0,1020

As letras do alfabeto representam os grupos homogêneos

5.5. Avaliação da eficácia óleo essencial e dos componentes majoritários na permeação do diclofenaco de potássio (marcador) com PAMPA

Para avaliar a eficácia dos óleos essenciais e dos componentes majoritários como promotor de permeação, o diclofenaco de potássio foi utilizado como fármaco marcador por ser de difícil permeação através da pele, dada a característica de solubilidade. O pKa do fármaco é 3,80 e na solução tampão pH 7,4 em uso, está predominantemente na forma ionizada e portanto de difícil permeação pelo estrato córneo, adequado, portanto para o estudo de eficácia promotores de permeação. (CHUASUWAN et al., 2009).

Salienta-se que foi realizado estudo prévio e fundamentado nos princípios da permeação cutânea, com a utilização de concentração do diclofenaco de potássio em concentração adequada para fornecer solução saturada de forma a garantir a condição de dose infinita (item 4.2.5). Os óleos essenciais e os componentes majoritários foram aplicados sobre as membranas como pré-tratamento, antes do contato com a solução saturada de diclofenaco de potássio para o início da permeação. A Tabela 7 apresenta as condições experimentais avaliadas.

O etanol foi incluído no estudo como um promotor de permeação que atua através da remoção de lipídeos do estrato córneo e favorece a permeação de fármacos hidrofílicos (SINHA; KAUR; 2000).

Tabela 7 - Condições do ensaio para definir as condições experimentais a serem utilizadas na avaliação da permeação do diclofenaco de potássio para as membranas A.B.C,D, E e F

Condições da membrana	Tempo (h) de permeação	Agitação durante o ensaio	Concentração do óleo essencial % (p/v)*
Ausência de hidratação prévia	3	Orbital	0,5 e 2,0
Ausência de hidratação prévia	3	Orbital	0,25 e 0,125
Hidratação prévia	1	Ausente	0,25 e 0,125
Ausência de hidratação prévia	1	Ausente	0,25 e 0,125

*Referente à concentração final na formulação

A análise forneceu diretrizes para definir as condições experimentais do projeto, sendo escolhida a condição de 1 h de contato do fármaco com a membrana e sem agitação e sem hidratação prévia das membranas. A Figura 30 mostra que os óleos essenciais favorecem a permeação do diclofenaco de potássio em todas as condições e membranas avaliadas. Todavia, quando da ausência destes candidatos a promotor de permeação, as soluções permeadas do fármaco tiveram baixos valores de absorbâncias em comparação com os obtidos da presença dos óleos essenciais.

Figura 30 - Absorbância do diclofenaco de potássio permeada através das membranas A a F tratadas com óleo essencial das diferentes procedências, componentes majoritários e etanol, sem hidratação prévia e com 1 h de contato do fármaco, e com o sistema PAMPA sem agitação

5.5.1. Avaliação da eficácia do óleo essencial e dos componentes majoritários na permeação do diclofenaco de potássio em formulações

Para avaliar a eficácia do óleo essencial e dos componentes majoritários na permeação do diclofenaco de potássio em formulações no sistema PAMPA, foi realizada a validação analítica do método espectrofotométrico de doseamento do diclofenaco de potássio em solução tampão pH 7,4.

A ANVISA publicou a RESOLUÇÃO-RE Nº 899 (BRASIL, 2003) com o "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". O guia se aplica a técnicas analíticas que façam uso de métodos de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); métodos não cromatográficos, desde que ofereçam uma seletividade aceitável, com é o caso da titulometria e da espectrofotometria ultravioleta e visível (UV/VIS), além de teste bioanalíticos. Segundo o documento, métodos destinados a testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (categoria I) devem ser validados considerando os parâmetro de especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade), exatidão e robustez.

A quantificação do diclofenaco de potássio nas amostras obtidas através dos ensaios PAMPA foi realizada por espectrofotometria UV/VIS. A validação do método contemplou os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

Os resultados da validação são apresentados a seguir:

a) Especificidade e Seletividade:

O diclofenaco de potássio exibe máximos em 218 e 275 nm, (FARMACOPEIA BRASILEIRA). O espectro de absorção obtido com a solução do fármaco na concentração de 100% do valor teórico do método (10,0 µg/mL) em solução tampão pH 7,4 mostra que não há interferência significativa do tampão na detecção do fármaco em 275 nm, comprimento de onda adotado para a validação do método. A Figura 31 mostra a representação gráfica dos valores de absorbância obtidos.

Figura 31 – Espectro de absorção de solução de diclofenaco de potássio a 10,0 µg/mL em tampão fosfato pH 7,4

b) Linearidade:

Na avaliação da linearidade do método, os dados experimentais foram inicialmente avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Hartley, respectivamente. Foram preparadas 10 concentrações diferentes na faixa de 40 % (4,0 µg/mL) a 130% (13,0 µg/mL) do valor teórico do método.

Análise de regressão linear baseada no método dos mínimos quadrados ordinários foi empregada para mostrar a associação da absorbância a 275 nm com a concentração de diclofenaco de potássio, fármaco utilizado nos ensaios de permeabilidade, através da equação da reta de regressão. A qualidade do ajuste matemático foi avaliada pelos seguintes parâmetros estatísticos: coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}), valor de probabilidade da regressão (p-valor) baseada na análise de variâncias, e análise de resíduos. Os resíduos foram checados quanto à sua independência pelo teste de Durbin-Watson e o teste de normalidade também foi empregado (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Statistica v. 7 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA). A tabela 8 apresenta os dados originais obtidos nas leituras em UV das diluições preparadas.

Tabela 8 - Absorbância de soluções de diclofenaco de potássio em tampão pH 7,4 a 275 nm

Concentração da solução (µg/mL)	Réplicas				
	1	2	3	4	5
4,0	0,1695	0,1700	0,1680	0,1669	0,1698
5,0	0,1998	0,1955	0,1935	0,1925	0,1955
6,0	0,2187	0,2166	0,2148	0,2167	0,2162
7,0	0,2488	0,2485	0,2477	0,2526	0,2476
8,0	0,2731	0,275	0,2681	0,2684	0,2725
9,0	0,3012	0,2965	0,2948	0,299	0,2955
10,0	0,3271	0,3199	0,3167	0,3193	0,3188
11,0	0,362	0,3564	0,3576	0,3543	0,3587
12,0	0,3755	0,3719	0,3702	0,3717	0,3732
13,0	0,4039	0,3934	0,4044	0,3942	0,3998

Antes da realização as análises de regressão, foram verificadas algumas premissas para confirmação da adequabilidade dos resultados obtidos (Figura 32).

a) Análise de regressão

Figura 32- Gráfico da regressão linear

A equação da reta obtida está representada na Equação 9:

$$y = 0,0658 + 0,0258 \cdot c \quad (9)$$

O quadro 5 a seguir traz o resumo estatístico da regressão.

Resumo Estatístico da Regressão		
Dependente: Absorbância	Multiple R:0,99828612	F= 14549,27
	R ² : 0,99657517	df = 1,50
Nº casos: 52	R2 ajustado: 0,99650668	p= 0,000000
Erro padrão estimado:	0,004414664	
Intercept: 0,065823581	Erro padrão: 0,0018979	t(50)=34,683 p< 0,000

Quadro 5: Estatística da regressão linear

Os resultados indicaram que não existem valores discrepantes, sendo que nenhum resíduo ultrapassa o valor de 3 desvios padrão.

a) Teste de Independência dos resíduos (Durbin-Watson's test) (Quadro 6).

Valor	Durbin-Watson d e correlação serial dos resíduos	
	Durbin-Watson d	Correlação serial dos resíduos
Estimado	1,195135	0,402135

Quadro 6 – Avaliação dos resíduos

O resultado mostrou uma correlação serial baixa indicando que os resíduos são independentes e não mostram tendência, sendo adequado o uso do método regressão linear. Valores de correlação serial entre resíduos acima de 0,7 indicam tendência e não possibilitam a análise de dados por regressão linear. O gráfico a seguir mostra a correlação entre os valores previstos e os valores experimentais com base na análise dos *outliers* (Figura 33).

Figura 33 - Gráfico dos resíduos (valores previstos x valores experimentais)

Foi realizado teste de normalidade dos resíduos (teste Kolmogov), tendo sido obtido P-valor de 0,1175, indicando que os resíduos são independentes, não forma tendência e estão normalmente distribuídos. A representação gráfica esta apresentada na Figura 34 a seguir.

Figura 34 - Gráfico Normal-plot para avaliar normalidade dos resíduos

b) Precisão

A avaliação da precisão foi realizada por meio da leitura espectrofotométrica das soluções do diclofenaco de potássio em 3 concentrações diferentes (60%, 100% e 130% do valor teórico do método). As análises foram realizadas em 6 replicatas para cada concentração. As amostras foram preparadas conforme descrito anteriormente.

Tabela 9 – Absorbâncias de soluções de diclofenaco de potássio em tampão pH 7,4 obtidas a 275 nm para cálculo da precisão

Concentração nominal (µg/mL)	6,00	10,00	13,00
Porcentagem do valor teórico (%)	60%	100%	130%
	0,2246	0,3295	0,4016
	0,2214	0,3317	0,3996
	0,2267	0,3338	0,4114
		0,3348	0,4000
	0,2293	0,3349	0,4175
	0,2272	0,3373	0,4001
Desvio padrão	0,002992	0,00273	0,007575
Média	0,22584	0,333667	0,405033
Desvio padrão bruto	0,013249	0,008181	0,018703
Desvio padrão relativo (%)	1,324901	0,818059	1,870315

O cálculo da precisão do método indicou valor do desvio padrão relativo abaixo de 5%, atendendo aos requisitos da RDC 899/2003 (ANVISA) para este parâmetro.

c) Exatidão

Para a determinação deste parâmetro, a porcentagem de recuperação do diclofenaco de potássio foi considerada a partir da comparação dos resultados experimentais das amostras preparadas em três concentrações diferentes (60, 100 e 130%) com os resultados obtidos a partir das curvas analíticas. A porcentagem de recuperação foi calculada a partir da razão entre os resultados obtidos (RO) e os resultados esperados (RE). As amostras foram preparadas em replicatas, de acordo com o descrito no item b.

Tabela 10 – Absorbâncias de soluções de diclofenaco de potássio em tampão pH 7,4 (275 nm) e resultados obtidos com cálculo pela curva analítica para cálculo da exatidão

Concentração teórica (absorbância)	Concentração experimental (µg/mL)	Concentração teórica (absorbância)	Concentração experimental (µg/mL)	Concentração teórica (absorbância)	Concentração experimental (µg/mL)
6,00		10,00		13,00	
60%		100%		130%	
0,2246	6,1550	0,3295	10,2209	0,4016	13,0155
0,2214	6,0310	0,3317	10,3062	0,3996	12,9379
0,2267	6,2364	0,3338	10,3875	0,4114	13,3953
0,2293	6,3372	0,3348	10,4263	0,4000	12,9534
0,2272	6,2558	0,3349	10,4302	0,4175	13,6317
		0,3373	10,5231	0,4001	12,9573
	6,2031		10,3824		13,1485
Exatidão (%)	103,3850		103,8242		101,1429

O método desenvolvido apresentou linearidade, precisão e exatidão adequadas ao uso pretendido na faixa de concentração de diclofenaco de potássio entre 4 a 13 µg/mL em tampão pH 7,4. Os valores de absorbância seguiram uma distribuição normal, os resultados para *outliers* indicaram que nenhum valor está além de 3 desvios padrão, a análise de resíduos indicou que não existem tendências e os resíduos são independentes.

Com método de doseamento validado, foram preparadas formulações de gel em base aquosa contendo o diclofenaco de potássio (1,0% p/p). O óleo essencial procedente de Morro Grande na concentração de 0,125% (p/v) foi selecionado, na etapa de avaliação da segurança, como candidato a promotor de permeação. Adicionalmente, foram preparadas formulações com citronelol e etanol, na mesma concentração. O etanol foi incluído na avaliação por ter efeito de promoção de permeação conhecido, contribuindo no estudo como um composto de referência (SINHA; KAUR, 2000; WILLIAMS; BARRY, 2004) e o citronelol, um dos compostos majoritários de óleo essencial procedente de Morro Grande, também tem sido estudado como promotor de permeação (CAL, 2006; CAL; SZNITOWSKA, 2003).

Vários terpenos têm mostrado aumento da permeação cutânea tanto de fármacos hidrofílicos quanto de fármacos lipofílicos; existem numerosos trabalhos na literatura referentes à avaliação desta classe de compostos como promotores de

permeação. Embora ainda não se conheça completamente o mecanismo de ação dos terpenos, a maioria das moléculas avaliadas atua sobre a estrutura lipídica do estrato córneo, promovendo a desorganização das bicamadas lipídicas. (AQIL et al., 2007; SAPRA,JAIN ; TIWARY, 2008; BOIX et al., 2005; ARELLANO et al., 1996; WILLIAMS;BARRY, 2004; CAL; SZNITOWAKA, 2003; JAIN et al., 2008; SONGKRO et al., 2009; GODWIN;MICHNIAK, 1999; CORNWELL;BARRY, 1994 ; YAMANE; WILLIAMS ; BARRY,1995). A maioria dos estudos de avaliação do efeito promotor da permeação envolvem ensaios com terpenos individuais, sendo que avaliações de óleos essenciais para essa aplicação são mais raramente encontradas na literatura (FANG et al.,2004; JAIN et al.,2008; BRITO et al.,2009). A fórmula estudada está no Quadro 4. (item 4.2.6.)

Após a preparação, as amostras de gel aquoso foram mantidas em geladeira (2 °C a 8 °C) até o momento do uso. Os óleos essenciais e os componentes majoritários foram incorporados à formulação no momento do uso.

A Tabela 11 mostra as leituras de absorbância, no compartimento receptor, para análise do diclofenaco de potássio após permeação de 1 h e os resultados da avaliação estatística dos dados obtidos, comparando o mesmo tipo de membrana usando os diferentes promotores e comparando as diferentes membranas para o mesmo promotor.

Tabela 11 - Comparação entre membranas biológicas artificiais A a F no teste de eficácia do óleo essencial de Morro Grande, citronelol e etanol a 0,125% (p/p) em gel aquoso, com os valores médios de leituras de absorbância do permeado, analisados por variância ANOVA e teste t-Student

Fórmulas de gel	Membrana						P-valor
	A	B	C	D	E	F	
Com óleo essencial Morro Grande*	0,3017	0,3076	0,2881	0,3067	0,3064	0,3171 ^b	0,024
Com etanol*	0,2700	0,2974	0,2958	0,2997	0,2947	0,2989 ^a	0,137
Com citronelol*	0,2839	0,2964	0,2903	0,3096	0,2992	0,2990 ^a	0,152
P-valor	0,215	0,506	0,548	0,197	0,290	0,012	

A análise dos resultados da comparação do mesmo tipo de membrana para os diferentes promotores indicou que a única membrana com diferença significativa entre

os promotores foi a membrana F. Para essa membrana, foram observados dois grupos homogêneos, sendo um formado pelo etanol e citrônolol e o outro pelo óleo Morro Grande, sendo que o óleo apresentou absorvência significativamente maior do que os outros dois compostos avaliados.

Frete aos resultados ficou evidenciado que o comportamento do óleo essencial Morro Grande foi significativamente diferente dos outros promotores de permeação avaliados.

Os valores das concentrações de diclofenaco de potássio permeadas, calculadas de acordo com o método validado, estão na Tabela 12.

Tabela 12 - Concentração do diclofenaco de potássio $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ em formulações, com diferente promotores de permeação, avaliados através das membranas biológicas artificiais A a F

Fórmulas de gel	Concentração de diclofenaco de potássio ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$)					
	Membrana					
	A	B	C	D	E	F
Com óleo essencial Morro Grande*	137,15	140,58	129,24	140,08	139,90	146,12
Com etanol*	118,70	134,63	133,70	135,97	133,10	135,50
Com citrônolol*	126,78	134,09	130,54	141,72	135,72	135,58

6. CONCLUSÃO

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

- Os óleos essenciais obtidos *Pimenta pseudocaryophyllus* procedentes de três ecossistemas nas localidades de Cajati e Cananéia (SP) e Reserva Natural Morro Grande (MG), apresentaram composição química diferente. O eugenol foi o componente majoritário para os três óleos obtidos e o citronelol apenas para o óleo da planta procedente da Reserva Morro Grande.
- Os óleos essenciais e componentes majoritários da *Pimenta pseudocaryophyllus* apresentaram potencial efeito promotor de permeação cutânea, pois houve interação com os componentes do estrato córneo da membrana natural na espectroscopia ATR-FTIR e FT Raman.
- O sistema PAMPA possibilitou a avaliação da segurança dos óleos essenciais e componentes majoritários da *Pimenta pseudocaryophyllus*, sendo o óleo essencial da Reserva Morro Grande o mais seguro.
- Os óleos essenciais e componentes majoritários da *Pimenta pseudocaryophyllus* promoveram a permeação do diclofenaco de potássio no sistema PAMPA.
- O óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* a 0,125% (p/p) procedente da Reserva Natural Morro Grande, foi selecionado como promotor de permeação e apresentou-se mais eficaz comparativamente ao etanol e citronelol no sistema PAMPA, para a membrana F.
- O sistema PAMPA é método promissor para a triagem de promotores de permeação cutânea.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Identification of essential oil component by gas chromatography/mass spectrometry Academic Press New York 4th Ed p.804, 2007.

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. **International Journal of Pharmaceutics**, v.125, n.2, p.265-282, 1995.

ANJOS, J.L.; SOUSA NETO, D.; ALONSO, A. Effects of 1,8-cineole on the dynamics of lipids and proteins of stratum corneum. **International Journal Pharmaceutics**, v.345, n.1/2, p.81-87, 2007.

AQIL, M.; AHAD, A.; SULTANA, Y.; ALI, A. Status of terpenes as skin penetration enhancers. **Drug Discovery Today**, v.12, n.23/24, p.1061-1067, 2007.

ARELLANO, A.; SANTOYO, S.; MARTIN, C.; YGARTUA, P. Enhancing effect of terpenes on the *in vitro* percutaneous absorption of diclifenac sodium. **International Journal of Pharmaceutics**, v.130, n.1, p.141-145, 1996.

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

AVDEEF, A.; TESTA, B. Physicochemical profiling in drug research: a brief survey of the state-of-the-art of experimental techniques. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.59, n.10, p.1681-1689, 2002.

BABY, A.R.; LACERDA, A.C.L.; KAWANO, Y.; VELASCO, M.V.R.; KANEKO, T.M. Métodos biofísicos empregados na análise do estrato córneo. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.124-130, 2008.

BABY, A.R.; LACERDA, A.C.L.; KAWANO, Y.; VELASCO, M.V.R.; KANEKO, T.M. PAS-FTIR and FT-Raman qualitative characterization of sodium dodecyl sulfate interaction with an alternative stratum corneum model membrane. **Pharmazie**, v.62, n.10, p.727-731, 2007.

BABY, A.R.; LACERDA, A.C.L.; VELASCO, M.V.R.; LOPES, P.S.; KAWANO, Y.; KANEKO, T.M. Spectroscopic studies of stratum corneum model membrane from Bothrops jararaca treated with cationic surfactant. **Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces**, v.50, n.1, p.61-65, 2006a.

BABY, A.R.; LACERDA, A.C.L.; VELASCO, M.V.R.; LOPES, P.S.; KAWANO, Y.; KANEKO, T.M. Evaluation of the interaction of surfactants with stratum corneum model membrane from Bothrops jararaca by DSC. **International Journal of Pharmaceutics**, v.317, n.1, p.7-9, 2006b.

BARROS, F.; MELO, M.M.R.F.; CHIEA, S.A.C.; KIRIZAWA, M.; WANDERLEY, M.G.L.; JUNG-MENDAÇOLLI, S.L., eds. **Flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso**: caracterização geral da vegetação e listagem das espécies ocorrentes. São Paulo: Instituto de Botânica, Hucitec, 1991. v.1.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.14, n.2, p.101-114, 2001. [Review].

BARRY, B.W. Structure, functions, diseases and topical treatment of human skin. In: BARRY, B.W. **Dermatological formulations**: percutaneous absorption. New York: Marcel Dekker, 1983. v.18, p.1-213. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.18).

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.P.; MAIBACH, H., eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum Press, 1993. cap.13, p.225-259.

BERNARD, G.; AUGER, M.; SOUCY, J.; POULIOT, R. Physical characterization of stratum corneum of an *in vitro* psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1770, n.9, p.1317-1323, 2007.

BOIX, A.; PEREIRE, C.; OBACH, R.; DOMENECH, J. Estimation of transdermal permeation parameters in non-stationary diffusion experiments: application to pre-treatment studies with terpenes. **Pharmaceutical Research**, v.22, n.1, p.94-102, 2005.

BOUWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S. The lipid organization in human stratum corneum and model systems. **Open Dermatology Journal**, v.4, p.10-13, 2010.

BOUWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S.; DUBBELAAR, F.E.R.; PONEC, M. Phase behavior of stratum corneum lipid mixtures based on human ceramides: the role of natural and synthetic ceramida 1. **Journal of Investigative Dermatology**, v.118, n.4, p.606-617, 2002.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/>. Acessado em: 26 mai 2014.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5 ed. Brasília: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010.

BRITO, M.B.; BARIN, G.B.; ARAÚJO, A.A.S.; SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H.; LIRA, A.A.M.; NUNES, R.S. The action modes of *Lippia sidoides* (CHAM) essential oil as penetration enhancers on snake skin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.97, n. 1, p.323-327, 2009.

BROCHINI, C.B.; LAGO, J.H.G. Aplicação de técnicas cromatográficas e espectrométricas como ferramentas de auxílio na identificação de componentes de óleos voláteis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.266-270, 2007.

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

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

CAL, K.; SZNITOWSKA, M. Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes: *in vitro* studies. **Journal of Controlled Release**, v.93, n.3, p.369-376, 2003.

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. **Journal Investigative Dermatology**, v.116, n.3, p.434-442, 2001.

CHEN, X.; MURAWSKI, A.; PATEL, K.; CRESPI, C.L.; BALIMANE, P.V. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. **Pharmaceutical Research**, v.25, n.7, p.1511-1520, 2008.

CHIEN, Y.W. Transdermal drug delivery and delivery systems. In: CHIEN, Y.W. **Novel drug delivery systems**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1992. cap.7, 301-369. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.50).

CHUASUWAN, B.; BIJESOH, V.; POLLI, J.E.; ZHANG, H.; AMIDON, G.L.; JUNGINGER, H.E.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; STAVCHANSKY, S.; DRESSMAN, J.B.; BARENDT, D.M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: diclofenac sodium and potassium. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.98, n.4, p.1206-1219, 2009.

HADLEY, K.R.; McCABE, C. A Simulation Study of the Self-Assembly of Coarse-Grained Skin Lipids. **Soft Matter**, 2012; v.8, n. 17, p. 4802–4814, 2012

CORNWELL, P.A.; BARRY, B.W. Sesquiterpene components of volatile oils as skin penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.46, n.4, p.261-269, 1994.

CORNWELL, P.A.; BARRY, B.W.; BOUWASTRA, J.A.; GOORIS, G.S. Modes of action of terpene penetration enhancers in human skin; differential scanning calorimetry, small-angle X-ray diffraction and enhancer uptake studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v.127, n.1, p.9-26, 1996.

DAMIEN, F.; BONCHEVA, M. The extent of orthorhombic lipid phases in stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin *in vivo*. **Journal of Investigative Dermatology**, v.130, p.611-614, 2010. [Letter].

DENNIS, M.J. Absorption process. In: HANSCH, C. **Comprehensive medical chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic applications of chemical compounds**. London: Pergamon Press, 1990. v.5, cap.23.1, p.1-43.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3.ed. Chichester: John Wiley, 2009. 528p.

DI, L.; KERNS, E.H.; FAN, K.; McCONNELL, O.J.; CARTER, G.T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.38, n.3, p.223-232, 2003.

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

DONATO, A.M.; MORRETES, B.L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.426-443, 2007.

DUARTE, A.R. **Espécies de Myrtaceae de uma parcela permanente de floresta ombrófila densa baixo Montana no parque estadual Carlos Botelho, município de Sete Barras – S.P.** Piracicaba, 2003. 77p. Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo.

ELIAS, P.M.; COOPER, E.R.; KORC, A.; BROWN, B.E. Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. **Journal of Investigative Dermatology**, v.76, n.4, p.297-301, 1981.

EL-KATTAN, A.F.; ASBILL, C.S.; KIM, N.; MICHNIAK, B.B. The effect of terpenes on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. **International Journal of Pharmaceutics**, v.215, n.1/2, p.229-240, 2001.

ENGELBRECHT, T.N.; DEMÉ, B.; DOBNER, B.; NEUBERT, R.H.H. Study of the influence of the penetration enhancer isopropyl Myristate on the nanostructure of stratum corneum lipid model membranes using neutral diffraction and deuterium labelling. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.25, p.200-207, 2012.

ENGSTROM, S.; EKELUND, K.; ENGBLOM, J.; ERIKSSON, L.; SPARR, E.; WENNERSTROM, H. The skin barrier from a lipid perspective. **Acta Dermato-Venereologica, Supplement**, v.208, p.31-35, 2000.

FALLER, B. Artificial membrane assays to assess permeability. **Current Drug Metabolism**, v.9, n.9, p.886-892, 2008.

FANG, J.Y.; LEU, Y.L.; HWANG, T.L.; CHENG, H.C. Essential oils from sweet basil (*Ocimum basilicum*) as novel enhancers to accelerate transdermal drug delivery. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.11, p.1819-1825, 2004.

FANG, J.Y.; LEU, Y.L.; HWANG, T.L.; CHENG, H.C.; HUNG, C.F. Development of sesquiterpenes from *Alpinia oxyphylla* as novel skin permeation enhancers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.19, n.4, p.253-262, 2003.

FARIAS V. ROCHA, L.D.; PREUSSLER, K.H.; MARANHO, L.T. Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v.23, n.2, p.398-406, 2009.

FENSKE, D.B.; THEWALT, J.L.; BLOOM, M.; KITSON, N. Models of stratum corneum intercellular membranes: ²H NMR of macroscopically oriented multilayers. **Biophysical Journal**, v.67, n.4, p.1562-1573, 1994.

FINNIN, B.C.; MORGAN, T.M. Transdermal penetration enhancers: applications, limitations, and potential. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.88, n.10, p.955-958, 1999.

FRANZ, T.; LEHMAN, P.; McGUIRE, E. *In vivo* methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J., ed. **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.

FUJIKAWA, M.; NAKAO, K.; SHIMIZU, R.; AKAMATSU, M. The usefulness of an artificial membrane accumulation index for estimation of the bioconcentration factor of organophosphorus pesticides. **Chemosphere**, v.74, n.6, p.751-757, 2009.

GAO, S.; SINGH, J. *In vitro* percutaneous absorption enhancement of a lipophilic drug tamoxifen by terpenes. **Journal of Controlled Release**, v.51, n.2/3, p.193-199, 1998.

GHAFOURIAN, T.; ZANDASRAR, P.; HAMISHEKAR, H.; NOKHODCHI, A. The effect of penetration enhancers on drug delivery through skin: a QSAR study. **Journal of Controlled Release**, v.99, n.1, p.113-125, 2004.

GODWIN, D.A.; MICHNIAK, B.B. Influence of drug lipophilicity and terpenes as transdermal penetration enhancers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.25, n.8, p.905-915, 1999.

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

GOORIS, G.S.; BOUWSTRA, J.A. Infrared spectroscopy study of stratum corneum model membranes prepared from human ceramides, cholesterol, and fatty acids. **Biophysical Journal**, v.92, n.8, p.2785-2795, 2007.

GOTTER, B.; FAUBEL, W.; NEUBERT, R.H.H. Optical methods for measurements of skin penetration. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.21, n.3, p.156-165, 2008.

GRANATO, D.; CALADO, V. M. A.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137-149, 2014.

GRESSLER, E.G.; PIZO, M.A.; MORELLATO, P.G. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, n.4, p.509-530, 2006.

GROEN, D.; GOORIS, G.S.; BOUWSTRA, J. Model membranes prepared with ceramide EOS, cholesterol and free fatty acids form a very unique lamellar phase. **Langmuir**, v.16, n.6, p.4168-4175, 2010.

GROEN, D.; GOORIS, G.S.; PONEC, M.; BOUWSTRA, J.A. Two new methods for preparing a unique stratum corneum substitute. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1778, n.10, p.2421-2429, 2008.

GUILLARD, E.C.; TFAYLI, A.; LAUGEL, C.; BAILLET-GUFFROY, A. Molecular interactions of penetration enhancers within ceramides organization: A FTIR approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, n.36, n.2/3, p.192-199, 2009.

HADLEY, K.R.; MCCABE, C. **A Simulation Study of the Self-Assembly of**

HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for *in vitro* diffusion experiments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.5/6, p.311-330, 1994.

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. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.89, n.9, p.1106-1113, 2000.

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. **Pharmaceutical Research**, 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. **Pharmaceutical Research**, v.7, n.10, p.1042-1047, 1990a.

IWAI, I.; HAN, H.; DEN HOLLANDER, L.; SVENSSON, S.; OFVERSTEDT, L.G.; ANWAR, J.; BREWER, J.; BLOKSGAARD, M.; LALOEUF, A.; NOSEK, D.; MASICH, S.; BAGATOLLI, L.A.; SKOGLUND, U.; NORLÉN, L. The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. **Journal of Investigative Dermatology**, v.132, n.9, p.2215-2225, 2012.

JAIN, R.; AQIL, M.; AHAD, A.; ALI, A.; KHAR, R.K. Basil oil is a promising skin penetration enhancer for transdermal delivery of labetalol hydrochloride. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.34, n.4, p.384-389, 2008.

JHAWAT, V.C.; SAINI, V.; KAMBOJ, S.; MAGGON, N. Transdermal drug delivery systems: approaches and advancements in drug absorption through skin. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.20, n.1, p.47-56, 2013.

JORGE, L.I.F. **Caracterização farmacobotânica e microscopia alimentar de seis espécies brasileiras de Myrtaceae Jussieu**. São Paulo, 1992. 140p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

KANG, L.; YAP, C.W.; LIM, P.F.C.; CHEN, Y.Z.; HO, P.C.; CHAN, Y.W.; WONG, G.P.; CHAN, S.Y. Formulation development of transdermal dosage forms: quantitative structure-activity relationship model for predicting activities of terpenes that enhance drug penetration through human skin. **Journal of Controlled Release**, v.120, n.3, p.211-219, 2007.

KANSY, M.; AVDEEF, A.; FISCHER, H. Advances in screening for membrane permeability: high-resolution PAMPA for medicinal chemists. **Drug Discovery Today: Technologies**, v.1, n.4, p.349-355, 2004.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeability assay in the description of passive absorption processes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.41, n.7, p.1007-1010, 1998.

KESSNER, D.; RUETTINGER, A.; KISELEV, M.A.; WARTEWIG, S.; NEUBERT, R.H.H. Properties of ceramidas and their impact on the stratum corneum structure: a review. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.21, p.58-74, 2008.

KUNTA, J.R.; GOSKONDA, V.R.; BROTHERTON, H.O.; KHAN, M.A.; REDDY, I.K. Effect of menthol and related terpenes on the percutaneous absorption of propranolol across excised hairless mouse skin. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.86, n.12, p.1369-1373, 1997.

LANDRUM, L.R. **Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium and Luma (Myrtaceae)**. New York: New York Botanical Garden Press, 1986. 178p. (Flora Neotropica: Monograph, 45).

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, n.4, p.508-536, 1997.

LANGENHEIM, J.H. **Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany**. Portland, Cambridge: Timber Press, 2003. 571p.

LEE, D.; ASHCRAFT, J.N.; VERPLOEGEN, E.; PASHKOVSKI, E.; WEITZ, D.A. Permeability of model stratum corneum lipid membrane measured using quartz crystal microbalance. **Langmuir**, v.25, n.10, p.5762-5766, 2009.

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). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.47, n.4, p.276-281, 1994.

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

LIMA, M.E.L.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; SOBRA, M.E.G.; MORENO, P.R.H. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State – Brazil. **Pharmacologyonline**, v.3, p.589-593, 2006.

LOPES, P.S.; KANEKO, T.M. Membranas no estudo de permeação cutânea. **Cosmetics and Toiletries, Edição em Português**, v.12, n.2, p.62-66, 2000.

MADISON, K.C. Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.121, n.2, p.231-241, 2003.

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

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

METCALF, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons**: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy, with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press, 1950. v.1, p.621-631.

MILLIPORE. **Protocol Note**: PC1545EN00: Membrane Integrity test for Lipid-PAMPA Artificial Membranes. Disponível em: [http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/2147fb6da40eb49885256fb8007456fd/\\$FILE/PC1545EN00.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/2147fb6da40eb49885256fb8007456fd/$FILE/PC1545EN00.pdf). Acesso em: 22 mai 2014.

MIZUSHIMA, H.; FUKASAWA, J.I.; SUZUKI, T. Phase behavior of artificial stratum corneum lipids containing a synthetic pseudo-ceramide: a study of the function of cholesterol. **Journal of Lipid Research**, v.37, n.2, p.361-367, 1996.

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. **International Journal of Pharmaceutics**, v.131, n.2, p.103-115, 1996.

MONTI, D.; CHETONI, P.; BURGALASSI, S.; NAJARRO, M.; SAETTONE, M.F.; BOLDRINI, E. Effects of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.237, n.1/2, p.209-214, 2002.

MORGANTE, P.G.; COFFANI-NUNES, J.V.; MORENO, P.H.M.; SOBRAL, M. Cataia: muito consumida, pouco conhecida. In: SILVA, R.B.; MING, L.C., eds. **Relatos de pesquisas e outras experiências vividas no Vale do Ribeira**. Jaboticabal: Ministério do Meio Ambiente, UNESP, 2010. p.19-40. (Polo de biotecnologia da Mata Atlântica).

MOTTA, S.; MONTI, M.; SESANA, S.; CAPUTO, R.; CARELLI, S.; GHIDONI, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1182, n.2, p.147-151, 1993.

NOKHODCHI, A.; SHARABIANI, K.; RASHIDI, M.R.; GHAFOURIAN, T. The effect of terpene concentrations on the skin permeation of diclofenac sodium. **International Journal of Pharmaceutics**, v.335, n.1/2, p.97-105, 2006.

NORLEN, L. GIL, I.P.; SIMONSEN, A.; DESCOUTS, P. Human stratum corneum lipid organization as observed by atomic force microscopy on Langmuir-Blodgett films. **Journal of Structural Biology**, v.158, n.3, p.386-400, 2007.

OBATA, Y.; UTSUMI, S.; WATANABE, H.; SUDA, M.; TOKUDOME, Y.; OTSUKA, M.; TAKAYAMA, K. Infrared spectroscopic study of lipid interaction in stratum corneum treated with transdermal absorption enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.389, n.1/2, p.18-23, 2010.

OCHALEK, M.; HEISSLER, S.; WOHLRAB, J.; NEUBERT, R.H.H. Characterization of lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and penetration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.81, n.1, p.113-120, 2012a.

OCHALEK, M.; PODHAISKY, H.; RUETTINGER, H.H.; NEUBERT, R.H.H.; WOHLRAB, J. SC lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and permeation. Part III. Influence of penetration enhancer on diffusion and permeation of model drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.436, n.1/2, p.206–213, 2012b.

OHARA, N.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Combined effect of d-limonene pretreatment and temperature on the rate skin permeation of lipophilic and hydrophylic drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.18, n.3, p.439-442, 1995.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989, 215p.

OTTAVIANI, G.; MARTEL, G.; CARRUPT, P.A. Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, n.13, p.3948-3954, 2006.

PAULA, J.A.M.; BARA, M.T.F.; REZENDE, M.H.; FERREIRA, H.D.; PAULA, J.R. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum - Myrtaceae. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.2, supl., p.153-156, 2005.

PAULA, J.A.M.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; REZENDE, M.H.; FERREIRA, H.D. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum-Mystaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.265-278, 2008.

PAULA, J.A.M.; ROCHA, J.B.; NASCIMENTO, P.M.S. REZENDE, M.H.; PAULA, J.R. Estudo farmacognóstico da casca de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum- Myrtaceae. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, supl., p.1-3, 2006.

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

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, supl.1, p.45-61, 2002.

PROGRAMA EDUCAR. **Mata Atlântica**. Disponível em <http://educar.sc.usp.br/licenciatura/trabalhos/mataatl.htm>. Acesso em: 08 maio 2014.

RABIONET, M.; BAYERLE, A.; MARSCHING, C.; JENNEMANN, R.; GRÖNE, H.J.; YILDIZ, Y.; WACHTEN, D.; SHAW, W.; SHAYMAN, J.A.; ROGER SANDHOFF, R. 1-O-Acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. **Journal of Lipid Research**, v.54, n.12, p.3312-3321, 2013.

REIS, J.M.; SINKÓ, B.; SERRA, C.H.R. Parallel artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) – is it better than Caco-2 for human passive permeability prediction? **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.10, n.11, p.1-5, 2010.

REIS, J.M. **Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA): investigação das variáveis do ensaio para estudo da permeabilidade de fármacos**. 2013, 157p. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

RIGG, P.C.; BARRY, B.W. Shed snake skin and hairless mouse skin as a model membrane for human skin during permeation studies. **Journal of Investigative Dermatology**, 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.L., ed. **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing, 1993. cap.5, p.113-125.

ROBSON, K.J.; STEWART, M.E.; MICHELSEN, S.; LAZO, N.D.; DOWNING, D.T. 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. **Journal of Lipid Research**, v.35, n.11, p.2060-2068, 1994.

RODRIGUEZ, G.; RUBIO, L.; COCERA, M.; ESTELRICH, J.; PONS, R.; MAZA, A.; LOPEZ, O. Application of bicellar systems on skin: diffusion and molecular organization effects. **Langmuir**, v.26, n.13, p.10578-10584, 2010.

SAKITA, M.N.; AGUIAR, O.T.; YATAGAI, M.; IGARASHI, T. Óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae) I: Cromatografia a Gás/Espectrometria de Massa (CG/EM). **Revista do Instituto Florestal**, v.6, p.53-61, 1994.

SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A.K. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: mechanistic view. **AAPS Journal**, v.10, n.1, p.120-132, 2008.

SCHROTER, A.; KESSNER, D.; KISELEV, M.; HAUSS, T.; DANTE, S.; NEUBERT, R.H.H. Basic nanostructure of stratum corneum lipid matrices based on ceramides [EOS] and [AP]: a neutron diffraction study. **Biophysical Journal**, v.97, n.4, p.1104–1114, 2009.

SIMONS, K.; SAMPAIO, J.L. Membrane organization and lipid rafts. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.3, n.10, p.A004697, 2011.

SINHA, V.R.; KAUR, M.P. Penetration enhancers for transdermal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.26, n.11, p.1131-1140, 2000.

SINKÓ, B.; GARRIGUES, T.M.; BALOGH, G.T.; NAGY, Z.K.; TSINMAN, O.; AVDEEF, A.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.5, p.698-707, 2012.

SINKÓ, B.; KOKOSI, J.; AVDEEF, A.; TAKÁCS-NÓVAK, K. A PAMPA study of the permeability-enhancing effect of new ceramide analogues. **Chemistry & Biodiversity**, v.6, n.11, p.1867-1874, 2009.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Espectroscopia Raman. In: _____. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. São Paulo: Bookman, 2002. cap.18, p.385-398.

SONGKRO, S.; RADES, T.; BECKET, G. Effects of some terpenes on the *in vitro* permeation of LHRH through newborn pig skin. **Pharmazie**, v.64, n.2, p.110-115, 2009.

SOUZA, S. V. C., JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, n. 552, p. 25–35, 2005.

STAGGEMEIER, V.G.; MORELLATO, L.P.C.; GALETTI, M. Fenologia reprodutiva de Myrtaceae em uma ilha continental de floresta atlântica. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.1, p.423-425, 2007.

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

TFAYLI, A.; GUILLARD, E.; MANFAIT, M.; BAILLET-GUFFROY, A. Molecular interaction of penetration enhancers within ceramides organization: a Raman spectroscopy approach. **Analyst**, n.137, n.21, p.5002-5010, 2012.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for Industry**: nonsterile semisolid dosage forms scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation. Rockville: FDA, 1997. 37p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070930.pdf>. Acesso em: 08 maio 2014.

UNITED STATES Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, GRAS-Generally recognized as safe Disponível em: www.fda.gov/food/foodingredientspackaging/generallyrecognizedassafe. Acesso em: 08 maio 2014.

VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V.; AGUIAR, O.T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg – MYRTACEAE. **Revista do Instituto Florestal**, v.18, n.único, p.15-22, 2006.

VAN SMEDEN, J.; HOPPEL, L.; VAN DER HEIJDEN, R.; HANKEMEIER, T.; VREEKEN, R.J.; BOUWASTRA, J.A. LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. **Journal of Lipid Research**, v.52, n.6, p.1211-1221, 2011.

VÁVROVÁ, K.; ZBYTOVSKÁ, J.; HRABÁLEK, A. Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, n.19, p.2273-2291, 2005.

VILLAS BÔAS, G.K.; GADELHA, C.A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, n.6, p.1463-1471, 2007.

VOEGELI, R.; RAWLINGS, A.V. Corneocare: the role of the stratum corneum and the concept of total barrier care. **Household and Personal Care Today**, v.8, n.4, p.7-17, 2013.

WATANABE, H.; OBATA, Y.; ONUKI, Y.; ISHIDA, K.; TAKAYAMA, K. Novel preparation of intercellular lipid models of stratum corneum containing stereoactive ceramide. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.58, n.3, p.312-317, 2010.

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

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

WILLIAMS, A.C.; EDWARDS, H.G.M.; BARRY, B.W. Fourier transform Raman spectroscopy: a novel application for examining human stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v.81, n.2/3, p.R11R14, 1992.

YAMANE, M.A.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Terpene penetration enhancers in propylene glycol/water solvent systems: effectiveness and mechanism of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.47, n.12A, p.978-985, 1995.

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

ZHANG, Z.; MICHNIAK-KOHN, B.B. Tissue engineered human skin equivalents. **Pharmaceutics**, v.4, n.1, p.26-41, 2012. [Review].

8. ANEXOS

ANEXO A: Certificado de Premiação de pôster

Prêmio recebido na Conferência da The International Federation of Societies of Cosmetic Chemists - IFSCC, Rio de Janeiro, 30/10 a 01/11/2013 com o prêmio – Host Society Award.

Título do Pôster: Raman Confocal evaluation of *stratum corneum* biomimetic model membrane for study of safety and efficacy of permeation enhancers

30th October to
1st November, 2013
RIO DE JANEIRO, BRAZIL

CHF 2000.00

Host Society Award

Author Kuria Lwinda

Paper Raman Evaluation of Stratum C. B. M. M. for Evaluation

Rio de Janeiro, 1st November, 2013

Jadir Nunes

Jadir Nunes
President
22nd IFSCC Conference

8abc
CERTIFICADO