

Recebido em 19/05/99

Guilherme

NÃO LILACS

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

**Influência da Papaína e do Óleo de Pequi na Penetração
Percutânea do Diclofenaco de Sódio**

Patricia Santos Lopes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Telma Mary Kaneko

São Paulo
1999

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

Lopes, Patricia Santos

L864i **Influência da papaína e do óleo de pequi na penetração**
percutânea do diclofenaco de sódio / Patricia Santos
Lopes. -- São Paulo, 1999.
143p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento
de Farmácia.

Orientador: Kaneko, Telma Mary

1. Medicação transdérmica : Terapêutica 2. Formulações
farmacêuticas 3. Papaína : Farmacologia I. T. II. Kaneko,
Telma Mary, orientador.

615.67 CDD

Patricia Santos Lopes

**Influência da Papaína e do Óleo de Pequi na Penetração
Percutânea do Diclofenaco de Sódio**

Comissão Julgadora

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
Orientador/Presidente

Prof. Dr. José Luiz Pires Camacho

1º. Examinador

Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco de Paola
2º. Examinador

São Paulo, 15 de Dezembro de 1999

DEDICATÓRIA

Ao Senhor, pela Sua Infinita Sabedoria e Bondade, por mostrar-me sempre os melhores caminhos, as pessoas certas e o tempo correto de agir ou de esperar. Obrigada, pela Sua constante presença na minha vida, pelo consolo na hora do desespero e pela alegria de alcançar um objetivo!

Dad obrigada pelo apoio e principalmente por mostrar que apenas com muito esforço e trabalho atingimos nossas metas.

Mãe obrigada por ter me ensinado a confiar em Deus antes de tudo e de todos. Obrigada pelo colo, por ter secado minhas lágrimas e ter participado das minhas alegrias.

Mariana e Daniel desculpem pelas muitas vezes que vocês foram válvulas de escape.

Tia Tula, Tia Mota e Naira agradeço todo apoio que vocês sempre me deram.

Lara, obrigada por ouvir os problemas, sugerir soluções e me compreender sempre.

Telma, minha incansável orientadora, amiga e colaboradora, obrigada pelo conhecimento, incentivo, generosidade, solidariedade e alegria. Obrigada pelas risadas, pelas broncas e acima de tudo pela confiança.

AGRADECIMENTOS

Às professoras Mitsuko Taba Ohara e Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, que estiveram sempre dispostas a esclarecer minhas dúvidas e sugerir soluções.

À professora Maria Elena Taqueda, do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo pela execução do planejamento estatístico.

Ao professor Massuo Jorge Kato, do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química, pelo uso do Cromatógrafo a Líquido e pela ajuda no desenvolvimento da metodologia analítica.

À Dra. Marlene Ishizuka, da Escola Paulista de Medicina - UNIFES, pela colaboração e fornecimento das peles.

Ao professor Shuji Kitagawa, Ph.D., Department of Pharmaceutics - College of Pharmacy, Niigata, Japan, por ter doado as células de Franz.

Ao professor Shinji Sato, Ph.D., Department of Pharmaceutics - College of Pharmacy, Niigata, Japan por gentilmente ter corrigido os cálculos referentes ao experimento.

Ao Márcio Ferrarini, por toda ajuda, pelo apoio e principalmente pela amizade.

Ao José de Sousa Sobrinho, que esteve sempre disposto a colaborar.

À Márcia, Débora e Mônica, cuja convivência no laboratório foi produtiva e essencial.

Aos amigos Elissa, Marcelo, Cristina e Flávia pelo incentivo a estudar sempre mais.

À Adriana de Almeida Barreiros, bibliotecária do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, pela pronta revisão das referências bibliográficas.

A todos os professores, amigos e funcionários dos Laboratórios de Farmacotécnica, Cosmetologia e Controle de Qualidade Físico-Químico, além do CONFAR, que de uma forma ou de outra colaboraram com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DA PELE.....	5
1.1. <i>Epiderme</i>	5
1.2. <i>Derme</i>	7
1.3. <i>Tecido subcutâneo</i>	7
1.4. <i>Apêndices da pele</i>	9
1.5. <i>Vascularização e Inervação da Pele</i>	11
2. TRANSPORTE ATRAVÉS DA PELE	11
2.1. <i>Difusão transfolicular</i>	13
2.2. <i>Difusão no estrato córneo</i>	13
3. PRINCÍPIOS BÁSICOS DA DIFUSÃO.....	15
4. PROPRIEDADES QUE INFLUENCIAM A ABSORÇÃO PERCUTÂNEA.....	22
4.1. <i>Fatores biológicos</i>	22
4.1.1. <i>Pele</i>	22
4.1.2. <i>Metabolismo da pele</i>	30
4.1.3. <i>Efeitos circulatórios</i>	34
4.2. <i>Fatores físico-químicos</i>	34
4.3. <i>Promotores de Absorção ("Enhancers")</i>	38
4.3.1. <i>Promotores de Absorção Químicos</i>	39
4.3.1.1. <i>Mecanismo geral de ação dos promotores de absorção</i> ...	40
4.3.1.2. <i>Principais promotores de absorção químicos</i>	45
5. SISTEMAS TÓPICOS VERSUS SISTEMAS TRANSDÉRMICOS.....	60
6. ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO PERCUTÂNEA E DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROMOTORES DE ABSORÇÃO	65
6.1. <i>Métodos de estudo de permeação percutânea in vivo</i>	67
6.2. <i>Métodos de estudo da permeação percutânea in vitro</i>	74
6.2.1. <i>Preparo da membrana</i>	78
6.2.2. <i>Escolha do fluido receptor</i>	81
6.2.3. <i>Agitação do conteúdo no compartimento receptor</i>	82
6.2.4. <i>Manutenção da temperatura da pele</i>	83
6.2.5. <i>Oclusão / Aplicação aberta</i>	83
MATERIAL E MÉTODOS	85
1. MATERIAL	85
1.1. <i>Matérias primas</i>	85
1.2. <i>Reagentes</i>	85
1.3. <i>Equipamentos</i>	86
1.4. <i>Formulações Avaliadas</i>	88
1.4.1. <i>Óleo de Pequi 5% p/p</i>	88
1.4.2. <i>Óleo de Pequi 10% p/p</i>	88
1.4.3. <i>Papaína 0,2% p/p</i>	88
1.4.4. <i>Papaína 0,05% p/p</i>	88

1.4.5. Associação óleo de pequi 7,5% e papaína 0,1% p/p	89
1.4.6. Solução saturada de diclofenaco de sódio.....	89
2. MÉTODOS	90
2.1. <i>Preparação da curva de calibração para Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)</i>	90
2.2. <i>Padronização da metodologia analítica para CLAE</i>	91
2.2.1. Parâmetros	91
2.2.2. Preparo da fase móvel	92
2.2.3. Preparo do padrão interno	92
2.3. <i>Permeação do diclofenaco de sódio</i>	92
2.3.1. Preparo da membrana	92
2.3.2. Teste	93
2.3.3. Preparação das amostras para análise por CLAE	95
2.4. <i>Planejamento estatístico</i>	96
2.5. <i>Cálculo dos parâmetros da difusão</i>	97
RESULTADOS	99
DISCUSSÃO	115
CONCLUSÕES	121
RESUMO	122
ABSTRACT	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele, apêndices e sistema vascular.....	8
Figura 2. Possíveis rotas de penetração de substâncias na pele.	12
Figura 3. Transportes através do estrato córneo, via transcelular e intercelular.	12
Figura 4. Transporte por difusão passiva - Lei de Fick	16
Figura 5. Representação gráfica do LagTime.....	20
Figura 6. Densidade e tamanho dos folículos pilosos em 5 tipos de pele....	23
Figura 7. Sítios de ação dos promotores de absorção nos espaços intercelulares do estrato córneo.	41
Figura 8. Proposta do modo de interação de alguns promotores de absorção com o estrato córneo.....	45
Figura 9. Composição percentual dos ácidos graxos presentes no óleo da polpa amarela do pequi.	52
Figura 10. Pele humana obtida de cirurgia plástica de redução de mama - vista da superfície externa.....	79
Figura 11. Pele humana obtida de cirurgia plástica de redução de mama - vista da superfície interna.....	79
Figura 12. Célula de Franz modificada, anéis de silicone, pele e garra de aço inoxidável.....	94
Figura 13. Célula de Franz modificada parcialmente montada.....	94
Figura 14. Célula de Franz modificada parcialmente montada.....	94

Figura 15. Célula de Franz modificada, totalmente montada, contendo o fluido receptor.....	95
Figura 16. Sistema pronto para o experimento. Três células de Franz sobre o suporte do agitador mecânico.	95
Figura 17. Gráfico das médias e desvio padrão dos valores de quantidade permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para os experimentos 7,8 e 9, referentes ao pré-tratamento com papaína 0,2% p/p.	100
Figura 18. Gráfico das médias e desvio padrão dos valores de quantidade permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em relação ao tempo, para os experimentos 7, 8 e 9, referentes a fórmula com papaína 0,2% p/p.....	101
Figura 20. Média dos valores da Permeabilidade (cm/h) em função da Fórmula.	111
Figura 21. Média dos valores do LagTime (h) em função da Fórmula.....	112
Figura 22. Média dos valores de Coeficiente de Difusão (cm^2/h) em função da Fórmula.	113
Figura 23. Média dos valores do Coeficiente de Partição em função da Fórmula.	114

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações do diclofenaco de sódio para determinação da curva de calibração para CLAE.....	91
Tabela 2. Matriz de ensaio para a realização do projeto com 5 tratamentos.	96
Tabela 3. Valores da quantidade permeada por área para os experimentos 7, 8 e 9, referentes ao pré-tratamento com papaína 0,2%p/p.	100
Tabela 4. Valores da quantidade permeada por área para os experimentos 7, 8 e 9, referentes a fórmula com papaína 0,2% p/p.....	101
Tabela 5. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 1 da fórmula com óleo de pequi 5% p/p.....	102
Tabela 6. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 2 da fórmula com óleo de pequi 5% p/p.....	102
Tabela 7. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 3 da fórmula com óleo de pequi 5% p/p.....	103
Tabela 8. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 4 da fórmula com óleo de pequi 10% p/p.....	103
Tabela 9. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 5 da fórmula com óleo de pequi 10% p/p.....	104
Tabela 10. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 6 da fórmula com óleo de pequi 10% p/p.....	104
Tabela 11. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 7 da fórmula com papaína 0,2% p/p.....	105
Tabela 12. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 8 da fórmula com papaína 0,2% p/p.....	105

Tabela 13. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 9 da fórmula com papaína 0,2% p/p.....	106
Tabela 14. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 10 da fórmula com papaína 0,05% p/p.....	106
Tabela 15. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 11 da fórmula com papaína 0,05% p/p.....	107
Tabela 16. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 12 da fórmula com papaína 0,05% p/p.....	107
Tabela 17. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 13 da fórmula com associação de óleo de pequi 7,5% e papaína 0,1% p/p.	108
Tabela 18. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 14 da fórmula com associação de óleo de pequi 7,5% e papaína 0,1% p/p.	108
Tabela 19. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 15 da fórmula com associação de óleo de pequi 7,5% e papaína 0,1% p/p.	109
Tabela 20. Análise de variância para Fórmula e Fluxo, projeto fatorial "one way".....	110
Tabela 21. Intervalo das médias para análise de variância múltipla para Fórmulas e Fluxo, projeto fatorial "one way".	110
Tabela 22. Análise de variância para Fórmula e Permeabilidade, projeto fatorial "one way".....	111
Tabela 23. Intervalo das médias para análise de variância múltipla para Fórmulas e Permeabilidade, projeto fatorial "one way".	111
Tabela 24. Análise de variância para Fórmula e LagTime, projeto fatorial "one way.....	112
Tabela 25. Intervalo das médias para análise de variância múltipla para Fórmulas e LagTime, projeto fatorial "one way".	112

Tabela 26. Análise de variância para Fórmula e Coeficiente de Difusão, projeto fatorial "one way".	113
Tabela 27. Intervalo das médias para análise de variância múltipla para Fórmulas e Coeficiente de Difusão, projeto fatorial "one way".	113
Tabela 28. Análise de variância para Fórmula e Coeficiente de Partição, projeto fatorial "one way".	114
Tabela 29. Intervalo das médias para análise de variância múltipla para Fórmulas e Coeficiente de Partição, projeto fatorial "one way".	114

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ΔC - diferença de concentrações
 - ATR-FTIR - Espectroscopia Infravermelho com transformações de Fourier por refração total atenuada
 - CLAE - Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
 - CS - Concentração Inicial do fármaco no compartimento receptor (μg)
 - D - Coeficiente de Difusão (cm^2/h)
 - DCMS - decil metil sulfóxido
 - DMSO - dimetil sulfóxido
 - DSC (Differential Scanning Calorimetry) - Calorimetria Exploratória Diferencial
 - e - espessura (cm)
 - FHN - Fator de Hidratação Natural
 - J - Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)
 - K - Coeficiente de Partição
 - LagTime - Tempo Lag (h) - período requerido para um penetrante estabelecer um gradiente de concentração uniforme com a membrana que separa o compartimento doador do compartimento receptor.
 - LPP - Teoria do Lipídeo, Proteína e Partição
 - M - Massa (μg)
 - MEM - Minimum Essential Medium
 - P - coeficiente de Permeabilidade (cm/h)
 - S - área (cm^2)
 - t - tempo
 - TTS (Transdermal Therapeutic System) - Sistemas Transdérmicos de Liberação
-

INTRODUÇÃO

Introdução

A aplicação de preparações sobre a pele como loções, cremes, ungüentos e poções, tem sido utilizada na terapêutica e na cosmetologia por séculos. As vantagens do uso da rota transdérmica para aplicação de substâncias ativas incluem a prevenção do metabolismo pré-sistêmico ou primeira passagem pelo fígado, a aceitação do paciente devido à diminuição da frequência de dose e o aumento da eficácia e/ou diminuição dos efeitos adversos, resultantes da otimização da cinética de liberação de doses totais menores.

No entanto, mesmo com a utilização de adesivos ou preparações com diferentes veículos, a relativa impermeabilidade do estrato córneo limita drasticamente o número e tipo de substâncias ativas que podem ser administradas transdérmicamente em doses terapêuticas. Métodos físicos como a sonoforese (58, 135), iontoforese (9, 50, 74, 104), eletroporação (121), uso de microagulhas (46) e diversos promotores de absorção químicos, vêm sendo utilizados com o objetivo de modificar, de maneira temporária e reversível a barreira do estrato córneo, auxiliando a penetração das substâncias ativas (5, 6, 30, 32).

O desenvolvimento de um sistema transdérmico eficiente abrange diversos pontos com a finalidade de aumentar a penetração percutânea. Um deles consiste em alterar as propriedades físico-químicas do fármaco, aumentando sua solubilidade e coeficiente de partição. Outra forma de aumentar a permeação, é o uso de promotores que modificam a difusão de solutos através da pele. Muitos dos fármacos hidrofílicos que são usados na forma de sal não podem permear a epiderme sem um promotor, já que apresentam coeficiente de permeabilidade muito baixo. No entanto, estes fármacos, como o diclofenaco de sódio, demonstram uma alta permeação percutânea com o uso de promotores e co-solventes (65).

Diclofenaco de sódio é um antiinflamatório não esteroide de uso oral utilizado no tratamento de artrite reumatóide e outras doenças reumáticas. É

metabolizado no fígado e excretado principalmente na urina. Deve ser administrado freqüentemente, já que possui meia vida biológica curta, o que o torna um possível candidato à via transdérmica. No entanto, este fármaco não é facilmente absorvido pela via tópica (78).

O óleo de pequi, extraído do *Cayocar brasiliense* Camb (117), é rico em ácido oléico um conhecido promotor de absorção (30,110). A papaína é um agente proteolítico (122) aplicada principalmente no tratamento de lesões abertas de grande extensão, porém sua atividade como promotor de absorção ainda não foi estudada. Estas duas substâncias foram utilizadas visando aumentar a penetração do diclofenaco de sódio.

Os estudos de permeação envolvem o uso de metodologias *in vivo* e *in vitro*, utilizando diversas técnicas e tipos de membranas, como pele humana (23, 31, 33, 119), ou obtida de diferentes animais (3, 63, 84), membranas sintéticas (43) e artificiais (39).

OBJETIVO

Objetivo

Avaliar a penetração percutânea do diclofenaco de sódio, na presença de óleo de pequi e da papaína, de forma isolada ou em associação, utilizando-se uma formulação básica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Revisão Bibliográfica

A pele, o mais pesado dos órgãos do corpo humano, interage com as mucosas do trato respiratório, digestivo e urogenital, formando uma cápsula que separa a parte interna do corpo do ambiente externo. Esta estrutura flexível e auto regenerativa protege os fluídos internos e os tecidos vivos contra as variações de temperatura, umidade, radiação e poluição (10, 114).

Este tegumento não apenas protege fisicamente os órgãos internos e limita a passagem de substâncias, como também regula a temperatura e pressão sangüínea, agindo na transpiração e no sistema circulatório. A pele media as sensações do tato, dor, calor e frio, expressa a vermelhidão da raiva e embaraço, o suor da ansiedade e a palidez do medo, além de identificar as características do cabelo, textura, odor e cor particulares de cada indivíduo (10, 114). Este órgão ainda sintetiza e metaboliza substâncias, tendo como uma das suas funções secretar compostos orgânicos (13).

Como a pele é o mais acessível dos tecidos humanos, é facilmente danificada, tanto física, química ou biologicamente. Frequentemente é exposta a abrasões, radiações, solventes orgânicos, detergentes, resíduos químicos, poluentes e produtos potencialmente alergênicos, produzidos por bactérias, fungos, leveduras e plantas. Assim como cosméticos e produtos farmacêuticos de uso tópico, uma série de doenças podem afetar a pele (10, 114). Desta forma, para estudar a penetração de qualquer substância através da pele, deve-se conhecer sua anatomia, fisiologia e composição química.

1. Anatomia e Fisiologia da Pele

Anatomicamente a pele pode ser descrita como um órgão estratificado, com três tecidos distintos: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo (13, 15). O limite entre a epiderme e a derme não é regular, mas caracteriza-se pela presença de saliências e reentrâncias das duas camadas que imbricam e se ajustam entre si. As projeções da derme recebem o nome de *papilas dérmicas*. Na pele observam-se várias estruturas anexas, como os pêlos, as unhas e as glândulas (10).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

1.1. Epiderme

A epiderme, a mais externa das camadas da pele, tem espessura variável de acordo com a região do corpo, sendo mais espessa nas palmas das mãos e mais fina ao redor dos olhos. Apresenta-se estratificada, formando as seguintes camadas (10, 13, 15):

- **Camada basal:** Localiza-se na junção dermo-epidermal, apresentando intensa atividade mitótica, sendo responsável pela constante renovação da epiderme. Calcula-se que a epiderme humana se renove cada 20 a 30 dias.
- **Camada germinativa:** células nucleadas onde se observam alterações morfológicas e histoquímicas. Possuem pequenas expansões citoplasmáticas, as tonofibrilas que junto com os desmossomas tem importância fundamental na coesão das células da epiderme, e conseqüentemente na sua resistência ao atrito. Nesta camada estão os queratinócitos.
- **Camada granulosa:** composta por células poligonais, que apresentam núcleos centrais contendo grânulos de querato-hialina, precursores da queratina, presentes no citoplasma. Além destes grânulos, estas células secretam substâncias fosfolipídicas associadas a glicosaminoglicanos.

Estes grânulos são exsudados e formam uma camada de células, impedindo a passagem de compostos entre elas, inclusive a água.

- **Camada lúcida:** presente nas palmas das mãos e plantas dos pés. São regiões pobres em hialina, formando uma camada fina e translúcida logo acima do estrato granuloso. É composta por células achatadas, anucleadas.
- **Camada córnea (estrato córneo):** constitui a camada superficial da epiderme, cujas células estão em estado final de diferenciação. Representam uma região importante no controle da absorção cutânea de substâncias ativas. A permeabilidade seletiva desta estrutura apresenta-se como tema central em muitos aspectos efetivos de medicamentos tópicos. É nesta camada que ocorre o efeito reservatório, isto é, algumas substâncias, principalmente os corticostéroides, podem ficar retidas na forma de depósitos nesta região de epiderme. O estrato córneo é uma membrana complexa e heterogênea, composta por domínios morfológicamente distintos de proteínas e lipídeos. A parte protéica é constituída principalmente de filamentos de queratina intercelulares que estão interligados por ligações dissulfetos intermoleculares.

Caracteriza-se por ser levemente permeável à água e higroscópico, mais que outros materiais queratinosos, como o cabelo e as unhas. Quando imerso em água, isolado, absorve de 4 a 5 vezes seu peso. Sua função é ser a barreira que fornece proteção física e química. Retarda a perda de água dos tecidos inferiores, minimiza a penetração de luz ultravioleta e limita a entrada de microrganismos, substâncias ativas e tóxicas. O estrato córneo sofre constante abrasão, portanto costuma ser mais fino nas regiões mais expostas. A sua regeneração é promovida pela rápida divisão celular das células da camada basal da epiderme. Um filme ácido composto por lipídios emulsificados cobre a superfície do estrato córneo e apresenta pH em torno de 4,0 a 6,5 dependendo da área avaliada.

A epiderme apresenta ainda dois tipos de células como os **Melanócitos e as células de Langerhans**: Os melanócitos produzem um

pigmento chamado melanina. A cor da pele resulta de uma série de fatores, como a quantidade de melanina, caroteno, capilares e cor do sangue. Os melanócitos geralmente encontram-se nas camadas basal e germinativa da epiderme (10).

As células de Langerhans são os aferentes imunitários especializados da pele. Trata-se de células dendríticas com um núcleo lobular, citoplasma claro contendo grânulos característicos e retículo endoplasmático bem desenvolvido. São responsáveis pela resposta imunológica celular da pele (1, 10, 54).

1.2. Derme

A derme representa uma camada mais espessa que a epiderme, apresentando-se como uma estrutura gelificada envolvendo matrizes de proteínas fibrosas (75% de colágeno, 4% de elastina, 0,4% de reticulina e outras proteínas). Estas proteínas estão envolvidas por uma substância amorfa, coloidal e rica, os mucopolissacarídeos. Sua superfície externa é extremamente irregular, observando-se saliências que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme. A essas saliências dá-se o nome de papilas dérmicas, que têm como função aumentar a zona de contato derme-epiderme, conferindo maior resistência à pele. As papilas são mais freqüentes nas zonas sujeitas a pressões ou atritos.

Esta camada sustenta e interage com a epiderme, facilitando seu ajuste aos músculos e ossos. Vasos sangüíneos, linfáticos e nervos são encontrados na derme, e as fibras nervosas só alcançam a região germinativa da epiderme através desta (10, 13, 15).

1.3. Tecido subcutâneo

A hipoderme se espalha por todo o corpo como uma camada fibro-gordurosa, com exceção da região dos olhos e órgão genital masculino. Sua

espessura varia de acordo com a idade, sexo, estado endócrino e nutricional de cada indivíduo. A hipoderme atua como barreira térmica, proteção mecânica, local de síntese e depósito de energia para uso rápido (10).

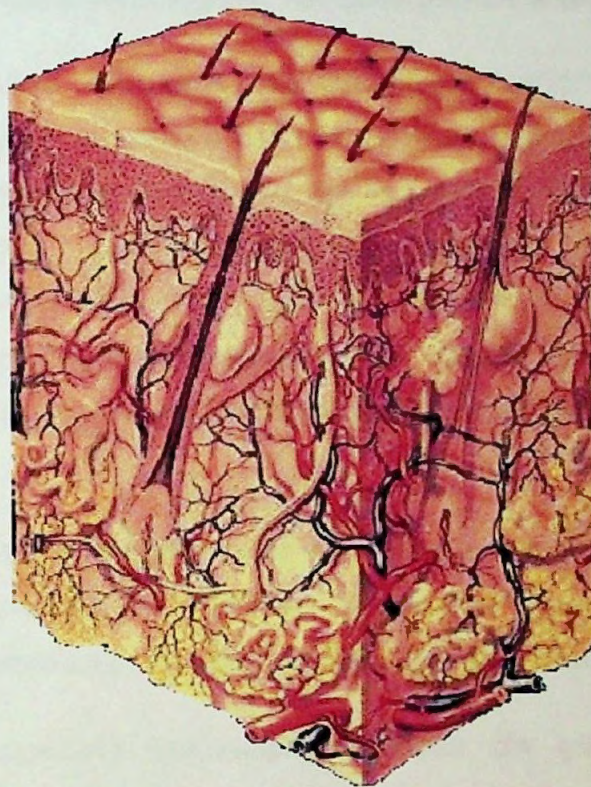


Figura 1. Camadas da pele, apêndices e sistema vascular.

1.4. Apêndices da pele

As regiões da derme e epiderme acomodam vários apêndices como glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos e unhas (10, 13, 15).

As **glândulas sebáceas** são maiores e numerosas na testa, face, superfície anogenital, orelhas e meio das costas, contrariamente das palmas das mãos e plantas dos pés. Estes anexos geralmente formam canais que desembocam nos folículos pilosos. Algumas glândulas abrem-se diretamente na superfície, como nos olhos, prepúcio e mamilos. O sebo é a substância de excreção destas glândulas, sendo formado pela completa desintegração da mistura de lipídeos, cuja concentração varia de espécie para espécie.

Glândulas sudoríparas são similares anatômica e funcionalmente, variando em tamanho e atividade, de acordo com a localização. São altamente vascularizadas e classificadas como apócrinas e écrinas:

- *Apócrinas*: secretam quantidade elevada de glicosaminoglicanos e proteínas. Desenvolvem-se durante a infância e são ativadas na puberdade.
- *Écrinas*: são glândulas secretoras, irrigadas por vasos sanguíneos, estendidos da derme até a superfície da epiderme. Tem como função regular a temperatura do organismo.

As glândulas sudoríparas e folículos pilosos saem da derme em direção a epiderme promovendo a descontinuidade em um tegumento antes uniforme.

Com exceção das palmas das mãos e solas dos pés, a pele humana possui glândulas sebáceas que secretam uma mistura de lipídeos. Nenhuma correlação foi encontrada entre o total de lipídeos na superfície da pele, a

composição destes e a hidratação do estrato córneo. Vale ressaltar que o sebo, por sua composição complexa, pode ser miscível com água e com os materiais sujeitos a penetração percutânea, polares e não polares. Estas evidências, acrescidas de outros estudos, levaram a conclusão que a presença de sebo é insignificante na absorção percutânea (10).

O pêlo é uma estrutura queratinizada morta, secretada por uma bolsa alongada derivada da epiderme, denominada de folículo piloso. O fundo da bolsa, formado pelo bulbo piloso escavado de uma papila dérmica, produz sem cessar células cujo empilhamento e cuja queratinização dão origem à haste pilar. Cada **folículo piloso** é circundado por sensores nervosos, cuja principal característica é a função sensorial (1).

As **unhas** podem ser também um meio de administração de substâncias ativas, principalmente se estas estiverem patologicamente afetadas. QUINTANAR-GUERREIRO e colaboradores (92), analisaram *in vitro*, os efeitos de agentes queratolíticos na permeabilidade de três antimicóticos imidazólicos através da unha humana, utilizando célula de difusão horizontal. Os resultados sugeriram que a unha constitui uma barreira impermeável para os antimicóticos estudados, agindo como uma membrana gel hidrofílica, através da qual as substâncias de baixa solubilidade não podem penetrar.

Embora a análise por microscopia eletrônica exploratória indicasse que as substâncias queratolíticas tiveram um efeito significativo na superfície da unha (papaína > ácido salicílico > uréia), não houve aumento da penetração dos três antimicóticos com o pré-tratamento feito com ácido salicílico sozinho ou apenas com a aplicação de uréia. Somente a associação da papaína com o ácido salicílico foi capaz de promover a permeação dos antimicóticos.

1.5. Vascularização e Inervação da Pele

Os vasos arteriais que suprem a pele formam dois plexos: um que se situa no limite entre a derme e a hipoderme e outro situado entre as camadas papilar e reticular. Deste último, partem finos vasos ramificados para as papilas dérmicas, sendo que cada papila tem uma única alça capilar, com um ramo arterial ascendente e um venoso descendente (1).

Distinguem-se três plexos venosos na pele: dois na posição descrita para as artérias e um na região média da derme. O sistema de vasos linfáticos inicia-se nas papilas dérmicas como tubos de fundo cego, que convergem para um plexo entre as camadas papilar e reticular e outro que converge para o plexo entre a derme e a hipoderme (1).

A pele tem como uma das suas funções mediar as sensações do meio ambiente, por isso é ricamente enervada. Contém nervos aferentes para as glândulas e músculos eretores e terminações nervosas livres com importante função táctil (1).

2. Transporte através da Pele

A pele é particularmente efetiva como barreira seletiva à penetração ou eliminação de diversos tipos de substâncias. Somente nos últimos anos, realizaram-se experimentos que correlacionaram as considerações físico-químicas e biológicas no intrincado processo de penetração (10).

Quando uma molécula se move através da pele intacta, tanto do ambiente externo, como em um veículo, primeiramente ocorre o contato com o sebo, restos celulares, bactérias e outros materiais exógenos que cobrem a pele (10).

Em geral, a molécula pode penetrar no tecido viável por três vias: através dos dutos sudoríparos e canais pilossebáceos (figura 2: rotas de

penetração 1 e 3, respectivamente) ou através do estrato córneo intato (figura 2: rota de penetração 2) seguindo duas vias distintas: intracelular ou intercelular (figura 3) (10). A presença de apêndices cutâneos significa que a epiderme age, em termos de difusão, como uma barreira paralela complexa (10).

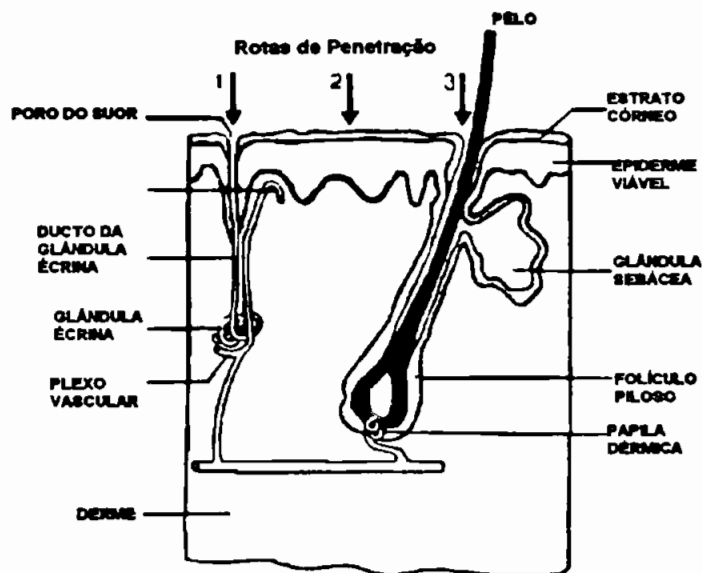


Figura 2. Possíveis rotas de penetração de substâncias na pele.

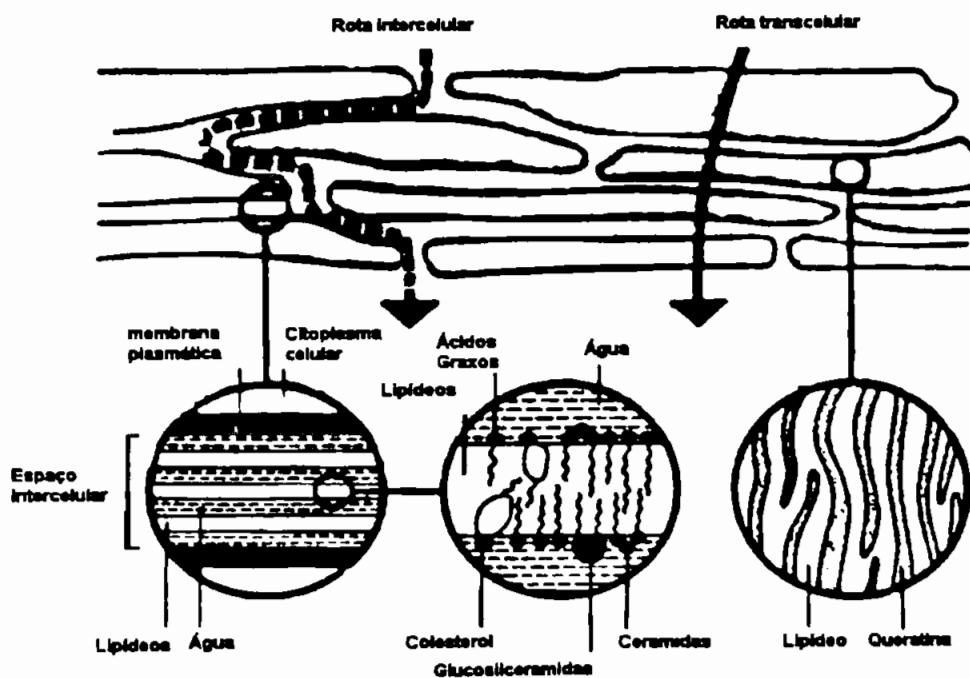


Figura 3. Transportes através do estrato córneo, via transcelular e intercelular.

2.1. Difusão transfolicular

Para moléculas grandes e eletrólitos com baixo coeficiente de difusão, a via alternativa de penetração através dos apêndices pode ser significativa. Estes apêndices podem ser a principal via de entrada através da pele sob as condições de fluxo constante e em trânsito. Assim que as moléculas passam pelo estrato córneo, penetram rapidamente através dos tecido vivos da epiderme e derme podendo atingir a circulação sistêmica (10).

Os apêndices da pele são geralmente negligenciados, já que não ocupam grande área em relação ao restante da pele, com cerca de 0,1% da superfície total. No entanto, existem evidências de que a rota transfolicular tem relativa importância na absorção de alguns compostos ativos (97).

Para o tratamento de algumas patologias, ligadas a estruturas pilossebáceas, pode ser muito importante aumentar esta rota, já que geralmente as substâncias ativas são absorvidas via transepidermal. Em 1993, ROLLAND e colaboradores (97), estudaram o uso de adapalene ligado a microesferas poliméricas, com o objetivo de melhorar a terapêutica destinada ao tratamento da acne.

2.2. Difusão no estrato córneo

O estrato córneo dos mamíferos é composto por células ricas em proteínas embebidas em uma matriz lipídica, em um modelo semelhante a "tijolos e cimento" ou "muro". Uma visão mais sofisticada do estrato córneo foi sugerida mostrando os queratinócitos, células compostas principalmente por queratina, circundados por um domínio lipídico multilamelar e tridimensional. Evidências também demonstraram que colesterol e lipídeos de cadeia longa saturada, como os ácidos graxos livres e ceramidas, predominam no estrato córneo (40).

Em 1983, BARRY (10) definiu que a difusão intracelular ocorre porque a queratina intracelular forma um mosaico de regiões polares e não polares, na qual as substâncias se dissolvem e difundem no estrato córneo, de acordo com a sua afinidade química. Já que este tecido é morto a difusão é um processo passivo governado por leis físico-químicas, portanto os transportes ativos não têm ação. O estrato córneo é uma membrana fina, resistente, relativamente impermeável, que quase sempre promove o passo limitante no processo da absorção percutânea. Ele, de forma integral, promove a principal resistência a difusão. Esta membrana não facilita a passagem de nenhuma molécula, mas quase todas penetram um pouco. Entretanto, um estudo do estrato córneo utilizando calorimetria exploratória diferencial (DSC), verificou que na realidade, o transporte de substâncias através da pele ocorre principalmente pela via intercelular (40).

De acordo com as observações acima, deduzimos que a penetração não acontece através dos apêndices ou pela via intracelular, mas principalmente por meio da via intercelular, ou seja, através da matriz lipídica (10).

Para materiais absorvidos pela pele, o processo é uma seqüência de deposição no estrato córneo, difusão através dele e da epiderme viva e passagem através da parte superior da derme papilar. Os tecidos viáveis podem metabolizar os fármacos, particularmente a epiderme, que contém a maioria das enzimas catabólicas que podem inativar uma substância ou ativar um pró-fármaco. A camada papilar possui muitos capilares permeáveis, sendo muito provável que a maioria das moléculas entrem na microcirculação assim que deixam a epiderme (10).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

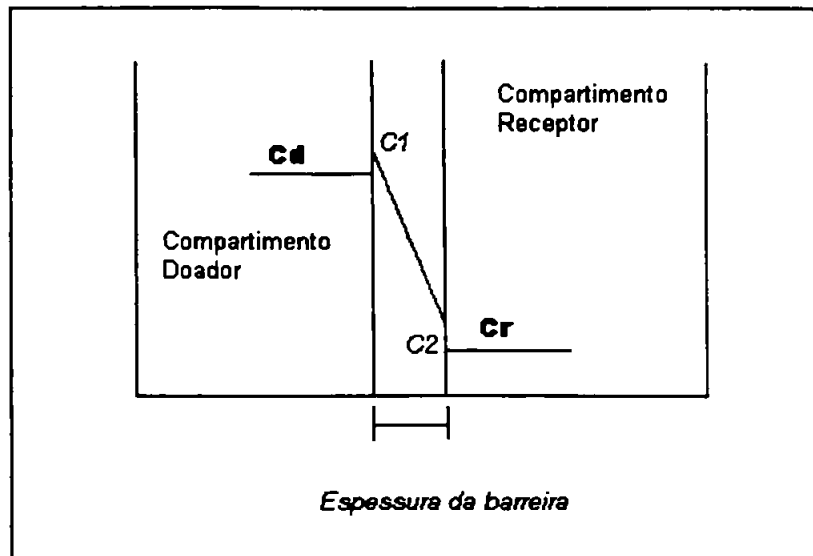
3. Princípios básicos da difusão

A difusão, de uma ou mais substâncias através da pele, representa um tipo de transporte em membranas parcialmente permeáveis e seletivas. Em geral, é um processo de difusão passiva, onde a matéria se move de uma região do sistema para outra, com gradiente de concentração mais baixo, seguindo um movimento molecular, como podemos observar na figura 4 (15, 68).

As Leis de Fick são geralmente vistas como a descrição matemática do processo de difusão. São rotineiramente usadas em dados obtidos a partir da permeação percutânea, para o cálculo das quantidades que permeiam passivamente através de uma ou mais camadas da pele.

Assim a permeabilidade no estrato córneo obedece a estas leis, que preconizam que a concentração eficaz é determinada pela diferença de concentração entre duas faces da membrana. É o que ocorre para as substâncias presentes no organismo em uma concentração inferior à quantidade aplicada sobre a pele (68).

As leis de Fick incluem o coeficiente de difusão que pode criar um gradiente de concentração linear do permeante no estrato córneo. Porém, estes gradientes não são lineares de fato e podem, interferir no coeficiente de difusão do estrato córneo *in vivo*, em particular o coeficiente de permeabilidade que decresce com o aumento da espessura da membrana.



C_d = concentração do fármaco no compartimento doador; C_1 = concentração inicial do fármaco na membrana; C_2 = concentração final do fármaco na membrana; C_r = concentração do fármaco no compartimento receptor.

Figura 4. Transporte por difusão passiva - Lei de Fick (68).

O coeficiente de partição é a relação das solubilidades das substâncias na membrana e no solvente. Com efeito, a penetração através de uma membrana, implica na dissolução desta substância em outro meio. O coeficiente de difusão é simplesmente a facilidade de passagem da substância através das estruturas ou moléculas da membrana (1, 68).

A difusão, no que concerne o estrato córneo, ocorre seguindo três processos simples (68, 95):

- A partícula, molécula ou íon deve passar através do veículo ou compartimento doador, para a superfície do estrato córneo;
- O segundo passo, a passagem através do estrato córneo, é controlada pelo coeficiente de distribuição (K) ou partição;
- O terceiro passo, a difusão permeante através do estrato córneo, é geralmente o passo determinante como demonstram extensivamente os estudos experimentais da permeação cutânea.

Para que ocorra a passagem a partir do solvente (veículo) para a pele, a molécula de soluto difusora deve ter alguma afinidade pelo estrato córneo. Uma vez a molécula concentrada na membrana, ela poderá se difundir em várias direções, porém não casualmente, pois o permeante tende a se mover de concentrações mais elevadas para mais baixas.

Baseando-se no conceito de fluxo de calor, desenvolvido por Count Bertholet a quase 200 anos atrás, Fick correlacionou "a difusão como sendo o fluxo (J) através da membrana", denominando-a como sua Primeira Lei.

O fluxo (J) é a diferença de concentrações (ΔC) entre os lados da membrana, sendo a quantidade de massa (m) que atravessa uma área (S) na unidade de tempo (t).

$$J = \frac{dm}{Sdt}$$

A constante de proporcionalidade foi definida como o coeficiente de permeabilidade (P), que inclui o coeficiente de difusão diferencial (D) e o coeficiente de partição (K),

$$J = \frac{dC}{de} \quad \text{ou} \quad J = P\Delta C = \frac{KD\Delta C}{e}$$

A unidade de J é moles/cm²s ou $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$, o que exprime o significado físico, portanto J é a quantidade de soluto que passa através da unidade de área da membrana em uma unidade de tempo. Para que qualquer fluxo mensurável ocorra, as moléculas de soluto devem primeiramente entrar no estrato córneo o qual depende do coeficiente de partição (K). A seguir, o soluto deve se concentrar no estrato córneo e começar o processo de difusão tempo-dependente controlado por um coeficiente de difusão (D) até que as moléculas do soluto alcancem a fronteira entre o estrato córneo e a epiderme viável.

Assim, a penetração percutânea, isto é a passagem através da pele, envolve a dissolução do fármaco no seu veículo; a difusão deste solubilizado (soluto) do veículo para a superfície da pele e a penetração através das camadas da pele, principalmente o estrato córneo. Esta é, a passagem mais lenta e, portanto, o fator limitante do controle da penetração (15, 68).

A constante de permeabilidade da água na pele é de $1,0 \times 10^{-3}$ cm/h e a de difusão é de $2,8 \times 10^{-10}$ cm²/seg. A penetração da água no estrato córneo altera a barreira apenas levemente, principalmente por seu efeito nos poros da pele. O estrato córneo é definido como um filme denso e homogêneo. As substâncias se difundem através desta barreira muito lentamente, sendo na maioria dos casos intercelular, além de ocorrer através das células, poros sebáceos ou ductos sudoríparos. Mesmo o estrato córneo estando normal e hidratado, este é considerado a membrana biológica mais impermeável do organismo. Não se pode simplificar e afirmar que uma rota se sobrepõe a outra em todas as condições (10).

Estudos feitos com DSC e espectroscopia com infravermelho mostraram as várias regiões da pele. Domínios distintos das proteínas e lípidios aparentam ter ação na penetração de substâncias ativas no estrato córneo. A ação de um soluto pode depender das características das proteínas da região, da disposição dos lípidios ou da combinação destes fatores no estrato córneo, além da lipofilicidade do soluto. O conteúdo lipídico do estrato córneo pode ser importante na ação de solutos lipofílicos, mas não está envolvido na atividade de substâncias ativas hidrofílicas (68).

A pele funciona como uma barreira passiva para as moléculas difusoras. Evidências mostram que a impermeabilidade da pele persiste mesmo após a sua extração, o que permite o estudo da permeabilidade cutânea "in vitro", sendo a Lei de Fick obedecida na maioria dos casos (85, 86).

A difusão do fármaco na barreira da pele pode ser influenciada pelos componentes dos veículos, principalmente solventes e tensoativos, um ótimo

coeficiente de partição pode ser obtido pela alteração da afinidade do veículo pelo fármaco.

Dentre os fatores que influenciam a absorção podemos destacar alguns pontos:

- O fármaco deve estar dissolvido no veículo;
- A mistura de solventes deve manter um coeficiente de partição favorável, assim o fármaco fica dissolvido no veículo e apresentando grande afinidade pela pele na qual penetra;
- Os componentes do veículo devem favorecer a permeabilidade no estrato córneo;
- Nos estudos de permeabilidade cutânea é importante que a substância ativa seja absorvida, mas que nem todos os componentes da formulação o sejam. É o caso dos adjuvantes farmacêuticos, como por exemplo, conservantes, antioxidantes, agentes antimicrobianos, corantes e solubilizantes. Estes devem idealmente permanecer na superfície da pele assim como o veículo.

O estrato córneo pode ser visto como uma membrana de difusão passiva, mas não como um sistema inerte. Ele freqüentemente tem uma afinidade pelas substâncias aplicadas. A adsorção isotérmica é freqüentemente linear em níveis de concentração diluídos. A correlação entre as concentrações externas e de superfície são dadas nos termos do coeficiente de distribuição do solvente na membrana.

O estrato córneo hidratado tem uma afinidade tanto por compostos hidrofílicos quanto lipofílicos. Esta solubilidade bifuncional ocorre a partir da ultra-estrutura da matriz filamentosa da queratina, onde regiões aquosas e lipídicas coexistem (68).

Quanto aos aspectos dinâmicos da absorção, no começo da penetração, antes que se instale o estado de fluxo constante, a

permeabilidade obedece a uma lei exponencial, cuja equação foi calculada por Scheuplein. Esta fase é mais rápida quanto mais elevado é o coeficiente de difusão. Um exemplo é a cortisona, o coeficiente de difusão dura cinco dias e meio, ao passo que para a hidrocortisona, cuja difusão é mais lenta em razão do grupamento hidrófilo em C11, este dura 21 dias (1).

Após a aplicação de uma única dose, o fluxo aumenta, passa por um pico máximo e depois decresce. O valor máximo e o tempo no qual ele ocorre podem ser calculados, quando se conhecem a concentração do produto aplicado, seu coeficiente de difusão e a espessura da barreira (1).

Estudos das quantidades de uma substância amostrada em função do tempo com fluxo, em um estudo de permeação cutânea *in vitro*, mostram um período de tempo com fluxo variável, seguido de período indefinido de fluxo constante, figura 5 (68). Ao primeiro designa-se tempo de latência, LagTime, período requerido para um penetrante estabelecer um gradiente de concentração uniforme com a membrana que separa o compartimento doador do receptor (1).

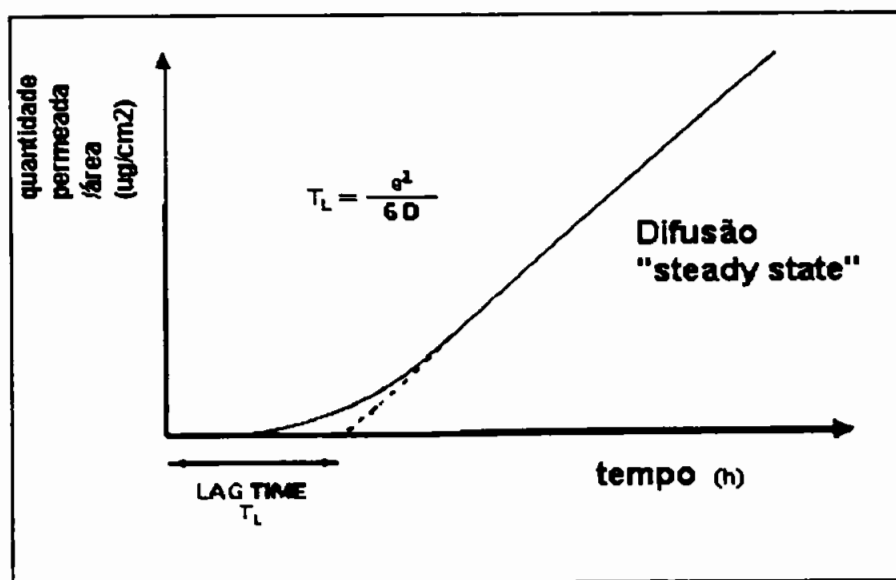


Figura 5. Representação gráfica do LagTime (1).

Para algumas substâncias ocorre o efeito reservatório, onde após a sua aplicação tópica podem ser formados depósitos no estrato córneo. Lavagens repetidas com água, com sabão, ou mesmo solventes orgânicos como éter, não conseguem impedir a formação do efeito reservatório. Sua explicação se encontra mais uma vez na lei de Fick. O efeito reservatório ocorre apenas para substâncias que tem forte afinidade pelo estrato córneo (K elevado), porém que se difundem lentamente (D baixo). Pode-se suprimir este efeito hiperidratando o estrato córneo, na primeira aplicação, assim a substância atravessa rapidamente, sem ocorrer acúmulo (1).

4. Propriedades que influenciam a absorção percutânea

4.1. Fatores biológicos

4.1.1. Pele

Para determinar o efeito percutâneo de um fármaco o melhor modelo é o homem. Porém, existe a dificuldade da obtenção deste tipo de pele. Como alternativa, muitos pesquisadores tem usado pele animal como membrana. Embora esta não tenha uma permeabilidade idêntica à da pele humana, é usada para estudos de permeação, devido à facilidade de obtenção e possibilidade do uso de animais isogênicos.

A permeabilidade varia não apenas de espécie para espécie, mas também, com a idade e sítio anatômico (91). As mudanças anatômicas e fisiológicas atribuídas ao envelhecimento podem afetar a função barreira. Entretanto, não existe como diferenciar as mudanças relacionadas com o envelhecimento cronológico (recém nascido a adulto); do envelhecimento atribuído a influência do ambiente (exposição solar crônica, frio, vento, baixa umidade, exposição química ou trauma mecânico); e mesmo de doenças ou mudanças hormonais relacionadas à menopausa (29, 73).

A pele envelhecida apresenta-se geralmente como enrugada e seca, no entanto ocorrem mudanças em diferentes períodos da vida que apresentam magnitudes variáveis em indivíduos da mesma idade. Alterações na pele exposta, como testa, face, pescoço e costas das mãos, podem ocorrer por volta dos 20 anos, mas nas áreas protegidas pelo vestuário, ocorre gradualmente com o aumento da idade. Em ambos os casos as alterações se caracterizam por um "aplainamento" progressivo da complexa estrutura inferior da epiderme (72).

A arquitetura básica do tegumento é similar em todos os mamíferos. No entanto, diferenças estruturais no arranjo e na densidade dos folículos pilosos existem entre humanos e animais. A densidade pilosa em humanos e porcos é esparsa se comparado com os roedores. A pele dorsal do porco e do abdômen humano tem 11 ± 1 folículos pilosos por cm^2 , em comparação o dorso do rato tem 289 ± 21 , o camundongo 658 ± 38 e o camundongo sem pelo 75 ± 6 (24).

Uma das causas da diferença de permeabilidade entre a pele humana e animal pode ser a quantidade de apêndices como os folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas (24). O quadro abaixo (figura 6) pode nos dar uma idéia.

Espécies	Local da pele	Número de folículos/cm^2	Diâmetro dos folículos(μm)
HUMANA	abdômen	11 ± 1	97 ± 3
PORCO	dorsal	11 ± 1	177 ± 4
RATOS	dorsal	289 ± 21	25 ± 1
CAMUNDONGOS	dorsal	658 ± 38	26 ± 1
CAMUNDONGOS SEM PÊLOS	dorsal	75 ± 6	46 ± 1

Figura 6. Densidade e tamanho dos folículos pilosos em 5 tipos de pele (24).

Os mais variados tipos de peles animais para os estudos de permeação cutânea são utilizados pelos pesquisadores. O cobaia sem pêlos

foi utilizado para estudos de metabolismo cutâneo da benzocaína (59). Neste mesmo tipo de membrana, KITAGAWA e colaboradores (55) verificaram a atividade do L-mentol como promotor de absorção para o ácido benzóico.

A pele de coelho, apesar de ser comprovadamente mais permeável que a pele humana, foi utilizada por NAITO e TSAI (76) e NIAZY (77). Os primeiros estudaram a liberação de indometacina de bases cremosas e o segundo verificou a influência do ácido oléico e outros promotores de absorção sobre a passagem transdérmica de diidroergotamina. Em 1998, WU e colaboradores (128) estudaram a permeabilidade do captopril a partir de veículos de celulose hidrofílica através da pele de coelho e da pele humana. Os testes preliminares foram realizados com pele de coelho, para otimização da melhor formulação, para então serem estudados em pele humana.

A pele de rato é mais utilizada para tais estudos, PORZIO e colaboradores (90) o utilizaram *in vivo* e *in vitro* para testar uma nova formulação tópica na forma de gel-spray. Enquanto SEKI e colaboradores (110) somente *in vivo* para estudar a absorção percutânea da azidotimidina. No estudo de metabolismo cutâneo, BANDO e colaboradores (7) utilizaram este tipo de pele na pesquisa de fármacos lipofílicos. Também foram analisados os efeitos dos derivados de pirrolidona, como promotores de absorção, usando a pele de rato albino como membrana (106, 107). Em 1997, ROPER e colaboradores (98), compararam a permeação do 2-fenoxietanol, um conservante usado em fórmulas cosméticas, utilizando as peles de ratos e humanos como membranas. Comprovaram que ambas oferecem o mesmo perfil de absorção em relação a substância utilizada, além de confirmarem os resultados obtidos *in vivo*.

Porém, o modelo de pele animal freqüentemente empregado para os estudos de permeação é do camundongo sem pêlo. Assim, estudos sobre co-solventes (48), efeitos dos tensoativos não iônicos (25, 105), ação de diferentes ácidos graxos (35), estudos sobre dependência de concentração

dos promotores de absorção (27) foram realizados utilizando-se a pele de camundongo sem pêlo *in vitro*. Já TSAI e colaboradores (120) o usaram *in vivo* para o estudo sobre a inibição da síntese de lipídeos abordando o metabolismo da pele.

OKAMOTO e colaboradores (84) estudaram os efeitos do veículo e de promotor de penetração sobre a penetração percutânea do aciclovir, utilizando peles de camundongo sem pêlo e de ratos. Desta forma, estudaram os parâmetros que alteram as características da penetração percutânea.

O porco, principalmente jovem, também foi utilizado como modelo de membrana para estudos de permeação *in vitro* e *in vivo* devido a sua semelhança com a pele humana em termos de metabolismo e densidade de folículos pilosos, como referido anteriormente. REIFENRATH e colaboradores (94), utilizaram esta pele para verificar a retenção de compostos aplicados na mesma.

Uma outra alternativa em relação a peles animais, é o uso de muda da pele de cobra que foi testada por KURAMOTO e colaboradores (60). O emprego deste modelo de membrana, para estudos pré-clínicos para fármacos transdérmicos, foi determinado utilizando-se indometacina e álcoois graxos como permeantes.

Estudos comparativos entre peles de diversos animais, como pele de cobra com e sem escamas, pele de sapo, de camundongo sem pêlo, de rato, de porco, de humanos (prepúcio e coxa) além de uma membrana artificial foram conduzidos por LIN e colaboradores (63). Os pesquisadores concluíram que as peles de cobra, de porco e de prepúcio, seriam as mais indicadas para os estudos de permeação cutânea de fármacos *in vitro*, já que estas apresentaram um menor fluxo em um mesmo espaço de tempo, representando assim o passo limitante da absorção que é o papel do estrato córneo (63).

Nesta mesma linha de pesquisa, FANG e colaboradores (36) estudaram a capsaicina utilizando pele humana, de rato, de coelho, de porco Yorkshire, e de dois tipos de camundongos além da membrana artificial. Concluíram que a pele de porco é a que mais se assemelha a pele humana em relação a fluxo de substâncias ativas através da pele.

No trabalho realizado por BOND e BARRY (16), foi comprovado que a pele de camundongo sem pêlo não é indicado como modelo de estudo para permeação percutânea. Verificou-se que a super-hidratação altera drasticamente o estrato córneo fornecendo dados irreais para os experimentos, o mesmo não ocorrendo com a pele humana sob as mesmas condições.

Em 1989, PRIBORSKY E MÜHLBACHOVÁ (91) compararam a pele de rato e a pele humana usando diversos promotores de absorção, comprovando que a permeabilidade cutânea alcançada em algumas espécies animais nem sempre significa eficiência na pele humana.

Para minimizar este problema, os pesquisadores começaram a utilizar pele humana retirada de cadáver. COOPER (30) em 1984 já testava o aumento da permeabilidade da pele devido a moléculas lipofílicas, usando pele abdominal de cadáver. Em 1989, WILLIAMS e BARRY (127) estudaram os análogos da uréia como promotores de absorção, utilizando como membrana pele humana obtida "post-mortem". A via transdérmica de buprenorfina, um agonista opióide sintético, foi estudada por ROY e colaboradores (99) utilizando também a pele obtida do abdômen e parte superior da coxa de cadáveres. HEWITT e colaboradores (47) estudaram o efeito de doses múltiplas na permeação cutânea utilizando também este tipo de membrana.

Não apenas os fármacos podem ser estudados, WALTERS e colaboradores (124) verificaram a penetração de N-nitrosaminas, contaminantes de formulações cosméticas, utilizando a pele de cadáver como membrana.

O desenvolvimento de novas técnicas, onde pretendê-se construir modelos que imitem a pele humana, tem sido muito explorado nestes últimos anos (39).

Na tentativa de encontrarem alternativas para minimizar os problemas de obtenção da pele, REGNIER e colaboradores (93), propuseram o uso de uma pele reconstruída como membrana no estudo de permeação cutânea. Esta seria composta por células basais de formato cubóide com antígenos penfigóides polarizados no lado basal. As células suprabasais, compostas de quatro a seis camadas de células granulares nas camadas superiores e um estrato córneo compacto multilamelar. Esta epiderme foi reconstruída em uma derme sem epiderme sendo os queratinócitos humanos, adultos mantidos na interface ar-líquido.

A permeabilidade intrínseca da função barreira foi analisada pela medida da absorção percutânea de água, ácido benzóico, testosterona e hidrocortisona. O estudo comprovou uma maior permeabilidade desta epiderme reconstruída em relação a pele humana, e que esta diferença aumenta conforme a lipofilicidade dos compostos testados. Os autores reconhecem que para o uso em estudos percutâneos e transdérmicos, estudos futuros serão necessários para o aprimoramento da técnica deste tipo de membrana (93).

GODWIN e colaboradores (39), desenvolveram uma pele artificial, constituída de uma camada dérmica contendo fibroblastos humanos dispersos em uma matriz de colágeno e uma camada epidérmica de queratinócitos humanos diferenciados e estratificados. Foi realizado um estudo comparativo, entre pele artificial e peles de cadáver humano e de ratos sem pêlo. Concluiu-se que a pele alternativa ainda não pode ser considerada aceita como modelo para a pesquisa de transdérmicos e formulações tópicas, pois a permeabilidade mostrou ser 2 a 3 vezes maior que a pele de cadáver humano. Em um futuro próximo, com o desenvolvimento e aperfeiçoamento a pele artificial poderá substituir a pele

humana e mesmo os modelos animais nas pesquisas que envolvem permeação cutânea.

O uso de membranas sintéticas, geralmente compostas de silicone ou celulose, é uma estratégia usada pelos pesquisadores para determinar a influência da pele sobre o fluxo e a permeação de um fármaco estudado. Já em 1986, HADGRAFT e colaboradores (43) compararam uma membrana artificial de celulose com a pele humana obtida de cadáver.

Em 1996, uma membrana de silicone tratada com etanol foi utilizada por MAITANI e colaboradores (66) para o estudo de permeação de diclofenaco sódico usando-se alguns promotores de absorção. No mesmo ano, KENNEDY e colaboradores (53), compararam a permeabilidade dos lipídeos do estrato córneo de culturas de queratinócitos ar-líquido da epiderme humana com os do estrato córneo humano, concluindo que devido à complexa estrutura organizacional e conformacional, a permeabilidade sozinha não é suficientemente sensível para definir equivalência entre a cultura de células e o estrato córneo humano.

ROLLAND e colaboradores (96) utilizaram uma membrana de borracha siliconizada não porosa (Silastic 500-1, 130 μ m de espessura, Dow Corning, França) para determinar a influência da formulação, do fluido receptor e oclusão nos estudos de permeabilidade *in vitro*.

Foram estudadas por YAMAGUSHI e colaboradores (129) membranas poliméricas que possuíam ambos os domínios, lipofílico e hidrofílico. Entre as membranas estudadas selecionou-se uma, que era composta de 2% polidimetil siloxane (região lipofílica) e 8% de poli 2-hidroximetacrilato (região hidrofílica). Esta foi comparada com a pele humana e a pele de rato. Concluíram que apesar da permeabilidade desta membrana artificial ser mais elevada em relação as outras duas peles, esta pode ser útil na realização dos testes preliminares para as substâncias ativas pretendentes ao sistema transdérmico.

Atualmente há tendência de se usar pele humana obtida de cirurgia plástica, tanto pela fácil obtenção quanto pela maior reprodutibilidade das condições reais do organismo. Para tanto, exige-se a correta e adequada estocagem, a fim de se manter a viabilidade da pele.

Segundo o trabalho realizado por WESTER e colaboradores (125) comprovou-se que a pele humana mantém-se viável por 8 dias sem danos à sua integridade, inclusive metabólica, se armazenada em meio de cultura que contenha aminoácidos e sais minerais balanceados. Portanto é possível, inclusive, estudar *in vitro* o metabolismo de certos fármacos na pele. Um estudo comparativo sobre a penetração transdérmica de fármacos antiinflamatórios não esteroidais foi realizado por CORDERO e colaboradores (31) em 1997 sendo utilizada a pele abdominal obtida por cirurgia plástica. DI COLO e colaboradores (33) também utilizaram pele humana obtida de cirurgia plástica. Esta mesma pele foi utilizada por TREFFEL e GABARD (119), para estudo de penetração cutânea e proteção solar de filtros ultravioleta.

A preparação da membrana de forma adequada para os estudos de penetração percutânea, tanto de pele animal quanto de pele humana, é um ponto que requer especial atenção, já que a absorção cutânea é um processo de difusão passiva. A espessura desta membrana deve ser cuidadosamente verificada, para obter-se resultados confiáveis (23). O uso de dermatômetro é indicado para garantir a espessura requerida. Em relação ao camundongo sem pêlo, a pele é utilizada sem a necessidade da retirada da derme, já esta e a epiderme apresentam-se muito delgadas.

Geralmente uma camada de 200 μ m contém toda a epiderme e a camada superior papilar da derme (23). Porém esta membrana pode ser de difícil obtenção, assim os experimentos podem variar muito quanto à espessura.

É interessante notar que apesar do grande número de experimento sobre a absorção percutânea, existem poucos estudos sobre a permeação em peles danificadas ou na derme. Estes estudos são feitos geralmente em

pele aquecida a 60°C, "tape stripping", depilação e abrasão com agulhas hipodérmicas, além de alguns trabalhos com peles de recém-nascidos onde o estrato córneo não está totalmente formado.

WALKER e colaboradores (123), utilizaram tecido danificado, obtido de lesões como a úlcera de perna, onde não existe uma barreira epidérmica, e onde ocorre pouca re-epitelização devido à ação das proteinases que degradam o tecido. Foi também utilizada a pele que fica ao redor destas ulcerações. Foram feitas comparações entre peles humana, de porco e de cobaio, intacta e deteriorada. Concluíram que a pele de porco, a pele intacta e as membranas dérmicas podem ser consideradas adequados representantes de modelos para estudos *in vitro* de substâncias tóxicas, tanto em pele humana quanto em tecidos ulcerado, respectivamente.

O estudo é interessante já que abre possibilidades para comparar peles, que apresentam diferentes permeabilidades, tais como a pele envelhecida, danificada e mesmo a pele de recém-nascidos.

4.1.2. Metabolismo da pele

A biotransformação de compostos absorvidos pela pele, usualmente produz metabólitos inativos, mas algumas vezes pode produzir formas ativas (10). A atividade metabólica na epiderme é mais ativa do que na derme, sugerindo que a atividade enzimática nesta camada é mais intensa (15). Devido a biotransformação do fármaco que ocorre durante a absorção cutânea é possível o uso de pró-fármacos e pró-promotores que facilitem a penetração na camada córnea resultando em efeito sistêmico (8, 42).

O termo pró-fármaco foi primeiramente introduzido em 1958, para descrever compostos cuja biotransformação é necessária para a obtenção dos seus efeitos farmacológicos. O uso deste termo foi estendido para incluir compostos que sofrem transformações tanto químicas quanto biológicas, mas o conceito permaneceu o mesmo (116).

A formação de um pró-fármaco se dá pela modificação química de um composto biológico ativo para a formação de uma nova entidade química que por si só é inativa, mas que é regenerada *in vivo* formando novamente o composto do qual é derivada (4).

O efeito terapêutico de um fármaco, seguido de sua aplicação na pele, depende principalmente de sua capacidade de penetrar e atingir o sítio de ação desejado. Uma das estratégias de conseguir esta permeação efetiva é a utilização de pró-fármacos (42). No caso do uso deste tipo de substância, sua função esta completa quando ela alcança a epiderme viável e atinge sítio acessível para que ocorra a bioconversão (4).

Um pró-fármaco ideal para esta finalidade deve exibir as seguintes características: estabilidade adequada para que sua formulação em veículos seja possível; conversão enzimática controlada ao fármaco efetivo no tecido viável; solubilidade lipófila e hidrófila aumentada (42).

Em 1990, SHERERTZ e colaboradores (115) compararam a administração transdérmica do 5-fluorouracil através da pele de camundongo sem pêlo e de pele humano, variando a formulação e utilizando também o pró-fármaco desta substância. Constataram que o pró-fármaco é mais permeável que o fármaco em si.

A efetividade da combinação de pró-fármaco com promotor de absorção no aumento da permeação cutânea foi estudada por BANDO e colaboradores (8) usando o aciclovir e seu pró-fármaco lipófilo, o butirato de aciclovir. Como promotor de absorção foi utilizado o 1-geranilazacicloheptano-2-ona (GACH) que não demonstrou aumentar a penetração do aciclovir, porém que promoveu um extensivo efeito na penetração de seu pró-fármaco. Entretanto, seriam necessários estudos *in vivo* para verificação deste pró-fármaco na pele para então otimizar seu promotor de absorção.

Foram sintetizados ésteres de indometacina, um potente antiinflamatório lipófilo, cuja aplicação é limitada devido a baixa

permeabilidade cutânea (132), e testados em ensaios *in vivo* e *in vitro*, para determinação de sua utilidade como pró-fármacos. BONINA e colaboradores (17) concluíram que estes ésteres demonstraram boa atividade quando comparados com o fármaco original.

AHMED e colaboradores (2) verificaram a hidrólise esteraseletiva e a penetração de dois pró-fármacos do propranolol utilizando a pele de camundongo sem pêlo em estudos *in vitro*. O cloridrato de propranolol é hidrófilo e atravessa a pele em baixas quantidades. Foram também objetivos deste estudo esclarecer a atividade da hidrólise esteraseletiva, localizar as esterasas e estudar a irritação cutânea.

A buprenorfina, opióide agonista-antagonista sintético, é um possível candidato a aplicação transdérmica, porém sua alta cristalização dificulta a permeação. ROY e colaboradores (99) estudaram a possibilidade de utilização de seu sal hidrocloreídrico como solução para este problema. IMOTO e colaboradores (51) estudaram o uso dos alquil-ésteres da buprenorfina como possíveis pró-fármacos e a influência dos veículos na permeação destes, utilizando a pele de camundongo sem pêlo, visando a construção de um sistema transdérmico.

Em 1998, ARIMA e colaboradores (6) concluíram que a hidroxipropil- β -ciclodextrina aumenta a penetração do acetato de etil 4-bifenilil, pró-fármaco do ácido 4-bifenilil acético, um antiinflamatório não esteroide, aumentando a atividade termodinâmica do pró-fármaco no veículo hidrófilo.

O Hormônio Liberador de Tirotropina (TRH), é um neuropeptídeo com estrutura primária, que estimula a pituitária a liberar o Hormônio Estimulador da Tireóide (TSH) e prolactina. Esta substância desperta interesse atualmente, não apenas por suas características endócrinas, mas sim porque atuam no Sistema Nervoso Central em distúrbios como o Mal de Alzheimer. O estudo de um sistema transdérmico para administração destes fármacos ou de seus pró-fármacos é atrativo já que estas substâncias sofrem considerável ação enzimática antes de chegar ao seu sítio de ação, quando administrada pela via sistêmica. Em 1999, MAGNUSSON e RUNN

(64), realizaram estudos tentando conseguir viabilizar este sistema. Concluíram que o pró-fármaco na presença de promotor de absorção apresenta fluxo e permeabilidade compatíveis com os requisitos para desenvolvimento de tais sistemas.

Como anteriormente descrito, a pele possui uma significativa ação enzimática, podendo ocorrer inibição ou indução de enzimas, por esta razão algumas substâncias ativas aplicadas topicamente são metabolizadas durante sua passagem através da pele (7).

A conversão do peróxido de benzoíla a ácido benzóico é um exemplo da importância do metabolismo da pele na degradação das substâncias à compostos inativos, antes que estas cheguem ao sistema circulatório (69). Por outro lado, deve-se acrescentar a importância dos microrganismos que vivem na pele e que também participam da conversão de alguns xenobióticos, como a nitroglicerina e a betametasona (69).

TSAI e colaboradores (120) investigaram a ação de alguns inibidores da síntese de lipídeos, para aumentar a penetração transdérmica de cafeína ou lidocaína. A mudança no metabolismo da barreira estrato córneo em conjunto com o uso de promotores químicos foi uma nova tentativa de aumentar a permeação de fármacos.

Seguindo o mesmo esquema, KRAELING e colaboradores (59), estudaram o efeito da dose e da inibição enzimática na absorção percutânea e no metabolismo da benzocaína. O estudo conduzido *in vitro*, utilizando cobaia sem pêlo, conclui que a atividade enzimática não só influi na permeação deste fármaco, como a pele possui um significativo efeito no metabolismo pré-sistêmico para doses terapêuticas da benzocaina, transformando-a em acetilbenzocaína, metabólito com atividade biológica.

BANDO e colaboradores (7) estudaram os efeitos do metabolismo da pele na penetração percutânea de substâncias lipofílicas, concluindo a ocorrência de uma hidrólise enzimática desta substância. Portanto, o metabolismo na pele afeta não somente a relação entre a quantidade de

metabólitos e o total penetrado, mas também o total que penetra na pele no caso de fármacos altamente lipofílicos. Assim quanto mais alta a constante de metabólitos, maior é o total de fármaco que penetra a pele.

4.1.3. Efeitos circulatórios

A maioria das pesquisas em farmacologia, dermatologia e cirurgia reconstrutiva têm sido realizadas em animais. É importante compreender as diferenças anatômicas e fisiológicas no fluxo sanguíneo entre espécies e sítios antes de usar a variabilidade deste parâmetro para explicar a absorção percutânea (73).

4.2. Fatores físico-químicos

Os principais fatores que influenciam a difusão passiva de um soluto, do veículo para a pele, surgem das propriedades moleculares do difusante, do veículo e da pele.

Quando a água satura a pele, os tecidos se suavizam, ela intumescce, podendo haver em alguns locais a formação de pregas e a sua permeabilidade aumenta drasticamente. Também o fenômeno de perda de água transepidermal é importante. É possível que alguns fármacos que penetram rapidamente, alcancem concentrações elevadas que levarão a um efeito osmótico podendo aumentar a hidratação da pele. O termo utilizado para classificar este composto é *fator de hidratação natural* (FHN). A hidratação do estrato córneo facilita a penetração da maioria dos materiais através da pele, incluindo os corticosteróides (10).

Em 1988, BOND e BARRY (16), estudaram a influência da hidratação na pele humana e na pele de camundongo sem pêlos. Concluíram que enquanto o excesso de hidratação não danifica a pele humana, na pele de camundongo ela provoca uma total ruptura na estrutura do estrato córneo,

implicando na exclusão deste modelo de membrana animal dos estudos de permeação cutânea onde ocorra longo período de hidratação.

O estrato córneo dos mamíferos é composto por queratinócitos envolvidos por uma matriz lipídica multilamelar e tridimensional. O colesterol e lipídeos de longas cadeias saturadas predominam nesta camada, sendo estes os principais responsáveis pela pouca entrada e saída da água transepidérmica na camada córnea (40).

Em muitos casos os pesquisadores dão muita importância aos vários aspectos da absorção percutânea, mas não se preocupam muito com a ligação do fármaco com os componentes do tecido. No entanto, para conseguir difusão com fluxo constante na penetração da substância na pele, é necessário estudar a interação fármaco-pele. Esta varia entre ligações fracas, como as forças de Van Der Waals, e ligação covalente forte. O mais importante exemplo clínico que envolve a ligação fármaco-estrato córneo é o efeito reservatório de corticóides tópicos e alguns antibióticos.

O efeito reservatório tem sua explicação em simples reações de natureza físico-químicas, solubilização dos fármacos e difusão através do estrato córneo. Para se obter este efeito a substância deve ter pequena difusibilidade e alta solubilidade no estrato córneo. No caso dos esteróides, quanto mais tempo este fica aplicado, maior é a sua concentração e quanto maior o período de oclusão maior será o depósito. Por meio deste conceito é possível planejar formulações de ação prolongada (10).

REIFENRATH e colaboradores (94), verificaram a interação que uma substância química pode apresentar em relação ao estrato córneo e com as demais camadas da pele, através de estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando compostos radioativos e como modelo animal o porco.

Considerando-se que a pele interage dinamicamente com o ambiente, e que o microambiente epidérmico muda durante as atividades diárias, quando aplicamos formas farmacêuticas na pele, como por exemplo, soluções, loções, cremes, géis, pós e aerossóis, estes materiais podem

impor maiores mudanças no estado físico do tegumento e nos seus efeitos sobre a permeabilidade. Se o veículo aplicado modificar a permeabilidade da pele, seu mecanismo de ação provavelmente será agir como um hidratante ou modificar a temperatura da pele ou atuar como um solvente no estrato córneo. Frequentemente, mais de um processo ocorre ao mesmo tempo. Assim consideram-se os efeitos separadamente (10).

A ligação da água, com o estrato córneo, depende da presença dos chamados fatores de hidratação natural da pele (FHN). Este material é necessário para manter uma concentração ideal de água de cerca de 20%(p/v). Um veículo tópico pode tanto aumentar como diminuir a hidratação do estrato córneo. Na teoria, o valor de pH de veículos tópicos pode modificar a queratina da pele, e assim alterar sua hidratação. No entanto, foi comprovado em estudos que isto não ocorre na prática para pH de 1 a 10. Acima de 10, a difusão da água aumenta e ocorre dissolução da queratina. Assim o pH tem pouco efeito na hidratação. A perda de umidade para o meio é tão significativa que os estudos *in vitro* usando as células de difusão possuem um sistema de oclusão para prevenir esta perda (10). Entretanto, KITAGAWA e colaboradores (57), verificaram a dependência do pH da fase de transição da bicamada lipídica de lipossomas dos lipídeos no estrato córneo.

A superfície da pele humana é descrita como levemente ácida, com valores de pH entre 4,2 e 5,6, e as camadas mais profundas apresentam um pH fisiológico de 7,4. Assim o gradiente de pH que existe através do estrato córneo pode fornecer energia livre diferencial. Esta pode levar a um esquema de transporte facilitado de moléculas anidras, através da membrana de lipídeos do estrato córneo, utilizando longas cadeias de alcanolaminas terciárias como moléculas carreadoras. Baseando-se neste conhecimento, HADGRAFT e colaboradores (43) propuseram um método para aumentar a penetração do salicilato de sódio, fármaco aniônico, e da cafeína, substância básica fraca. Embora estudos de toxicidade sejam necessários, este método pode ser mais um recurso para promover a

penetração de fármacos através da pele utilizando as características físico-químicas da pele.

O estrato córneo é um péssimo isolante térmico podendo perder calor através do contato entre as moléculas ou devido à fina espessura da membrana. O estrato córneo sob condições normais de temperatura climática, permanece entre 30° a 37°C. Clinicamente a temperatura aumenta quando ocorre oclusão ou quando ocorrem estados alterados. Sob oclusão, tanto o suor quanto o calor, proveniente da radiação não podem se dissipar, assim aumentando a temperatura da superfície em alguns graus. Entretanto, a temperatura não é um fator tão significativo na interação pele-veículo quanto a hidratação (10).

Formulações tópicas podem conter muitos ingredientes, incluindo tensoativos, solubilizantes, tampões, agentes quelantes, conservantes, antioxidantes, umectantes, emolientes, espessantes e perfumes. Qualquer um destes componentes pode interagir com o fármaco, modificando suas características iniciais (10).

Já em 1971, OSTRENGA e colaboradores (85, 86) relatavam a importância do veículo na penetração percutânea e conseqüente eficácia clínica dos fármacos. Uma das conclusões sugere que uma preparação tópica em forma de gel é eficaz quando se otimiza a concentração do fármaco para que ocorra sua total solubilização. Além disso, deve-se utilizar quantidade mínima de solvente que dissolva totalmente o fármaco, manter um coeficiente de partição favorável e garantir que os componentes do veículo não interfiram na permeabilidade do estrato córneo.

DI COLO e colaboradores (33), em 1989, estudaram o papel de dois tensoativos na transferência de massa de dois fármacos modelos através da epiderme humana, tendo como veículo base uma pomada oleosa. Comprovaram que os tensoativos, embora possam fazer parte de uma formulação como coadjuvante, apresentam ação sobre a membrana dependendo da sua polaridade e do fármaco. Portanto o formulador deve considerar qual o tipo de tensoativo a ser utilizado.

4.3. Promotores de Absorção (“Enhancers”)

As táticas para aumentar a eficiência de um sistema transdérmico resumem-se em mudar as propriedades físico-químicas do fármaco alterando a solubilidade e coeficiente de partição, como no caso dos pró-fármacos. Um outro meio seria usar um promotor para modificar a difusão do soluto através da pele. A maioria das substâncias ativas é hidrofílica, encontradas na forma de sal e não podem penetrar na epiderme sem um auxílio, por apresentarem um coeficiente de permeação baixo (65).

Denominam-se assim promotores ou aceleradores as substâncias que tem a capacidade de promover a penetração de substâncias ativas. A definição de promotor também implica que a mudança ocorrida na barreira seja reversível. Pode-se aumentar o fluxo através da pele, usando-se um co-solvente, ou elevando o coeficiente de partição do fármaco e assim promover sua liberação do veículo para a pele. Quando uma substância agir desta forma, ela não é considerada um promotor de absorção. Na prática é difícil isolar os efeitos de um agente seguindo parâmetros únicos no processo da absorção cutânea (11).

Portanto, observando a literatura, verifica-se que a atual definição de um promotor é a de um composto químico, uma combinação de substâncias ou um efeito físico que tem como finalidade reduzir reversivelmente a resistência barreira do estrato córneo de uma maneira ampla e irrestrita, sem danos as células viáveis.

Estas substâncias ou métodos, designados como modificadores, aceleradores, catalisadores ou simplesmente promotores tem como propriedades ideais (11):

- Farmacologicamente inerte inicialmente não apresentando nenhum receptor no organismo;
- Atóxico, não irritante e não alergênico;
- De ação rápida, duração previsível e de acordo com o fármaco utilizado;

- Após a sua remoção o estrato córneo deve voltar imediatamente ao normal, recuperando sua propriedade barreira;
- A propriedade barreira da pele deve diminuir em somente uma direção. Materiais endógenos não devem ser perdidos para o meio ambiente através da pele;
- Os aceleradores devem ser compatíveis química e fisicamente com as substâncias ativas da formulação;
- A substância, se líquida e presente em altas frações de volume, deve ser um solvente conveniente para a substância ativa;
- O material deve espalhar de forma adequada na pele;
- Deve ser economicamente viável, sem odor ou cor e apresentar aspecto adequado;

4.3.1. Promotores de Absorção Químicos

O tópico de estudos de vários pesquisadores é o uso destas substâncias químicas na penetração percutânea. Assim várias classes têm sido estudadas, como fosfolipídeos (132), etanol (80), monoterpenos cíclicos (82), terpenos (5) e outras. O estudo de co-solventes também é importante, porque eles influem no veículo alterando as propriedades da barreira, que por seu turno modifica o transporte. Outros como OBATA e colaboradores (81) realizaram estudos com o pré-tratamento da membrana para verificar o aumento da permeabilidade. Foi usado monoterpeno cíclico e a substância a ser difundida foi o diclofenaco. Usando esta mesma substância, NISHIHATA e colaboradores (79) usaram ditiotreitól e ascorbato de sódio de forma a tratar a membrana e aumentar a permeabilidade.

4.3.1.1. Mecanismo geral de ação dos promotores de absorção

Em 1987, GOLDEN e colaboradores (40) através de estudos com DSC e espectroscopia com infravermelho com transformações de Fourier atenuadas, concluíram que as proteínas do estrato córneo poderiam contribuir para a integridade da barreira e particularmente as proteínas associadas com a membrana dos queratinócitos, poderiam estabilizar os lipídeos intercelulares, influenciando nas propriedades aquosas da barreira. Foi observado que, aumentando-se a fluidez das cadeias de lipídeos hidrocarbonetos, estabelecidos nas lamelas intercelulares, resultava em aumento do fluxo de água. Estas considerações colaboraram para o entendimento da relação entre lipídeos estruturalmente anormais, associados com distúrbios dermatológicos, com o aumento da perda de água transepidermal, como é o caso da hiperhidrose.

A matriz lipídica é vista como o principal caminho pelo qual a água e outras substâncias atravessam o estrato córneo (40). As informações sobre a organização molecular desta região são importantes quando se deseja alcançar um desenvolvimento racional de substâncias capazes de aumentar a permeação percutânea (126).

Utilizando o DSC, GOODMAN e BARRY (41) postularam uma teoria sobre a atividade dos promotores de absorção: Teoria LPP ou interação com lipídeos, alterações das proteínas e aumento do coeficiente de partição.

Uma das ações mais importante dos promotores na barreira do estrato córneo é a ruptura da estrutura da bicamada lipídica, primeira característica, e o aumento da fluidificação desta região, permitindo maior mobilidade do fármaco. No entanto, alguns promotores também interagem com as proteínas intracelulares, segunda característica. Eles podem solvatar as células córneas, quebrar ligações aquosas, expandir as estruturas e competir com os fármacos pelos sítios de ligação com o hidrogênio. Alguns aceleradores parecem interagir somente com a bicamada lipídica, por exemplo, a azona. Observações empíricas mostram que a ação de alguns promotores pode ser exacerbada se formulados conjuntamente com co-

solventes, como por exemplo, o propilenoglicol, que parece agir solvatando as proteínas intracelulares. Assim, um promotor ideal seria aquele que aumentaria ambos os caminhos, a rota intercelular e a rota transcelular. A terceira característica é que quando uma quantidade suficiente de solvente entra no estrato córneo pode ocorrer alteração do comportamento de partição do fármaco ou de um promotor lipídico co-administrado (41).

Inicialmente ocorre a ruptura da estrutura altamente organizada dos lipídeos do estrato córneo, seguida de interação com proteínas intracelulares promovendo-se a partilha do fármaco no tecido, de forma a criar o “efeito reservatório”. Concomitante pode ocorrer a hidratação do estrato córneo de modo a formar canais polares que facilitem a difusão dos fármacos. Por fim os promotores podem atuar como co-solventes no estrato córneo (11).

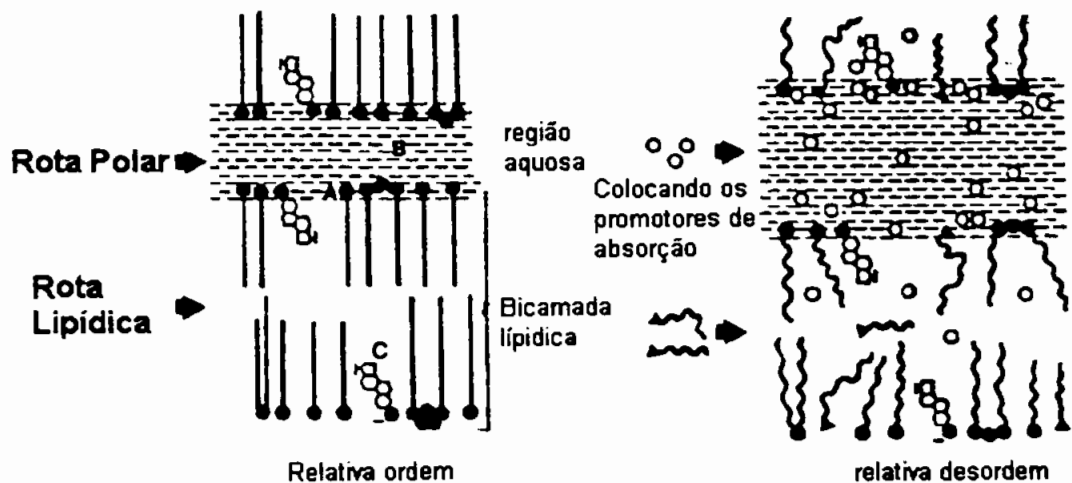


Figura 7. Sítios de ação dos promotores de absorção nos espaços intercelulares do estrato córneo (11).

A interação no sítio A (figura7) ocorre quando os promotores de absorção interagem com a cabeça do grupo polar dos lipídeos, alterando as ligações de hidrogênio e forças iônicas. Assim, ocorrem modificações das esferas de hidratação dos lipídeos. Esta interrupção pode desorganizar a matriz promovendo a permeação de substâncias polares. Uma segunda resposta pode ser a entrada de mais fluídos aquosos nos tecidos e assim aumentar o volume de água entre as camadas de lipídeos ou entre as cabeças polares de grupamentos de lamelas medianas. Este inchaço pode proporcionar uma fração de volume maior de água "livre" que é diferente de água ligada e portanto, aumentar a área seccionada disponível para a difusão polar (sítio B, figura 7) (11). No entanto, análises feitas com microscópio eletrônico e Raio X mostraram fortes evidências que a lamela intercelular não incha com o aumento da hidratação (40).

Um importante fator secundário é a interrupção da estrutura da interface que deve também alterar a formação das camadas de lipídeos. A rota hidrófoba lipídica, então, estará mais desordenada e pronta a ser atravessada por um penetrante parecido com um lipídeo (sítio C, figura 7). Este fenômeno pode explicar porque certos promotores também alteram a formação lipídica, mesmo quando, anteriormente foi predito, apenas por considerar a polaridade, que eles só alteram a rota polar (11).

A ação direta dos promotores no sítio B (figura 7), pode alterar a região aquosa de vários modos além de promover mudanças nas ligações e, portanto, possivelmente aumentar a quantidade de água, além de alterar diretamente a constituição da região. Por exemplo, quando sistemas transdérmicos ou formulações liberam solventes, como o propilenoglicol ou etanol, na superfície da camada córnea, a habilidade solubilizante das moléculas que agem como lipídeos pode aumentar no sítio aquoso. Assim, a matriz lipídica pode melhor dissolver moléculas, como o estradiol e hidrocortisona, aumentando o coeficiente de partição e favorecendo o aparecimento de alta concentração do fármaco na pele. Este fator pode diminuir o potencial químico da substância na camada córnea, diminuindo temporariamente a força de difusão.

Quando o solvente passa do estrato córneo para a epiderme viável, o fármaco deve seguir a um fluxo proporcionalmente alto, enquanto ele se difunde, agora com seu novo potencial de gradiente químico. O sistema de liberação transdérmica que incorporou o estradiol em um veículo etanólico, o Estraderm[®], deve parte de sua atividade a este tipo de mecanismo (11).

A ação no sítio C, figura 7, matriz lipídica, deve-se a propriedade que muitos promotores possuem, por sua estrutura química, de inserir-se entre as caudas hidrófobas da bicamada. Assim modificando a estrutura lipídica, aumenta-se a desordem dos lipídeos, permitindo então melhor difusão dos fármacos. A alteração na estrutura lipídica pode promover desordem nas cabeças dos grupos polares aumentando a penetração pela rota polar (sítio A, figura 7) (11).

Para muitos aceleradores atuarem efetivamente, a escolha correta de um co-solvente é importante (12, 30, 127). Para que estes alcancem o sítio A, figura 7, a superfície polar da bicamada lipídica, em quantidade suficiente pode ser necessário um co-solvente como o propilenoglicol ou etanol. Presume-se que a função do co-solvente seja a de aumentar a lipófila das regiões aquosas e assim melhorar a habilidade de solubilizar os materiais como a azona e os derivados do ácido oléico. Os co-solventes podem também alterar a estrutura das cabeças de grupos lipídico inserindo entre as cabeças de grupos polares e interagindo com as caudas dos promotores as quais estão inseridas entre os grupos hidrófobos da membrana lipídica, aumentam assim a desordem nos domínios lipídicos (11).

Embora exista maior ênfase na rota intercelular, não se deve desprezar completamente a rota intracelular, feita através dos queratinócitos. Se para determinada substância a rota intracelular significa uma penetração considerável, deve-se considerar as fibras de queratina e as interações que promotores como solventes apróticos (ex.: dimetilsulfóxido) e tensoativos fazem com as proteínas. Estes mecanismos incluem as interações com grupos polares, relaxamento das forças de ligação e alterações na conformação das hélices, sendo que para interações intensivas pode haver

a formação de rotas porosas através dos tecidos. É possível que, particularmente para moléculas extremamente hidrófilas, que a rota intercelular forneça o passo limitante para a absorção percutânea após a formação de caminhos através da lamela lipídica intercelular. Os espaços e lacunas nos lipídeos intercelulares, entre os queratinócitos adjacentes, podem também formar caminhos alternativos de transporte de um queratinócito para seu vizinho situado na epiderme viável (11).

Usando os conceitos expostos acima, BARRY (11) propôs um modelo baseado no conceito de LPP que tenta explicar o mecanismo de ação dos promotores de absorção mais estudados:

- Diminuição da ordem dos lipídeos intercelulares (ex: ácido oléico, figura 8);
- Interação com as proteínas intracelulares;
- Quando o promotor combinar os dois efeitos, sua atividade será acentuada;
- Promotores pouco polares, como o DMSO (figura 8) e análogos, pirrolidona, etanol e propilenoglicol podem acumular na camada córnea e promover a partição do fármaco;
- A resistência a difusão do estrato córneo diminui em relação ao aumento da concentração de água, e todo tratamento que aumenta a hidratação, geralmente aumenta a penetração de fármacos.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

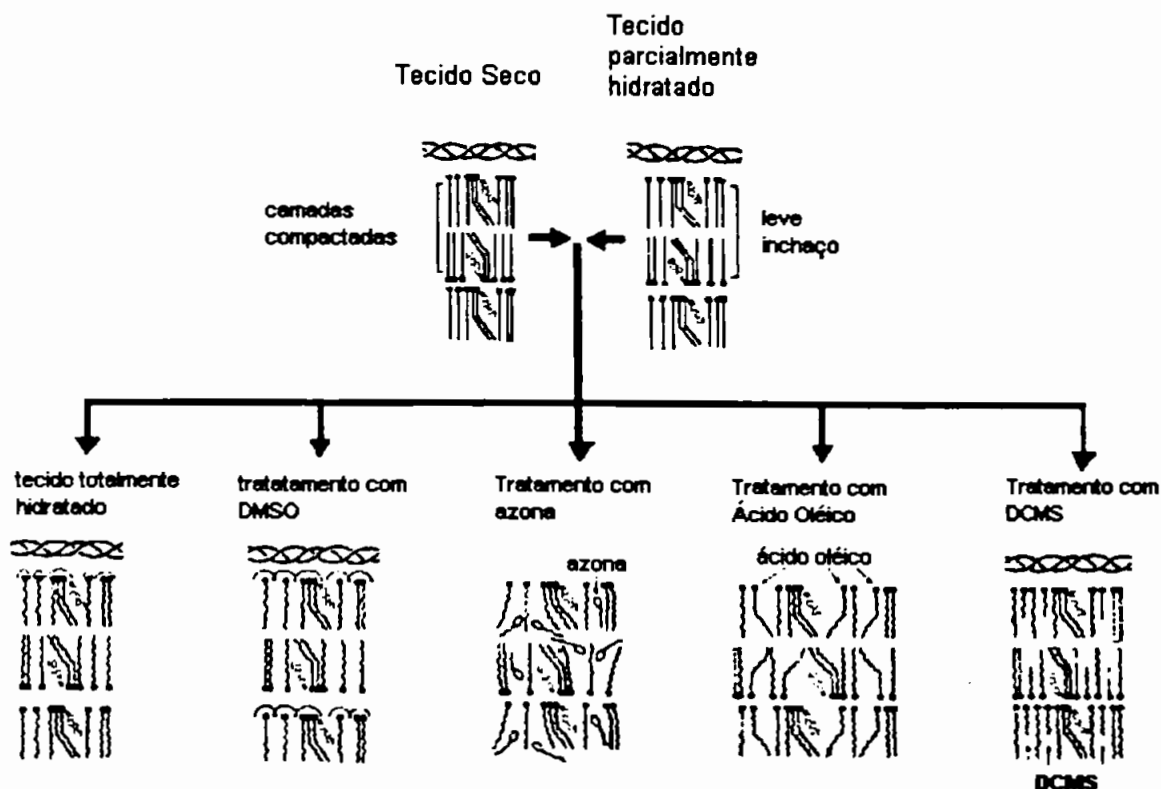


Figura 8. Proposta do modo de interação de alguns promotores de absorção com o estrato córneo (11).

4.3.1.2. Principais promotores de absorção químicos

Existem diversas classes químicas que podem ser usados como promotores, como por exemplo, os solventes comuns como a água, álcoois, dimetil sulfóxido, propilenoglicol, azona e seus derivados, os tensoativos (aniônicos, catiônicos e não iônicos), ácidos graxos, terpenos e seus derivados, alquil sulfóxidos, ésteres de açúcares, uréia e outros.

Os promotores de absorção têm sido classificados por diversos pesquisadores. LAMBERT e colaboradores (62) dividiram as substâncias em ácidos graxos e álcoois simples, aqueles que agem como solventes e aceptores de ligação para o hidrogênio (DMSO), e os tensoativos fracos, que possuem uma cabeça polar (azona). Utilizando os parâmetros de

solubilidade de Hildebrand, outro grupo de pesquisadores classificou os promotores como polares ou não polares. HORI e colaboradores (49), construíram um diagrama onde foram plotadas as características orgânicas e inorgânicas dos promotores revelando a existência de dois grupos distintos. Assim, uma área contém o DMSO, etanol e propilenoglicol e a outra área, a Azona, álcool laurílico e ácido oléico.

Em 1987, BARRY e BENNETT (12) os classificaram em três categorias principais. A primeira seria a dos solventes que aumentam a penetração de compostos polares e não polares, como por exemplo, a 2-pirrolidona e o propilenoglicol junto com a azona. A segunda categoria seria a de substâncias que afetam principalmente a rota polar como o DMSO junto com propilenoglicol e a terceira categoria a de substâncias que alteram a rota não polar, como o ácido oléico.

Azona

CHOW e colaboradores (27) estudaram em 1983, os efeitos da concentração de azona, 1-dodecilazacicloheptano-2-ona, na cinética de penetração percutânea do acetono de triancinolona, utilizando pele de camundongo sem pêlo e membranas sintéticas.

Em 1987, OKAMOTO e colaboradores (83), compararam nove azacicloalcanonas com a azona quanto ao seu efeito de promover a penetração do 6-mercaptopurina através da pele de cobaio. Foi também examinado o poder irritante primário destas substâncias utilizando-se coelhos *in vivo*.

Estudos de permeabilidade *in vitro*, foram combinados com a técnica de DSC, para averiguar a influência da dose dependente da azona em relação ao coeficiente de permeabilidade dos solutos no estrato córneo de ratos sem pêlo. Uma técnica de nebulização foi desenvolvida para distribuir uniformemente e quantitativamente pequenas quantidades de azona no estrato córneo. Dados de permeabilidade obtidos de vários modelos de

solutos de variadas lipofilidades sugeriram fluidificação lipídica e aumento de caminho polar como mecanismo de ação para a azona. Alcanóis e esteróides, ambos promotores primários por fluidificação lipídica, tem diferentes graus de aumento de promoção. Isto evidencia que a barreira do estrato córneo é heterogênea, mais do que uma barreira homogênea.

Dois efeitos da azona na camada córnea foram detectados por DSC: o decréscimo na área dos picos e a mudança para baixas temperaturas. O efeito de fluidificação lipídica seria responsável qualitativamente pelo aumento do coeficiente de permeabilidade para solutos mais lipofílicos. A queratina do estrato córneo endotérmico também parece ser alterada na presença da azona. É possível que a alteração da estrutura da queratina poderia conduzir o desenvolvimento de caminhos polares no estrato córneo (62).

Estudos feitos por GOODMAN e BARRY (41), utilizando um modelo de dose finita aplicada sob a forma de filme de fármaco seco, verificaram a efetividade de penetração dos promotores azona, ácido oléico, decilmetil sulfóxido (DCMS) e propilenoglicol na penetração de fármacos como o 5-fluorouracil e estradiol. Foram utilizados veículo aquoso e propilenoglicol para pré-tratamento da azona e DCMS. O 5-fluorouracil e estradiol foram utilizados no estudo de absorção percutânea como modelo de fármacos polar e não polar, respectivamente.

O modelo experimental compara a permeabilidade e a distribuição do fármaco, sendo uma parte pré-tratada com promotor e a outra parte não tratada com o promotor. Neste tipo de experimento, onde foi utilizada a técnica de "dose finita", a taxa de difusão no estado de equilíbrio não pode ser facilmente medida, mas a quantidade de fármaco que penetrou pode ser determinada. Foi observado que as condições físico-químicas podem ser diferentes nas aplicações clínicas normais e não existe hidratação excessiva de tecido, o que levou os pesquisadores a escolha da técnica mencionada acima. O efeito do acelerador pode ser medido por comparação da penetração do fármaco através de tecido tratado e não tratado (41).

Com a técnica da dose finita, o pré-tratamento com propilenoglicol aumentou a penetração do fármaco, ao contrário da sua ineficácia nos estudos prévios de fluxo estático ou "dose infinita". Os promotores, que provavelmente rompem a bicamada lipídica, são mais efetivos com propilenoglicol do que com veículos aquosos (41).

OKAMOTO e colaboradores (84), verificaram o efeito do veículo e de promotores de absorção, entre eles a azona, na penetração percutânea do aciclovir, utilizando a pele de camundongo sem pêlo e de rato como membranas em estudos *in vitro*. Concluíram que a combinação de veículos hidrofílicos e promotores hidrofóbicos resultava em uma maior absorção.

Em 1996, HARRISON e colaboradores (45), procuraram comprovar o mecanismo de ação pelo qual a azona e o Transcutol® reconhecidos promotores de absorção, promoviam o aumento da penetração percutânea de fármacos. Para isso, monitorizaram a difusibilidade e a solubilidade do 4-cianofenol em estrato córneo humano *in vitro*, utilizando a espectroscopia com infravermelho com transformações de Fourier de refração total atenuada (ATR-FTIR) e comparando os efeitos dos promotores no fluxo usando um sistema de células de difusão de Franz. No entanto, os resultados por este método não esclareceram o mecanismo proposto pelas pesquisas anteriores.

No mesmo ano, HARRISON e colaboradores (44), utilizaram um análogo sem hidrogênio da azona, investigando assim o mecanismo de ação deste promotor. Por meio da mesma técnica acima mencionada, onde foram analisadas as ligações C-H₂ simétricas, comprovaram que a azona realmente induz a desordem das cadeias lipídicas aumentando a fluidez dos lipídios do estrato córneo.

Em 1998, MICHNIAK e colaboradores (70), verificaram a performance de análogos da azona, como promotores de absorção, utilizando a hidrocortisona, um esteróide polar, como fármaco modelo e propilenoglicol como veículo.

Uréia

A uréia é uma das substâncias constituintes do chamado fator de hidratação natural da pele (FHN), cuja composição pode abranger ainda ácidos graxos livres e ácido pirrolidono carboxílico (102).

A uréia tem atrativo interesse como promotor de penetração devido à sua habilidade para hidratar a pele e por agir como um suave queratolítico, embora o mecanismo molecular de ação seja desconhecido. Estes efeitos devem promover penetração na pele e por isso algumas preparações de antiinflamatórios esteróides tópicos empregam a uréia (10).

Em estudo realizado por NAITO e TSAI (76) foi constatado um aumento acentuado na absorção da indometacina de uma base oleosa, quando adicionado de uréia na concentração de 0,5%.

Em 1989, WILLIAMS e BARRY (127) verificaram que a uréia e alguns veículos isoladamente são ineficazes na promoção da permeação do 5-fluoruracil através da pele de cadáver humano. Entretanto, os análogos da uréia apresentam-se eficazes somente quando formulados com propilenoglicol.

Ácido Oléico

O tratamento da epiderme com tensoativos pode aumentar significativamente o transporte de moléculas polares, mas aumenta simultaneamente o transporte de moléculas apolares. Sendo assim, outros sistemas de veículos são necessários para aumentar o transporte dessas moléculas lipofílicas. Um método para alcançar esse objetivo é colocar pequenas quantidades de lipídeos em um veículo contendo propilenoglicol.

O transporte de substâncias apolares como o ácido salicílico pode ser aumentado através da adição de pequenas quantidades de ácidos ou álcoois graxos à formulação. Um exemplo eficiente desse sistema sinérgico

é a adição de uma quantidade reduzida de ácido oléico ao propilenoglicol como propôs COOPER em 1984 (30).

BARRY e BENNETT (12), através de estudos utilizando o manitol, hidrocortisona e progesterona, concluíram que o ácido oléico age principalmente modificando a rota não polar.

A absorção percutânea da azidotimidina (AZT) foi observada em ratos por SEKI e colaboradores (110). O AZT foi aplicado, na forma de dispersão contendo ácido oléico 10% em água, na pele da região abdominal. Após tratamento por 24 horas, altas concentrações plasmáticas de AZT foram observadas.

Uma recente aplicação do ATR-FTIR foi usada por MAK e colaboradores (67) para monitorar a parte externa do estrato córneo e assim demonstrar a absorção percutânea *in vivo*. O 4-cianofenol foi administrado por 1, 2 ou 3 horas na forma de solução a 10% (v/v) em propilenoglicol contendo 5% (v/v) de ácido oléico. Apenas as formulações com ácido oléico induziram maior desvio na frequência da absorbância da ligação C-H assimétrica. Esta mudança indica uma crescente desordem da cadeia de lipídeos, mecanismo pelo qual acredita-se que o ácido oléico promova o transporte de fármacos. ATR-FTIR permite que se observe a cinética, a extensão e o mecanismo de promoção da penetração percutânea *in vivo* em humanos.

NIAZY (77) mostrou a influência do ácido oléico e outros promotores na liberação transdérmica da diidroergotamina através da pele de coelho. Concluiu que o ácido oléico a 6% era mais efetivo que a 10% corroborando com os estudos de COOPER (30) em 1984.

Em 1995, ELYAN e colaboradores (35) verificaram os efeitos de diversos ácidos graxos na absorção percutânea do sulfato de metaproterenol. Os pesquisadores procuraram clarear a relação entre o comprimento das cadeias dos ácidos graxos e sua ação promotora, além de verificar se o fármaco seria apto para administração percutânea.

BHATIA e colaboradores (14), ao estudarem os efeitos da iontoforese e do ácido oléico sobre a permeabilidade de um liberador de hormônio, utilizando FT-IR, concluíram que o ácido oléico age por dois mecanismos, isto é, a fluidificação dos lipídeos e aumento da fase de separação sólido-fluído do estrato córneo, difundindo-se na matriz.

Óleo de Pequi

O pequi (117), *Cayocar brasiliense* Camb, conhecido pelos nomes vulgares de piqui, pequi, pequiá, amêndoa de espinho, grão de cavalo, amêndoa do Brasil e pequizeiro e ocorre em todo o cerrado brasileiro, adaptando-se a condições ecológicas as mais diversas. A polpa amarela do fruto é utilizada na alimentação, fabricação de licores, doces e sabões caseiros, além de seu uso na medicina popular contra as afecções do couro cabeludo, dores reumáticas, moléstias bronco pulmonares, ação analéptica e fortificante. É também citado como um dos mais ricos em pró-vitamina A e as sementes do fruto de pequi além de serem comestíveis fornecem óleo utilizado como lubrificante (117).

O óleo de Pequi apresenta em sua composição quantidades significativas de ácido oléico que desperta interesse na sua utilização como promotor de absorção. Extraí-se o óleo do pequizeiro, árvore pertencente a família *Caryocaraceae* o qual possui dois gêneros e várias espécies, das quais oito são encontradas no Brasil, principalmente na Amazônia.

Ácidos graxos	Óleo de pequi (% em massa)
Cáprico (10:0)*	0,5
Láurico (12:0)*	0,8
Mirístico (14:0)*	0,1
Palmitico (16:0)*	35,6
Palmitoléico (16:1)*	1,4
Estéarico (18:0)*	2,3
Oléico (18:1)*	57,0
Linoléico (18:2)*	1,8
Araquídico (20:0)*	0,5
Total	100

(número de átomos de carbono: insaturações)*

Figura 9. Composição percentual dos ácidos graxos presentes no óleo da polpa amarela do pequi (117).

Em temperaturas abaixo de 28 °C o óleo da polpa do pequi se encontra em estado sólido. Isto se deve a sua riqueza em ácido palmítico e outros ácidos graxos saturados, que no total perfazem 39,8%. Esta grande riqueza em ácido palmítico e ácido oléico, dois ácidos graxos presentes em maior quantidade na emulsão epicutânea e lembrando a necessidade de repor à pele os constituintes responsáveis pela homeostase cutânea, tornam o óleo de Pequi comparável aos demais óleos de emprego em produtos cosméticos e farmacêuticos.

Tensoativos

Tensoativos são geralmente utilizados em formulações farmacêuticas tópicas e cosméticas para melhorar suas características físico-químicas. Cremes tópicos contêm tensoativos como agentes emulsificantes, porém na concentração usada, eles provavelmente têm um efeito mínimo na permeabilidade cutânea. No entanto, quando aplicamos tensoativos iônicos na pele, mesmo estando diluídos, estes podem alterar a água na pele, de tal

modo que promova a penetração de substâncias hidrofílicas. Os tensoativos também podem alterar a permeabilidade da pele à água (10). Em formulações as moléculas encontram-se divididas entre a fase dispersante, forma livre, e a fase micelar ou ligada (105).

Entre os tensoativos aniônicos, o íon lauril penetra melhor e tem melhor efeito promotor na penetração de outros solutos. Os sais de sódio dos ácidos graxos com cadeias alquil de 10 carbonos ou menos tem uma penetração significativa, enquanto os ácidos graxos de cadeias longas produzem fluxos mais lentos (10). Em soluções aquosas estas substâncias tendem a formar micelas quando sua concentração atinge a concentração micelar crítica. A capacidade destas micelas de incluírem em seu interior moléculas pouco solúveis em água possibilita a solubilização, facilitando assim a passagem destas substâncias através das membranas ou por espaços intercelulares. Porém, assim que a barreira é atravessada deseja-se que esta substância esteja disponível, pois se assume que apenas a forma livre do fármaco penetra através da pele (105). Para tanto, é necessário que a micela seja rompida ou que a ligação com o tensoativo seja desfeita (102).

Os tensoativos, ao baixarem a tensão superficial, promovem a absorção pela via transfolicular. A resistência evidenciada pela camada córnea é particularmente reduzida pela presença de tensoativos aniônicos que alteram as hélices de queratina e reagem com os sítios de ligação (102).

Em 1986, SARPOTDAR e ZATZ (105) verificaram a penetração cutânea da lidocaína na presença de dois tensoativos não iônicos, como o polissorbato 20 e o polissorbato 60, em veículos contendo diferentes concentrações de propilenoglicol e água. Os estudos foram realizados utilizando-se a técnica de "dose finita" e de "dose infinita". Aumentando-se a concentração haverá correspondente elevação do grau de penetração do agente, resultando daí uma interação pele/tensoativo.

CAPPEL e KREUTER (25), também estudaram o efeito de tensoativos não iônicos na liberação transdérmica. Foram utilizados

polissorbatos que constituem uma classe de tensoativos segura e com baixa toxicidade e quase ausência de irritação cutânea.

A influência das interações fármaco-tensoativo e pele-tensoativo sobre a absorção percutânea de fármacos dispersos em pomadas, foi estudada por DI COLO e colaboradores (33). O estudo conduzido *in vitro*, utilizando pele humana, demonstrou que os tensoativos interagem com o fármaco e com a pele de diferentes maneiras, dependendo de sua polaridade.

Em 1992, SANTOS e colaboradores (103) empregaram o laurilsulfato de sódio (LsS) e o polissorbato 80 como promotores de absorção na liberação *in vitro* do fentiazac.

BORRÁS-BLASCO e colaboradores (18), estudaram a influência do lauril sulfato de sódio na absorção percutânea de compostos com diferentes lipofilicidades. Demonstraram que quanto menor a lipofilicidade do fármaco, maior o efeito promotor do lauril sulfato de sódio.

DMSO

O dimetil-sulfóxido (DMSO) é um solvente aprótico, incolor, inodoro e higroscópico. A dimetil-formamida (DMF) e a dimetil-acetamida (DMA) são outros solventes que desde os anos 60, assim como DMSO foram utilizados para acelerar a penetração de vários produtos, porém apresentam seu uso restrito devido aos vários efeitos indesejáveis, decorrentes do seu uso (102).

Uma resposta positiva requer, geralmente, concentrações superiores a 60% o que torna inviável a sua utilização em medicamentos e cosméticos devido a seu efeito danoso à pele. Estes efeitos negativos foram descritos na literatura como sendo a formação de eritema e de pápulas, lesões irreversíveis na pele, alteração no estrato córneo e denaturação das proteínas (102).

Todos estes efeitos colaterais levaram os pesquisadores a procurarem alternativas, chegando a um derivado do DMSO, o decil-metil-sulfóxido (DCMS), que além de promover com êxito a penetração de substâncias, evidencia reversibilidade da ação. É considerado um bom promotor da absorção para moléculas hidrofílicas e moléculas ionizadas, mas o mesmo não ocorre para compostos lipofílicos (102).

O mecanismo de ação dos sulfóxidos é caracterizado pelo seu poder dissolvente que altera a permeabilidade das membranas celulares. Além deste efeito dissolvente, o DMSO provoca um efeito chamado de "swelling" ou inchaço que significa a hidratação cutânea, que leva a formação de canais dentro da matriz do estrato córneo, o qual favorece a passagem de vários compostos, ou diminui a resistência difusional do estrato córneo, resultando no enfraquecimento das membranas. A nível estrutural observa-se uma mudança configuracional reversível nas proteínas com substituição das moléculas de água por DMSO (102).

Pirrolidonas

Nos últimos anos, as pirrolidonas e seus derivados receberam considerável atenção por serem consideradas potenciais promotores de penetração cutânea e auxiliarem a formação de reservas das substâncias retidas na camada córnea e unhas.

Apesar de se reconhecer nas pirrolidonas uma marcada atividade aceleradora da penetração, o seu uso está comprometido, devido a probabilidade destas substâncias induzirem fenômenos de irritação, toxicidade e dor (102).

A 2-pirrolidona (2-P) e a N-metil-2-pirrolidona (NMP) são solventes versáteis sendo já utilizados na indústria petroquímica. Ambas podem ser utilizadas como promotores de absorção de uma variedade de fármacos, além de induzirem a formação do efeito reservatório destes no estrato córneo. Uma outra pirrolidona, o ácido piroglutâmico (2-pirrolidona-5-ácido

carboxílico), é um componente do fator natural de hidratação da pele, que é responsável pela hidratação do estrato córneo (108).

É interessante notar que a azona e a N-metil-2-pirrolidona possuem estrutura anelar semelhante, porém apresentam cadeias alquil diferentes (108).

De acordo com mudanças feitas na sua estrutura, a pirrolidona e seus derivados apresentam lipofilicidade distinta, variando de extremamente lipófilas até extremamente hidrófilas (108). A sua ação promotora e efeitos adversos esta diretamente relacionados com a localização no estrato córneo e as propriedades físico-químicas, particulares de cada uma.

SASAKI e colaboradores (106) prepararam oito derivados de pirrolidona e os compararam com a NMP através de suas características físico-químicas, absorção transdérmica e atividade promotora na liberação transdérmica do vermelho de fenol. Foi demonstrado que alta lipofilicidade do promotor é importante para que ocorra a penetração de compostos hidrófilos.

Em 1990, os mesmos pesquisadores (107) publicaram um trabalho onde foi verificada a influência da concentração e do pré-tratamento na ação promotora das pirrolidonas. Foram estudadas três N-alkil-2-pirrolidonas e comprovou-se que a diminuição da concentração dos promotores na formulação, provocou uma diminuição do fluxo e do efeito reservatório na pele, seguida de um prolongamento do LagTime. O pré-tratamento diminui este tempo consideravelmente.

SATO e colaboradores (109), verificaram o efeito da N-dodecil-2-pirrolidona na absorção percutânea de derivados do 5-fluouracil.

Álcool

PERSHING e colaboradores (88) verificaram a influência do etanol na permeação do 17 β -estradiol. Experimentos feitos *in vitro* sugeriram que o aumento da penetração poderia ser conseqüência da extração dos lipídeos da pele pelo etanol. O estudo *in vivo* demonstrou que o fluxo de estradiol pode ser predito com o conhecimento de dois parâmetros, o coeficiente de partição do soluto no estrato córneo humano e a concentração do soluto no veículo.

A função do sistema água-etanol na absorção percutânea de um permeante polar, o íon salicilato, foi investigada por KURIHARA-BERGSTROM e colaboradores (61), utilizando-se estudos de difusão clássica combinados com espectroscopia com a finalidade de entender as alterações causadas pelo etanol na barreira do estrato córneo. Os sistemas etanol-água podem ser úteis no desenvolvimento de sistemas de liberação transdérmica de substâncias ativas, particularmente nas formulações com fármacos iônicos que podem não ter valores de fluxo otimizados.

Terpenos

São compostos derivados de óleos essenciais de plantas englobando habilidades de bons promotores de absorção com baixa irritação cutânea e baixa toxicidade sistêmica (32). O efeito dos terpenos como promotores pode ser devido a ruptura dos lipídeos a temperaturas fisiológicas (32).

Em 1990, OBATA e colaboradores (82), investigaram o efeito do *l*-mentol na absorção percutânea de fármacos hidrófilos, como o diclofenaco de sódio, em uma pomada gelificada, utilizando metodologia *in vitro*. Posteriormente em 1993, o mesmo estudo foi conduzido utilizando o *l*-mentol e o *d*-limoneno, porém na forma de pré-tratamento, em ratos sem pêlos (81).

ARELLANO e colaboradores (5), em 1996, também verificaram o efeito promotor de vários terpenos na absorção percutânea do diclofenaco

de sódio. No mesmo ano, MAITANI e colaboradores (66), examinaram o mecanismo de ação do *l*-mentol, do ácido oléico e da lauricidina no aumento da absorção do sódio livre do diclofenaco, usando uma membrana de silicone tratada com etanol como modelo de pele. Concluíram que enquanto o ácido oléico e a lauricidina não aumentavam a permeação do diclofenaco de sódio pelo poro, o *l*-mentol parecia aumentar a permeação do fármaco através de ambos os caminhos, do poro e do lipídeo.

Ainda procurando esclarecer o mecanismo de ação dos terpenos, CORNWELL e colaboradores (32), realizaram estudos com calorimetria exploratória diferencial e difração de pequeno ângulo de Raio X, em pele humana. Os terpenos estudados foram o *d*-limoneno, 1-8-cineola e o nerolidol, sendo também investigado o sinergismo entre terpenos e propilenoglicol. Demonstraram que o *d*-limoneno rompe a bicamada intercelular enquanto que o 1-8-cineola desarranja os lipídeos a temperaturas fisiológicas.

Em 1998, SAIJA e colaboradores (101), estudaram a otimização da permeação de dois flavonóides através da pele humana *in vitro*, utilizando para isso o pré-tratamento com dois promotores o *d*-limoneno e a lecitina. Estes flavonóides demonstraram ser eficazes na redução de eritema causado por UV-B e que o uso dos promotores realmente elevou a penetração destas substâncias. Concluíram que os flavonóides podem ser utilizados como agentes fotoprotetores, quando otimizadas com promotores de absorção.

KITAGAWA e colaboradores (55), também em 1998, verificaram a atividade do *l*-mentol na permeabilidade de derivados do ácido benzóico, constatando que este promotor juntamente com o etanol, causa desarranjo da estrutura lamelar do estrato córneo, aumentando assim a penetração dos derivados do ácido benzóico relativamente hidrófilos.

Enzimas

As enzimas podem interferir na permeação cutânea, quer favorecendo ou impedindo a absorção de substâncias ativas, portanto podem ser utilizadas como promotores ou retardadores.

PATIL e colaboradores (87) estudaram a permeação cutânea do ácido benzóico, manitol e testosterona na presença da enzima fosfolipase C, triacilglicerol hidrolase, fosfatase ácida e fosfolipase A2. Verificaram que enzimas podem facilitar a penetração sendo a fosfolipase C a mais efetiva das enzimas estudadas.

QUITANAR-GUERRERO e colaboradores (92) investigaram *in vitro* a influência de substâncias queratolíticas, tais como a uréia, ácido salicílico e a papaína na permeabilidade do nitrato de miconazol, cetoconazol e itraconazol, fármacos antimicóticos. Demonstraram que o pré-tratamento combinado foi adequado para melhorar a permeabilidade dos antimicóticos por permitir a formação de rotas na superfície da unha.

A papaína (122) é uma enzima proteolítica proveniente do látex das folhas e frutos do mamão verde adulto, *Carica papaya* Linn, disponível comercialmente sob a forma de pó diluído com características físicas e químicas especiais. Há muito tempo tribos da América, África e ilhas do Caribe empregam o mamão verde na cicatrização de feridas.

Pesquisas, utilizando a papaína no tratamento de lesões de difícil cicatrização, obtiveram ótimos resultados, demonstrando assim o seu valor em ferimentos cujo tratamento convencional não se mostrou eficaz.

Quando os frutos da papaia amadurecem, ocorre uma redução na quantidade de látex conduzindo a diminuição da atividade enzimática, podendo até desaparecer. A papaína disponível comercialmente é isolada do látex fresco do mamão com a remoção de três proteinases tiólicas, as quais atuam como contaminantes da papaína, as quimopapaínas A, B e a peptidase papaia A.

A ação proteolítica da papaína depende do substrato proteico e do valor do pH do meio, sendo para a gelatina e para a caseína o valor de pH ótimo igual a 5.

Entretanto, apesar da atividade proteolítica da papaína, que possivelmente poderia interagir com as proteínas intercelulares da camada córnea, investigações sobre a possível atividade como promotor de absorção, não têm sido encontradas na literatura.

5. *Sistemas Tópicos Versus Sistemas Transdérmicos*

Sistema terapêutico transdérmico é um sistema onde ocorre a absorção de substâncias na superfície da pele, de uma forma controlada. Este nível é conhecido como o máximo aceitável pela pele. Neste caso, é o sistema e não o estrato córneo, que controla a velocidade na qual a substância se difunde através da epiderme e passa para a circulação via capilar.

Formulações são colocadas na pele para administração de fármacos com três objetivos principais: (a) alcançar tecidos locais imediatamente abaixo do local de aplicação; (b) regiões mais profundas, nas imediações da aplicação; (c) circulação sistêmica, com o objetivo de provocar mudanças farmacológicas totalmente diversas do local de aplicação (37).

No caso de fármacos tópicos, o formulador deve garantir uma concentração de fármaco efetiva ao sítio de ação por um período suficiente, para que ocorra efeito farmacológico desejável. No caso dos esteróides, por exemplo, pode ser requerida a penetração do fármaco através do estrato córneo para alcançar o local da inflamação na epiderme viável ou derme. Já que a difusão do fármaco pode ser tanto para um sentido quanto para outro, a adsorção no tecido adiposo pode ainda fornecer uma dose efetiva durante um período prolongado. O que deve ser evitado é a excessiva adsorção pelo estrato córneo (95).

A aplicação local envolve a aplicação do fármaco na pele com o propósito de tratar doenças ou aliviar sintomas nas camadas mais profundas abaixo do local de aplicação. Neste caso, a intenção é acentuar ou efetivar a ação farmacológica na musculatura, sistema vascular, etc. Esta ação requer absorção percutânea e deposição. Entretanto, existe um certo ceticismo quanto a validade deste tipo de terapia (37).

O caso de cosméticos aplicados topicamente é direcionado por regras regulamentares e demanda promocional. A princípio, o formulador irá tentar evitar a absorção sistêmica. Os efeitos cosméticos, evidenciados pela aparência visual, são preferivelmente restritos a superfície do estrato córneo. Assim, para a maioria dos cosméticos, adsorção (retenção) sobre ou no estrato córneo é desejável (95).

Publicitários, formuladores e entidades reguladoras pregam diferentes critérios para os componentes dos cosméticos, cuja finalidade é exaltar efeitos embelezadores e alcançar a camada da pele abaixo do estrato córneo. No entanto, existe uma certa discórdia em relação a possibilidade de alguns componentes do produto acabado penetrar pelo estrato córneo e alcançar a epiderme viável (95).

Em 1997, WALTERS e colaboradores (124) verificaram a penetração percutânea da N-nitroso-N-metildodecilamina, um contaminante de produtos cosméticos, com potencial carcinogênico em animais. Assim, para verificar o potencial de risco à exposição deste tipo de contaminante foi necessário estudar até que camada esta substância era absorvida percutâneamente. Comprovaram que sua penetração foi baixa, contudo pode ser afetada pelos diferentes veículos, local de aplicação e tempo de exposição, isto é, se o uso da formulação for duradouro ou retirado com lavagem.

No mesmo ano, ROPER e colaboradores (98) estudaram a penetração percutânea do 2-fenoxetanol, um conservante utilizado em formulações cosméticas, incluindo maquiagem para área dos olhos, blushes e pós-faciais e corporais. A atividade deste conservante é bastante eficaz apresentando também ação esporicida sobre o *B. subtilis*, *A. niger* e *P.*

pyocynola. Assim, como todas as substâncias antimicrobianas, torna-se potencialmente arriscado se alcançar o sistema circulatório.

SAH e colaboradores (100), estudaram a absorção percutânea do ácido láctico, e a influência das variações da formulação sobre esta absorção. A eficácia dos alfa-hidróxi-ácidos, grupo ao qual pertence o ácido láctico, depende do tipo e da formulação, podendo atuar no estrato córneo ou nas camadas mais profundas, como a epiderme viável.

Atualmente, têm sido desenvolvidos estudos de equivalência, comparando a atividade de diferentes marcas comerciais que usam o mesmo princípio ativo. DIAS e colaboradores (34) compararam três produtos que continham 3% de cafeína, variando o tipo de membrana e procurando fazer uma correlação entre a permeação através da epiderme viável e membranas sintéticas. Concluíram que o uso de promotores de absorção, contido em apenas uma das formulações é eficaz no aumento da permeação cutânea da cafeína, fármaco hidrófilo e que o uso de membranas sintéticas é eficaz no controle de qualidade do produto, porém não podem ser usadas como modelo único para estudar a permeação de fármacos, já que não possível detectar correlação entre elas e a epiderme humana.

No caso de sistemas transdérmicos é realizada a aplicação do fármaco à pele com o objetivo de tratar doenças sistêmicas. É importante alcançar níveis plasmáticos adequados na circulação sistêmica para que o fármaco seja ativo (37). No caso dos TTS de nitroglicerina, por exemplo, é interessante que esta atravesse rapidamente o estrato córneo e a epiderme viável alcançando a circulação sistêmica. Adsorção ou deposição em qualquer destas camadas é indesejável (95).

Quando comparada com a administração oral a rota transdérmica tem algumas vantagens. O trato gastrointestinal (TGI) apresenta um meio mais hostil à molécula do fármaco. O baixo valor gástrico de pH ou as enzimas presentes podem degradar o princípio ativo, ou a interação com alimentos e bebidas ou outros fármacos pode impedir a permeação deste através das paredes do TGI. Mesmo quando a substância atravessa a barreira, ela deve

primeiramente passar pelo fígado para ser metabolizada. A esta referimos como metabolismo pré-sistêmico ou efeito “primeiro passo” (28).

A via transdérmica desvia-se do TGI e não envia o fármaco diretamente para o fígado, conseqüentemente evitando o metabolismo pré-sistêmico. Contrariamente a uma formulação intravenosa, os produtos transdérmicos não são associados com agulhas e não requerem a supervisão de profissionais para sua administração. Isto aumenta a aceitação pelo paciente, permitindo que pacientes ambulatoriais deixem o hospital, mesmo quando estão usando medicação e abaixa custos relacionados com a saúde.

Para fármacos orais e parenterais com meia vida biológica curta, um transdérmico pode fornecer uma manutenção contínua dos níveis plasmáticos durante um período de tempo previsível. A aderência pelo paciente aumenta devido a redução da freqüência de administração além do efeito psicológico que a visualização da medicação causa, assegurando-o que a dose está sendo administrada. No caso de uma reação adversa ou overdose, o paciente tem a chance de simplesmente remover o sistema transdérmico sem necessitar de tratamentos agressivos como lavagens estomacais ou uso de antídotos (28).

Os transdérmicos têm suas limitações, sendo a pele a principal responsável. A aparência cosmética e o tamanho dos sistemas podem também afetar a aceitação por alguns pacientes. Irritação cutânea e sensibilização podem ocorrer, além de características pessoais de oleosidade, excesso de transpiração, ou mesmo alergia a cola, afetarem a aderência do sistema à pele do paciente. A comparação entre custo/benefício entre este tipo de sistema e sistemas orais, também pode caracterizar esta via como economicamente inviável (28).

Vários critérios devem ser levados em consideração para seleção de possíveis fármacos transdérmicos. Informações farmacocinéticas, ação do organismo sobre o fármaco, e farmacodinâmicas, ação do fármaco sobre o organismo; capacidade do fármaco de permear a pele, se este fármaco

atinge o “steady state” (fluxo contínuo); alcance de nível sanguíneo efetivo; efeito do metabolismo pré-sistêmico sobre o fármaco; dose de fármaco necessitada; estimativa do tamanho aceitável do sistema transdérmico; toxicidade cutânea (irritação e sensibilização); efeitos colaterais do fármaco; propriedades de difusão e solubilidade do fármaco e propriedades estéticas (28).

Em 1991, NIAZY (77) estudou a influência de alguns promotores de absorção sobre a diidroergotamina, um candidato potencial à administração transdérmica. A metodologia *in vitro* foi constituída de células de difusão de Franz e pele de coelho. O ácido oléico na concentração de 6% provou ser mais efetiva que a 10% e que os outros promotores de absorção.

ROY e colaboradores (99) comprovaram que um sistema transdérmico de buprenorfina seria capaz de alcançar efeito sistêmico desejável de analgesia. O estudo abrangeu o teste de diversas matrizes adesivas, com diversos veículos e promotores de absorção, chegando a um sistema terapêutico transdérmico (TTS) ideal de 20cm² com fluxo de 2,5 µg/cm².h que atinge a concentração mínima efetiva na circulação sanguínea.

MONTI e colaboradores (74), em 1995, concluíram que apesar da necessidade de estudos complementares em pele humana, os experimentos realizados indicavam a possibilidade de administração transdérmica de daprizol base, por meio de uma seleção apropriada de veículos e promotores de absorção.

A absorção transdérmica de uma série de fármacos antiinflamatórios não esteroidais foi estudada *in vitro*, utilizando a pele humana, por CORDERO e colaboradores (31) em 1996. O objetivo foi selecionar através dos parâmetros de permeação (constante de permeabilidade, LagTime e fluxo) qual dos fármacos seria mais adequado para aplicação em sistema terapêutico transdérmico. Considerando os perfis de permeação *in vitro*, o ketoralac demonstrou ser a melhor escolha.

Em 1998, MODAMIO e colaboradores (71), verificaram a viabilidade de dois β -bloqueadores, o celiprolol e o bisoprolol, para aplicação transdérmica. Foram feitos estudos *in vitro*, utilizando a pele humana e a célula difusora de Franz. Os principais parâmetros analisados (coeficiente de permeabilidade, fluxo e LagTime) demonstraram que há necessidade de estudos complementares, acrescentando promotores de absorção aos fármacos, já que estes não atingiram concentrações terapêuticas adequadas nas condições estudadas.

6. Ensaio para avaliação da absorção percutânea e dos mecanismos de ação dos promotores de absorção

A técnica experimental escolhida para medir a permeação cutânea depende principalmente do tipo de informação requerida, embora fatores externos como custo, tempo necessário e recursos disponíveis devam também ser considerados (38).

Os estudos *in vivo* em humanos nos fornecem informações mais diretas, relevantes e conclusivas, sobre a permeação cutânea. Se o objetivo do estudo for medir a biodisponibilidade sistêmica ou potencial tóxico, então amostras de sangue, de urina ou outro fluido corporal apropriado são necessários. No entanto, as quantias que penetram na pele são freqüentemente pequenas, requerendo métodos muito sensíveis para sua quantificação. Se um composto radioativo é empregado, apenas seguir sua rota, pode levar a erros, pois este pode ser carregado por um metabólito ao invés do composto empregado (38).

No estudo da absorção cutânea de compostos tóxicos, considerações éticas tornam aconselhável realizar os testes *in vitro* evitando-se colocar seres humanos em risco. Outras vantagens dos estudos *in vitro* são os baixos custos e a capacidade de testar grande número de formulações em relativo pouco tempo. Utilizando modelos selecionados cuidadosamente e condições experimentais apropriadas é possível examinar formulações candidatas, assim como testar os efeitos de vários ingredientes na

penetração cutânea. Os dados *in vitro* podem também ser utilizados para identificar qual camada da pele age como barreira para um determinado componente (38).

A ausência de metabolismo é um fator limitante em muitos estudos *in vitro*. Informações da conversão e transporte metabólico são necessárias para avaliação do risco, assim como a determinação do local onde os pró-fármacos são convertidos em compostos ativos durante a passagem através da pele. Algumas vezes, chama-se este efeito como metabolismo pré-sistêmico, análogo ao metabolismo dos compostos que passam pelo fígado antes de alcançarem a circulação geral seguido da absorção oral. Em alguns casos, particularmente envolvendo compostos com baixa solubilidade aquosa, transformações químicas ou biológicas aumentam a velocidade de penetração através da pele, reduzindo-se a ligação do permeante em tecidos abaixo da camada córnea (38).

No caso de não ser possível ou aconselhável conduzir um estudo *in vivo* usando seres humanos voluntários, deve-se utilizar trabalhos *in vitro* ou modelos animais (38).

As vantagens de pequenos animais de laboratório, como ratos, camundongos e coelhos, são os custos relativamente baixos, a pronta disponibilidade e a boa uniformidade, pois é possível obter animais isogênicos. No entanto, seu pequeno volume sanguíneo, algumas vezes limita o número de amostras que podem ser retiradas. Além disto, por causa de diferenças entre as espécies na espessura e construção do estrato córneo, a pele de animais comuns em laboratórios tende a ser, muitas vezes, mais permeável que a pele humana. No geral, a quantidade absorvida pelo animal representa o máximo; para compostos tóxicos, é a pior situação (38).

Com animais maiores, é possível realizar uma série de experimentos individuais. Isto facilita a comparação de diferentes formulações ou tipos de aplicação do mesmo composto, já que cada animal funciona como seu próprio controle. No entanto, a manutenção de macacos, por exemplo, é um

fator limitante que impede o seu uso indiscriminado, apesar de tantas facilidades (38).

Um dos problemas com a substituição de humanos por animais é que podem existir diferenças significantes de caminhos metabólicos para um determinado componente. Isto dificulta a extrapolação de resultados de animais para humanos (38).

A maior suposição feita nos estudos *in vitro* é que o estrato córneo é um fator limitante à permeação. Já que o estrato córneo é uma camada morta, a remoção da pele de organismos vivos não altera as propriedades barreira da pele. A possibilidade do metabolismo na pele é freqüentemente ignorada, embora progressos têm sido feitos para obter experimentos *in vitro* nos quais a viabilidade da membrana é mantida por um tempo razoável (38). Em 1998, WESTER e colaboradores (125), realizaram esses estudos e comprovaram que quando armazenada em meio apropriado, isto é, uma solução contendo aminoácidos e sais minerais balanceados, a pele mantinha-se viável e sem danos para sua integridade, inclusive a metabólica, por até oito dias.

6.1. Métodos de estudo de permeação percutânea *in vivo*

Um problema comum na determinação da biodisponibilidade-bioequivalência de fármacos aplicados topicamente é sua quantificação no organismo (pele e/ou circulação sistêmica), pois quantidades absolutas presentes são geralmente mínimas. Entretanto, os estudos de penetração *in vivo* (após aplicação tópica) têm como principais objetivos (113):

- Verificar e quantificar a biodisponibilidade dos fármacos aplicados topicamente;
- Verificar e quantificar a biodisponibilidade sistêmica de fármacos aplicados transdêrmicamente;

- Estabelecer a bioequivalência de diferentes formulações contendo o mesmo fármaco;
- Determinar a incidência, e se necessário, quantificar o risco toxicológico sistêmico decorrido da aplicação tópica de determinado fármaco.

A investigação sistemática da permeabilidade da pele humana começou após 1950. Os primeiros estudos eram um pouco diferentes dos atuais, porém eram efetivos em demonstrarem os limites e a permeação variável da pele (38).

Vários métodos foram protocolados para a determinação da permeação de fármacos através da pele, um grande número de detalhes deve ser especificado, antes do início dos testes, como por exemplo, local de aplicação, dose, tempo de aplicação além do tempo e intervalo de coleta das amostras, pois estes parâmetros afetam os resultados (38).

O antebraço é o local de aplicação mais freqüente porque é conveniente para ambos, o pesquisador e o voluntário, além de poder ser facilmente protegido contra a remoção da amostra testada com protetores apropriados.

BONINA e colaboradores (17), estudaram a atividade antiinflamatória de ésteres de indometacina como pró-fármacos em estudos *in vivo* e *in vitro*. O experimento *in vivo* foi conduzido com seis voluntários de ambos os sexos com idades entre 25-35 anos. Foi aplicado o gel no antebraço dos voluntários, contendo o éster anteriormente selecionado através dos estudos *in vitro*, porém previamente eram aplicados nicotinato de metila como indutor de eritema.

ROLLAND e colaboradores (97), verificaram os efeitos do adapalene *in vitro* e *in vivo*, utilizando-se voluntários humanos. A especificidade deste fármaco pelos folículos pilosos foi evidenciada após a aplicação no antebraço, seguida de posterior biopsia.

Em relação ao contato da pele com substâncias ativas, a determinação de danos a barreira cutânea é um fator crítico a ser analisado, pois a maioria das preparações tópicas requerem múltiplas aplicações no mesmo local, podendo ocorrer danos pela exposição crônica. Além disso, aplicações repetidas podem levar a mudanças no perfil da absorção cutânea (38).

A concentração do fármaco e a dosagem de aplicação de sua formulação devem ser cuidadosamente consideradas. Para obtenção de dados confiáveis, a concentração do fármaco deve ser semelhante à de formulações comerciais ou da concentração efetiva, no caso de produtos em desenvolvimento. Quando a concentração do fármaco é fixada, a dose total aplicada na pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) é uma função da quantidade de formulação aplicada. Dados relevantes só podem ser obtidos quando a dose da formulação aproxima-se da condição real de uso. Para cremes e pomadas, foi observado que voluntários geralmente aplicam 2-3mg do produto por cm^2 de pele (38).

O tempo de aplicação também deve ser considerado de acordo com o produto testado, sendo o tempo de permanência semelhante a condições reais. Recomenda-se um tempo de experimento de 24 horas. Porém existem variações como no caso do ácido retinóico, onde o produto permanece apenas 8-12hs, sendo retirado pela manhã, para evitar exposição solar. Produtos como xampus e condicionadores também apresentam tempo de contato muito menor (38).

A frequência da aplicação e o tempo total de retirada de amostras são importantes para determinação da cinética real de absorção. A coleta de fezes é necessária quando esta via for a principal via excretora do composto estudado (38).

É importante ressaltar que a princípio, os mais relevantes dados da absorção cutânea no homem *in vivo* são obtidos através de estudos feitos em humanos. No entanto, modelos animais são necessários para o desenvolvimento de conceitos esclarecedores e investigações dos

mecanismos. Os animais escolhidos devem responder ao tratamento do mesmo modo e no mesmo grau de intensidade que o homem, o que nem sempre é possível, decorrendo a necessidade de extrapolação de resultados que podem levar a erros. Testes em produtos dermatológicos e estudos toxicocinéticos e de segurança devem, quando possível, serem feitos na mesma espécie (113).

Em 1998, PORZIO e colaboradores (90), verificaram a eficácia de uma formulação em gel-nebulizado contendo cetoprofeno, com o objetivo de analisar sua atividade farmacológica após a permeação percutânea. Estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados em ratos.

Os estudos de penetração e absorção de fármacos devem ser diferenciados entre tópicos ou transdérmicos; entre estudos toxicológicos ou de toxicocinética e entre estudos de desenvolvimento ou estudos clínicos. Todas as técnicas devem considerar os benefícios e usarem metodologia analítica radioativa ou não radioativa.

Pode-se verificar os níveis do fármaco principalmente de quatro formas: na pele; na circulação periférica ao sítio de aplicação; na circulação sistêmica; e nas excreções ou secreções como suor e saliva. Princípios de farmacocinética podem ser usados quando a concentração do fármaco é seguida através de determinado tempo. Comparando-se parâmetros do "clearance" obtidos após administração intravenosa com aqueles após aplicação tópica ou transdérmica, pode-se estimar a biodisponibilidade sistêmica do fármaco. Utilizando-se este método é possível inclusive quantificar diferenças entre aplicações em pele saudável e patológica (113).

No método da excreção urinária assume que as rotas de excreção depois da aplicação intravenosa são iguais para a rota de aplicação dérmica. Considerando-se que 75% das moléculas do fármaco que passaram para a circulação sistêmica através da via intravenosa são excretadas na urina, então 75% das moléculas do fármaco que penetraram percutaneamente são excretados pela urina. Porém, alguns pontos devem ser levados em

consideração quanto ao metabolismo ocorrido na pele e podem alterar o fármaco deixando algumas dúvidas em relação a este método (38).

YAMASHITA e colaboradores (130), sugeriram em 1993, um novo método de análise dos dados obtidos da penetração cutânea *in vivo* e *in vitro*, utilizando um modelo difusional de duas camadas com caminhos polares e não polares no estrato córneo. Em ambos os estudos foram usados ratos e a coleta de amostras foi feita na urina.

Embora a determinação dos níveis sanguíneos seja um componente essencial nos estudos envolvendo outras rotas de administração, sua utilidade em estudos envolvendo fármacos tópicos é problemática, já que a absorção é baixa e lenta. Sua determinação é difícil porque necessita de aparelhos de alta precisão e sensibilidade. A técnica de radioimunoensaio pode ser empregada, assim como o uso de isótopos estáveis (não radioativos) que podem ser medidos com o uso de espectroscopia de massa, após o isolamento analítico pelo cromatógrafo (38).

NISHIHATA e colaboradores (78), verificaram *in vivo* a absorção percutânea do diclofenaco em um gel aquoso. O estudo feito em ratos e humanos determinou a quantidade do fármaco permeado através de análises de plasma sanguíneo, além de caracterizar o que ficou retido na pele de rato. SEKI e colaboradores (110) analisaram em plasma de rato o AZT aplicado na pele.

O método de balanço de massa é uma modificação do método da excreção urinária, que tem a vantagem de detectar todo material tópico aplicado. Compostos radioativos são aplicados nos antebraços de voluntários na concentração de $4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sendo a absorção percutânea medida pela excreção dos radioativos na urina acrescidos dos excretados por outras rotas (38). Em animais procedimento semelhante foi utilizado por REIFENRATH e colaboradores (94) que compararam a penetração percutânea e a retenção cutânea de compostos radioativos, *in vitro* e *in vivo*, utilizando porcos como modelo animal.

O método de "tape stripping" do estrato córneo quantifica a absorção total através da análise do estrato córneo. Foi demonstrado que a absorção total pode ser bem estimada através do "tape stripping", analisando-se o estrato córneo 30 minutos após a aplicação do fármaco estudado. Além disto, a precisão da técnica é independente dos fatores conhecidos por influenciarem a absorção percutânea. Tais complicações como variação na dose, veículo, tempo de aplicação ou diferenças anatômicas não invalidam o método sendo útil tanto em humanos como em animais.

A base da técnica é bem simples e segue os princípios das propriedades do estrato córneo como barreira. Devido a fina espessura da barreira e baixa difusibilidade, ocorre a retenção das espécies permeadas por um período de tempo. Assim, após aplicação da amostra na pele, existirá um período de tempo durante o qual aquela fração que foi partilhada no estrato córneo estará totalmente contida nele. Assim removendo as camadas quantitativamente antes que ocorra perda significativa para as camadas mais profundas, pode-se medir a absorção total (38).

Em 1996, TREFFEL e GABARD (119), investigaram a penetração cutânea e o fator de proteção solar de filtros ultravioleta em dois veículos diferentes. Os estudos foram conduzidos *in vivo* e *in vitro*. O método do "tape stripping" foi utilizado para determinar as concentrações retidas no estrato córneo.

Enquanto outras técnicas focam a quantificação da absorção total ou o nível de absorção, a secção da pele foi primeiramente designada para a determinação da relação entre o fármaco e o perfil deste com a pele (38). Secionar a pele significa cortar, separando as camadas constituintes com objetivo de realizar ensaios independentes para quantificação do fármaco (113).

Após a aplicação tópica do fármaco de interesse por um período definido de tempo, a superfície é cuidadosamente limpa para remover todo material não absorvido. A camada córnea é então removida por múltiplos "tape-stripping" e, sob anestesia local, a biopsia é feita, retirando-se inclusive

o tecido subcutâneo. A amostra biopsiada é imediatamente congelada e cortada utilizando-se o criomicrotômo, em seções de 10-40 microns paralelamente a superfície da pele.

Desde que a eficácia da terapia tópica é dependente da capacidade do fármaco de atingir as camadas adequadas da pele, a técnica acima é útil para a determinação da habilidade da formulação de alcançar o nível desejado. Diferenças ocorrem entre experimento *in vivo* e *in vitro*, já que a microcirculação pode afetar o conteúdo do fármaco na derme, apesar de não influir na velocidade de absorção (38). Por outro lado, técnicas não invasivas foram desenvolvidas como a de PIROT e colaboradores (89), que desenvolveram em 1998, um método para determinar a relação entre a espessura do estrato córneo e a difusibilidade aparente da água, de forma quantitativa e não invasiva. Peles de voluntários humanos foram analisados utilizando um aparelho o que mede a perda de água transepidermal.

Na técnica de enxerto, um tecido é separado, através de cirurgia, de tal forma que os vasos sanguíneos que alimentam e drenam este tecido, possam ser diretamente acessados. Peles humanas transplantadas em modelos animais também podem estar envolvidos. São úteis para avaliação dos mecanismos, como por exemplo, o metabolismo na derme, a distribuição cutânea e os efeitos da circulação sanguínea na absorção percutânea, os quais não são geralmente fáceis de serem estudados. Esta técnica, porém é relativamente cara, necessitando de tempo, treinamento e intenso trabalho laboratorial. Os animais usados como base para os transplantes devem ser mantidos sob constante tratamento com imunossuppressores, cujo efeito sob a barreira ainda não foi totalmente esclarecido (113).

Em 1989, PERSHING e colaboradores (88), verificaram a influência do etanol na permeação do estradiol utilizando um enxerto onde a pele humana obtida de cirurgia plástica abdominal foi inserida no abdômen do rato sem pelos sendo depois transferida para seu dorso, onde foram realizados os experimentos.

MÜLLER e colaboradores (75), verificaram as concentrações de diclofenaco nas diferentes camadas da pele após administração tópica. Foi utilizado o método da microdiálise em 20 voluntários saudáveis e, após a aplicação de uma dose única de 300mg/100cm², foram monitorados os perfis de concentração nas camadas da pele por 5 horas. Concluíram que a penetração transdérmica do diclofenaco, pelo menos após aplicações em dose única, não é previsível e pode ser extremamente influenciada por propriedades individuais da pele.

SAIJA e colaboradores (101), procuraram evidenciar a influência de diferentes promotores de absorção no efeito fotoprotetor de flavonóides *in vivo*. Este efeito foi observado em voluntários humanos através de ATR-FTIR.

6.2. Métodos de estudo da permeação percutânea *in vitro*

A absorção de substâncias através da pele pode ser medida pelas técnicas *in vivo* ou *in vitro*. O passo limitante, no processo de permeação percutânea, parece ser a difusão passiva das substâncias através da camada córnea. Para compostos hidrófilos, o estrato córneo é o fator limitante, e para os compostos lipofílicos é a epiderme viável (20).

A absorção tem sido freqüentemente medida por técnicas *in vitro* devido a facilidade das condições experimentais. Pode-se retirar amostras com precisão da célula de difusão, contrariamente ao que acontece em experimentos *in vivo* onde a amostragem seja sangüínea, coleta de urina ou de fezes é sempre mais difícil. Os estudos *in vitro* podem otimizar ou eliminar o uso de animais promovendo o uso de tecidos humanos ou membranas sintéticas.

Em 1988, SASAKI e colaboradores (106) realizaram estudos *in vivo*, com ratos albinos, visando comparar o efeito promotor de derivados de pirrolidona. Previamente haviam sido feitos estudos *in vitro* como forma de selecionar os derivados de maior potencial promotor.

A pele humana é única em termos de barreira e propriedades metabólicas sendo a mais indicada para tais estudos, porém nem sempre está disponível. Compostos potencialmente tóxicos freqüentemente só podem ser estudados pelas técnicas *in vitro* (20).

Para os pesquisadores da área cosmética, a absorção de ingredientes na pele e através dela, podem ser de maior importância. De uma maneira geral, para objetivos cosméticos não se deseja uma penetração excessiva, mas sim uma ação local ou no máximo na epiderme viável. Para aumentar a função barreira do estrato córneo, isto é, diminuir a penetração são usados os chamados redutores de penetração que agem minimizando a permeação dos princípios ativos (52).

Embora muitas formas diferentes de células tenham sido utilizadas para os estudos de difusão, existem somente dois tipos principais: as células de um compartimento e as de dois compartimentos. Cada tipo tem sua utilidade nos estudos de permeação cutânea (20).

Variações das células de dois compartimentos têm sido usadas durante anos para criar condições em que a difusão de uma substância em solução pode ser medida de um lado da membrana para outro. Considerando-se dose infinita, aquela que é suficientemente alta para manter constante a concentração durante o experimento, sendo adicionada a um lado da membrana, e a sua constante de difusão determinada através de um gradiente de concentração em uma solução. Normalmente as soluções dos dois lados são agitadas para garantir uniformidade de concentração (20).

As células de dois compartimentos são úteis para estudar os mecanismos de difusão através da pele. É também aplicável para medir a absorção de sistemas de liberação de fármacos onde os compostos são aplicados na pele em doses infinita e um fluxo constante (20).

A exposição da pele a substâncias permeantes ocorre sob condições diferentes daquelas criadas pelas células de dois compartimentos. Algumas

substâncias são intencionalmente aplicadas na pele sob a forma de loção ou creme durante o uso de produtos cosméticos ou farmacêuticos. Outras substâncias químicas, freqüentemente de interesse toxicológico, entram em contato com a pele em uma variedade de veículos no nosso ambiente. Freqüentemente, o total de substância penetrada na superfície da pele é relativamente baixa, finita, e o processo de permeação difícil, assim atingir o fluxo constante não é uma meta freqüentemente alcançável (20).

Para estes exemplos, absorção de substâncias químicas através da pele só podem ser estudadas em células de uma câmara. A superfície da pele, neste tipo de célula está aberta para o meio ambiente, assim sendo camadas finas do material podem ser aplicadas em veículos utilizados para aplicações *in vivo*. A pele não fica excessivamente hidratada pela contínua exposição à solução aquosa como acontece nas células de dois compartimentos (20).

Os dois tipos básicos de células são podem ser classificados em fluxo estático e contínuo.

Nas células de fluxo estático, o compartimento abaixo da pele serve como um reservatório para o fluido receptor o qual está sob contínua agitação; as amostras são retiradas através de um braço lateral para conseqüente determinação dos níveis de absorção. Se necessário, doses infinitas podem ser também aplicadas na pele em células de um compartimento para a determinação da cinética de absorção. A técnica da dose finita e o projeto da célula de difusão estática foram descritos por Franz (20).

Um sistema de fluxo contínuo foi introduzido por BRONAUGH e STEWART (22) em 1984, para automatizar a coleta das amostras nas células de um compartimento. Este sistema também facilita a manutenção da viabilidade da pele, já que o fluido receptor nutriente é continuamente renovado. O fluido receptor é alimentado através de um receptor com volume de 0,13 a 0,26 mL, dependendo da superfície da área da célula de difusão. Este pequeno volume leva o conteúdo receptor a ser

completamente bombeado com um fluxo de 1,5 mL/h ou maior. O uso deste tipo de célula conduz a obtenção de valores mais reais em comparação com as condições *in vivo*, principalmente para compostos com limitada hidrosolubilidade, já que as células imitam os efeitos da circulação sanguínea através da pele, carregando estes compostos assim que penetram na epiderme (22).

Atenção especial é necessária ao medir a permeabilidade de compostos altamente voláteis quando a pele não está oclusa para prevenir a evaporação. As pequenas paredes no alto de algumas células de difusão podem proteger a superfície da pele das correntes e foi sugerido que esta proteção pode ser responsável pelas diferenças dos resultados entre *in vivo* e *in vitro* (20).

As células de difusão *in vitro* devem ser feitas com material inerte e não reativo como vidro ou teflon (118). Frequentemente, as células de vidro necessitam de ajustes assim a pele deve ser colocada entre as duas partes de vidro e presas com uma pinça de metal. Anéis de borracha circulares não devem ser usados já que podem absorver as substâncias lipofílicas. Anéis de teflon resolvem este problema, porém uma solução melhor é o uso de anéis circulares fixos ou uso de anéis de silicone. Um selo fino pode ser obtido, e um pequeno pedaço de pele pode ser usado (73).

Em 1987 foi realizado um "Workshop", com o objetivo de normatizar os estudos de penetração percutânea *in vitro* (118). Estes estudos são principalmente utilizados como procedimentos de controle de qualidade para caracterização da formulação; como estudos para verificação da liberação e permeação *in vitro* de fármacos durante o processo de desenvolvimento de novos produtos; para estabelecer a liberação de fármacos de formulações tópicas e permitir reformulações menores de produtos tópicos nos quais a bioequivalência e a biodisponibilidade já foram definidas.

No mesmo encontro foram definidos alguns termos básicos aplicados a este tipo de estudo. Assim, a absorção percutânea deduz a permeação de agentes através da epiderme e das camadas mais profundas da pele e na

circulação sistêmica *in vivo*, um processo completo que inclui ao transporte através da pele e o clearance local. A permeação cutânea, por outro lado, relata apenas a primeira parte do processo, isto é, a difusão através da pele (118).

Na absorção percutânea tanto a difusão quanto o clearance podem ser, a princípio, o fator controlador; no entanto, com poucas exceções, a permeação na pele é o evento determinante. Neste contexto, a absorção percutânea é usada conjuntamente com permeação cutânea sendo limitada aos eventos de difusão associados com a liberação transdérmica (118).

Alguns fatores devem ser considerados em estudo *in vitro* que geralmente não afetam os estudos *in vivo*.

6.2.1. Preparo da membrana

A preparação da pele para o uso em células de difusão é um importante passo para o estudo da absorção percutânea *in vitro*. Sendo a absorção considerada um processo passivo, a constante de penetração depende da espessura da barreira (23).

Quando a pele humana ou a pele animal são usadas como membranas nas células de difusão, elas devem ser fracionadas de tal forma que a hipoderme e parte da derme sejam removidas, já que em alguns casos, não interferem com a penetração da substância. Este procedimento é particularmente importante para compostos hidrófobos, para os quais a epiderme viável e a derme, devido a sua natureza aquosa, oferecem significativa e, muitas vezes, a primeira resistência à permeação (21).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo



Figura 10. Pele humana obtida de cirurgia plástica de redução de mama - vista da superfície externa.

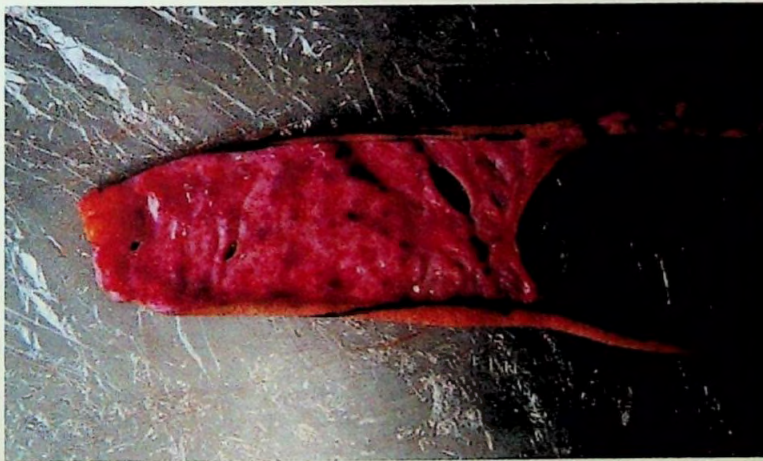


Figura 11. Pele humana obtida de cirurgia plástica de redução de mama - vista da superfície interna.

Para animais com a pele muito fina como coelhos e camundongos, a remoção da derme não é relevante, podendo o teste ser realizada com a pele íntegra para não danificar a membrana.

A aplicação de calor é um processo relativamente simples que pode ser usado para separar a epiderme da derme na pele de humanos ou de animais sem pêlos. Este método, porém é ineficaz quando se deseja estudar o metabolismo cutâneo. A pele é imersa em água aquecida a 60°C, por aproximadamente 1 minuto, e a epiderme pode ser descolada da derme. Pêlos que permanecerem na derme, se presentes, deixarão orifícios na pele (20).

Mergulhando a pele em solução 2M de brometo de sódio ou tiocianato de sódio, a junção derme-epiderme é relaxada e os pêlos permanecem na epiderme quando esta é retirada. A epiderme dos roedores de laboratório é extremamente frágil, especialmente após a hidratação que ocorre quando do uso deste método (16).

Uma técnica viável, tanto para peles humanas quanto animais, é a separação utilizando-se o dermatômetro. Os pêlos são cortados e separados, permanecendo nos folículos, assim não ocorrem orifícios na epiderme. Fatias dermatomizadas de 200 a 350 μm da superfície da pele têm sido usados rotineiramente. Uma fatia mais fina (200 μm) pode ser preparada, sem danos para a barreira protetora, quando a pele sem pêlos é usada, como por exemplo, a pele humana e ratos sem pêlos (21).

Em 1998, WESTER e colaboradores (125), como já foi citado anteriormente, verificaram os efeitos do congelamento e da separação por calor na viabilidade da pele de cadáver humano na absorção percutânea *in vitro*. Concluíram que ambos os processos afetam a viabilidade da pele e sugeriram a separação pelo dermatômetro, seguido de estocagem em meio de cultura apropriado, o procedimento mais indicado para manutenção da pele utilizada em estudos de difusão.

6.2.2. Escolha do fluido receptor

A seleção do fluido receptor tornou-se um importante fator para o pesquisador recriar condições semelhantes às situações *in vivo*. Para medir a absorção de compostos solúveis em água, o uso de soluções salinas ou tampões isotônicos pode ser suficiente. Foi demonstrado que algumas substâncias são metabolizadas significativamente durante o processo de absorção percutânea. A viabilidade da pele pode ser mantida por 24 horas em células de difusão contínuas usando-se tampão fisiológico como fluido receptor. O metabolismo e a absorção percutânea podem ser medidos simultaneamente, fornecendo um quadro mais completo sobre a absorção (20).

Muitos membros de uma importante classe de substâncias como as fragrâncias, pesticidas e produtos derivados do petróleo são altamente lipofílicos, portanto permeam e se difundem no estrato córneo. A medida da absorção percutânea de tais substâncias *in vitro* requer a escolha de um fluido receptor adequado, freqüentemente, através de tentativa e erro. Quando aplicadas *in vivo* estas substâncias hidrófobas penetram facilmente na camada córnea, sendo prontamente carregadas pela corrente sangüínea. Porém isto não ocorre em experimento *in vitro*, onde os compostos absorvidos não sofrerão partição do estrato córneo para a solução salina ou para o tampão isotônico, fornecendo uma idéia equivocada de que a substância não penetrou na camada córnea (20).

Uma alternativa seria o uso de plasma de coelho ou de solução de albumina sérica, porém estas são menos efetivas do que os tensoativos não iônicos ou do que os solventes orgânicos. O fluido receptor mais efetivo, com o mínimo risco para a integridade da pele, é uma preparação com o tensoativo não iônico, o éter oleil polietilenoglicol 20 (20).

A escolha cuidadosa do fluido receptor é importante para que se evite danos a propriedade barreira da pele. As substâncias que aumentam a partição de compostos hidrófobos podem também remover os constituintes da pele solúveis em lipídeos. Uma solubilidade na água menor que

aproximadamente 10mg/L em combinação com uma boa lipossolubilidade, indica um problema potencial para uma célula de difusão com fluido receptor aquosos padrão (21). Pode-se contornar o problema do meio receptor, utilizando-se as células de fluxo contínuo (118). O uso de um fluido receptor lipofílico pode destruir a atividade metabólica da pele (20).

O volume receptor pode variar conforme o diâmetro da abertura para amostra de pele. Este volume para a célula de Franz com 7mm é de 3,8 mL e 5,4 mL para a de 9mm. Este volume pequeno, menor que 5 mL, é ideal pois pode ser completamente esvaziado durante o intervalo de coleta de amostra. Como regra geral, o valor numérico do fluxo deve ser cerca de 5 a 10 vezes àquele do volume do receptor (por exemplo, 0,5mL de fluido receptor necessita de um fluxo de pelo menos 2,5mL/h). Muito freqüentemente, pesquisadores modificam a célula de Franz de um compartimento, com volume receptor de 5 mL, e propulsionam o fluido receptor através da célula a 1 ou 2 mL/h. Nestas situações, o conteúdo do receptor não é removido rapidamente da célula após a absorção através da pele. Poderá ocorrer imprecisão no tempo de absorção, com a absorção de um composto químico ocorrendo mais tardiamente do que normalmente ocorreria (73).

Para a maioria dos estudos, uma solução tampão isotônica com valor de pH 7,4 é o fluido receptor desejável, que pode ser modificado quando justificado. Para todos os casos, a atividade termodinâmica do fármaco no fluido receptor não deve exceder de 10% no compartimento doador, assim mantendo uma força favorável à permeação e assegurando uma coleta razoável e eficiente de amostra (118).

6.2.3. Agitação do conteúdo no compartimento receptor

A maioria dos sistemas de difusão apresenta um sistema de agitação do fluido receptor acoplado. Este impede que a interface entre o fluido receptor e a pele sature-se, ocasionando redução na quantidade de substância penetrada na pele (20). Os agitadores normalmente utilizados

são barras magnéticas misturadoras, entretanto versões melhoradas da célula original de Franz permitem melhor homogeneidade, portanto regiões que antes não eram acessadas pelo misturador, como a região logo após a membrana, são alcançadas.

6.2.4. Manutenção da temperatura da pele

A difusão de moléculas através da pele é dependente da temperatura. Os estudos de absorção percutânea *in vitro* são conduzidos em uma faixa entre a temperatura ambiente de 22°C e superiores que 37°C na superfície da pele. Embora a temperatura corpórea seja de 37°C a sua superfície apresenta-se ligeiramente mais fria, pois dependem também da temperatura ambiente durante o decorrer do ano. As células devem estar submersas em um banho-maria cuja temperatura é exatamente a desejada no experimento. Para as células que forem montadas sob placas de aquecimento, estes devem estar alguns graus acima do requerido, assim para 32°C na pele deve-se aquecer a placa a 35°C (20). Pode-se manter a temperatura de várias maneiras, como por exemplo, mantas aquecidas ou fluxo de água quente através das células (73).

6.2.5. Oclusão / Aplicação aberta

Este fator deve seguir o uso normal do produto a ser testado. Assim para formulações aplicadas normalmente, os estudos preferencialmente devem ser feitos em aberto. Já nos casos de sistemas transdérmicos a oclusão é um fato, assim os experimento devem ser levados sob esta condição (118).

Em 1992, ROLLAND e colaboradores (96), pesquisaram a influência do fluido receptor, da oclusão e da formulação na liberação de fármacos *in vitro*, utilizando uma célula de fluxo contínuo. Concluíram que para

substâncias lipofílicas, tais parâmetros têm um importante papel na sua liberação e conseqüente penetração.

MATERIAL E MÉTODOS

Material e Métodos

1. Material

1.1. Matérias primas

- Diclofenaco de sódio, grau de pureza farmacêutico, obtido da Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos.
- Óleo de pequi, grau de pureza farmacêutico, obtido da FARMA SERVICE-ION QUÍMICA.
- Papaína, atividade 30000 USP - U/mg, grau de pureza farmacêutico, obtido da MERCK S.A. Indústrias Químicas.
- Cloridrato de L-Cisteína Anidra, grau de pureza analítico, obtido da Labsynth.
- Carbopol® Ultrez™ 10 - derivado carboxivinílico.
- Água destilada.

1.2. Reagentes

- Metanol, grau de pureza analítico, para CLAE (MERCK).
- n-propilparabeno, grau de pureza farmacêutico, obtido da Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos.

- Meio de Eagle com solução de Earle balanceada de sais (MEM), "Minimum Essencia Medium" - GIBCOBRL.
- Sulfato de gentamicina, grau de pureza farmacêutico, obtido da DEG - Imp. Prod. Quim. LTDA, origem: China.
- Pele obtida de cirurgia plástica de redução de mama.
- Ácido acético glacial (aproximadamente 1,05), grau de pureza analítico, obtido da MERCK.
- Hélio para degaseificação dos eluentes.
- Água para injeção.
- Substância química de referência: Diclofenaco de Sódio, teor 100% (padrão secundário, sem anterior purificação), ANR: 06 -131453, validade 01/2002, obtido da NOVARTIS.

1.3. Equipamentos

- Células de Franz modificada. Dimensões: 15mm de diâmetro, 80mm de altura, capacidade 12mL.
- Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência - Shimadzu LC-10 AD com 3 bombas.
- Detetor UV -VIS - Shimadzu SPD - 10 A.
- Integrador - Shimadzu Communications BUS Module - CBM 10 A (versão 3,84).
- Auto-injetor - Shimaduz Auto injector - SIL - 10 A (dotado de loop de 50 μ L).
- Coluna cromatográfica Econosil C-18 5 μ m, 250mm de comprimento, 4,5 mm de diâmetro interno) - All Tech.

- Pré - coluna Econosil C18 - 7 μ m.
- Software Class- LC10 (versão 1,61).
- Banho de Ultra-som - Thorton T14.
- Agitador mecânico de tubos - Phonex modelo - AT 56.
- Balança analítica - E. Mettler, tipo H15, capacidade 160g, Swiss Made.
- Micropipetas automáticas ajustáveis:
 - Gilson - Pipetman, modelo P1000, capacidade 1000 μ L.
 - Finnpiette - pipeta automática capacidade 40-200 μ L.
- Banho de água termostaticado - Forma Scientific.
- Centrífuga - Fanem LTDA, modelo 208N.
- Agitador magnético - Multistirrer - MS101 - IUCHI.
- Filtro Milli Q - Millipore Acamedic.
- Filtro Sartorius - CE Minisart RC4, poro 0,45 μ m, diâmetro da superfície filtrante 4mm.

1.4. Formulações Avaliadas

1.4.1. Óleo de Pequi 5% p/p

Componentes	%p/p
<input type="checkbox"/> Ultrez [®] Carbopol	0,50
<input type="checkbox"/> Diclofenaco de sódio	1,50
<input type="checkbox"/> Óleo de pequi	5,00
<input type="checkbox"/> Água destilada qsp	100

1.4.2. Óleo de Pequi 10% p/p

Componentes	%p/p
<input type="checkbox"/> Ultrez [®] Carbopol	0,50
<input type="checkbox"/> Diclofenaco de sódio	1,50
<input type="checkbox"/> Óleo de pequi	10,00
<input type="checkbox"/> Água destilada qsp	100

1.4.3. Papaína 0,2% p/p

Componentes	%p/p
<input type="checkbox"/> Ultrez [®] Carbopol	0,50
<input type="checkbox"/> Diclofenaco de sódio	1,50
<input type="checkbox"/> Papaína	0,20
<input type="checkbox"/> Cloridrato de Cisteína	0,04
<input type="checkbox"/> Água destilada qsp	100

1.4.4. Papaína 0,05% p/p

Componentes	%p/p
<input type="checkbox"/> Ultrez®Carbopol	0,50
<input type="checkbox"/> Diclofenaco de sódio	1,50
<input type="checkbox"/> Papaína	0,05
<input type="checkbox"/> Cloridrato de Cisteína	0,01
<input type="checkbox"/> Água destilada qsp	100

1.4.5. Associação óleo de pequi 7,5% e papaína 0,1% p/p

Componentes	%p/p
<input type="checkbox"/> Ultrez®Carbopol	0,50
<input type="checkbox"/> Diclofenaco de sódio	1,50
<input type="checkbox"/> Óleo de pequi	7,50
<input type="checkbox"/> Papaína	0,10
<input type="checkbox"/> Cloridrato de Cisteína	0,02
<input type="checkbox"/> Água destilada qsp	100

1.4.6. Solução saturada de diclofenaco de sódio

Componentes	%p/v
<input type="checkbox"/> Diclofenaco de sódio	2,5
<input type="checkbox"/> Água destilada qsp	100

2. Métodos

2.1. Preparação da curva de calibração para Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

Foram exatamente pesadas cerca de 50 mg de diclofenaco de sódio, com pureza de 100%, considerados como padrão secundário e transferidos para um balão volumétrico de 50mL. Adicionaram-se 30mL de Minimum Essencial Medium (MEM) com sal de Earle e l-glutamina acrescentado de 50µg/mL de gentamicina (125), agitando-se durante 1 minuto em banho de ultra-som. Completou-se o volume com o mesmo solvente e obteve-se uma solução com concentração analítica de 1mg/mL. A seguir foram feitas as diluições em concentrações adequadas para a construção da curva de calibração.

As concentrações das soluções-mãe estudadas para a confirmação dos limites de detecção com fins cromatográficos foram:

- 1mg/mL sol.1
- 100µg/mL sol.2
- 10µg/mL sol.3
- 1µg/mL sol.4

Tabela 1. Concentrações do diclofenaco de sódio para determinação da curva de calibração para CLAE.

Tubo	Concentração por tubo (ng)	Solução do padrão	Vol. de MEM* (μL)	Vol. do padrão interno* (μL)
-[1]	0	-	600	100
-[2]	25	50 μ L da solução 4 (1 μ g/mL)	550	100
-[3]	50	100 μ L de solução 4 (1 μ g/mL)	500	100
-[4]	75	150 μ L da solução 4 (1 μ g/mL)	450	100
-[5]	100	200 μ L da solução 4 (1 μ g/mL)	400	100
-[6]	250	50 μ L da solução 3 (10 μ g/mL)	550	100
-[7]	500	100 μ L da solução 3 (10 μ g/mL)	500	100
-[8]	750	150 μ L da solução 3 (10 μ g/mL)	450	100
-[9]	1.000	200 μ L da solução 3 (10 μ g/mL)	400	100

*MEM (Minimum Essential Medium) utilizado como solvente; * n-propilparabeno como padrão interno.

2.2. Padronização da metodologia analítica para CLAE

2.2.1. Parâmetros

- Coluna: Supercosil LC 18, DB 25cm x4,5cm
- Fase móvel: solução aquosa de ácido acético a 3% v/v: metanol (26:74)
- Fluxo da fase móvel: 1mL/ minuto
- Comprimento de onda: 283nm
- Tempo de retenção: 20 minutos

2.2.2. Preparo da fase móvel

A fase móvel foi composta por uma mistura de metanol com 3% v/v de ácido acético e água na proporção de 74: 26.

A solução aquosa de ácido acético 3% v/v foi preparada a partir do ácido acético glacial e completada em balão volumétrico de 1000mL com água Milli Q quantidade suficiente para.

2.2.3. Preparo do padrão interno

Foi pesado exatamente cerca de 25mg de n-propilparabeno e transferido para um balão volumétrico de 25mL e completado o volume com metanol.

2.3. Permeação do diclofenaco de sódio

2.3.1. Preparo da membrana

A pele de mama obtida de cirurgia plástica apresentou espessura média de 0,5 mm ($\pm 0,05$) e foi retirada com auxílio de dermatomo. Após a remoção foi mantida em meio MEM contendo gentamicina 50 μ g/mL e mantida sob refrigeração a 4°C. Foi transportada em banho de gelo até o laboratório onde foi estocada sob as mesmas condições. A superfície da pele foi limpa com auxílio de gaze embebida no mesmo meio de manutenção. Considerou-se requisito à utilização da pele de mama no período inferior a 24 horas após a cirurgia.

2.3.2. Teste

A pele foi colocada adequadamente na célula de Franz modificada entre dois anéis de silicone, que juntam os compartimento doador e receptor. Neste último foi adicionado o fluido receptor, MEM com gentamicina 50 μ g/mL. As células preparadas foram colocadas em banho de água termostaticado mantido a temperatura de 37°C, sob agitação, durante um período de 12 horas, tendo suas extremidades vedadas com parafilme. Ao final deste período esta solução foi desprezada e o compartimento receptor foi completado com solução limpa, sendo o volume exato anotado. Em um primeiro momento, foi colocado em uma das células apenas 500 μ g do promotor de absorção estudado, deixando-o agir por 1 hora (pré-tratamento). Decorrido este tempo, a membrana foi limpa com papel absorvente e no compartimento doador foram acrescentados 500 μ L de uma solução saturada de diclofenaco de sódio. Nas outras duas células foram colocados 500 μ g da formulação estudada sobre a membrana. As células continuaram com suas extremidades vedadas com o parafilme. Foi então retirado uma amostra de 600 μ L do compartimento receptor e recolocado o mesmo volume de fluido receptor limpo, mantido sob as mesmas condições de temperatura. Este foi considerado o tempo zero (T=0). Em intervalos pré-estabelecidos de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 28, 32, 48, 52 e 56 horas o mesmo procedimento anteriormente descrito foi adotado. Estas amostras foram congeladas para posterior análise com CLAE.

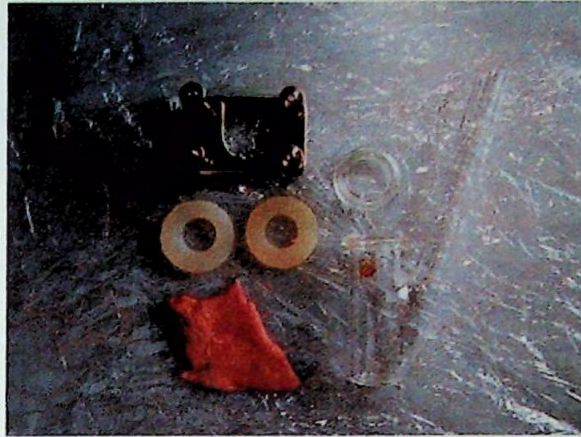


Figura 12. Célula de Franz modificada, anéis de silicone, pele e garra de aço inoxidável.



Figura 13. Célula de Franz modificada parcialmente montada.

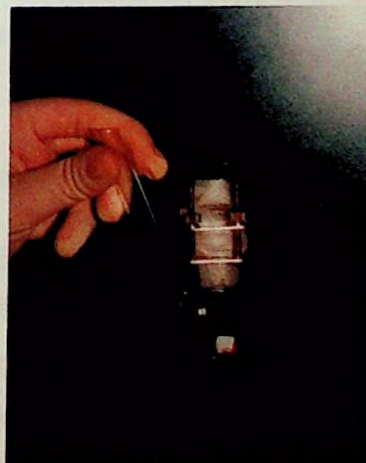


Figura 14. Célula de Franz modificada parcialmente montada.

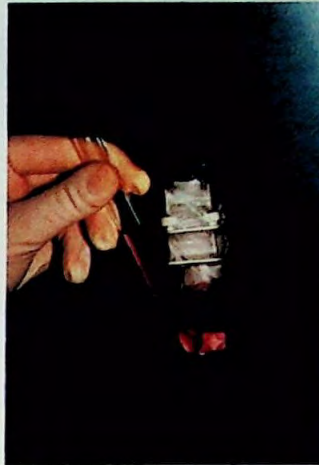


Figura 15. Célula de Franz modificada, totalmente montada, contendo o fluido receptor.

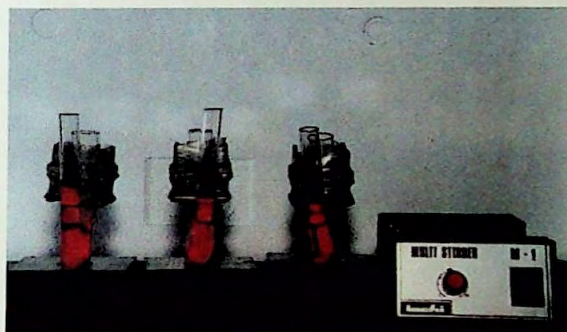


Figura 16. Sistema pronto para o experimento. Três células de Franz sobre o suporte do agitador mecânico.

2.3.3. Preparação das amostras para análise por CLAE

Após o descongelamento das amostras foram acrescentados 100 μ L do padrão interno, anteriormente preparado, seguida de agitação realizado em agitador de tubos. As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos, retirando-se então o sobrenadante o qual foi filtrado utilizando-se filtro Sartorius RC4 com auxílio de seringa de plástico de 5mL, para as cubetas próprias de análises de CLAE.

2.4. Planejamento estatístico

O estudo das fórmulas foi baseado no planejamento estatístico com análise de variância "one way" (ANOVA), conforme BOX e colaboradores (19). Para a constituição da matriz de ensaio foram considerados 5 tratamentos sendo as variáveis independentes, com as seguintes denominações:

- Óleo de Pequi 5% p/p: Experimentos 1,2 e 3;
- Óleo de Pequi 10% p/p: Experimentos 4,5 e 6;
- Papaína 0,2% p/p: Experimentos 7,8 e 9;
- Papaína 0,05% p/p: Experimentos 10,11 e 12;
- Associação de Óleo de Pequi 7,5% p/p + Papaína 0,1% p/p: Experimentos 13,14 e 15.

De acordo com o planejamento estatístico, foram necessários 15 ensaios para obtenção de dados confiáveis, isto é, três repetições de cada formulação estudada, cada experimento constituído de três células de Franz, duas contendo a formulação (duplicata) e uma sob pré-tratamento. A ordem dos experimentos foi determinada aleatoriamente.

Tabela 2. Matriz de ensaio para a realização do projeto com 5 tratamentos.

Óleo de Pequi 5%	Óleo de Pequi 10%	Papaína 0,2%	Papaína 0,05%	Associação de Óleo de Pequi 7,5% + Papaína 0,1%
Experimento 1	Experimento 4	Experimento 7	Experimento 10	Experimento 13
Experimento 2	Experimento 5	Experimento 8	Experimento 11	Experimento 14
Experimento 3	Experimento 6	Experimento 9	Experimento 12	Experimento 15

2.5. Cálculo dos parâmetros da difusão

A análise da permeação de fármacos através de barreiras biológicas como a pele, mucosa gastrointestinal, mucosa nasal e mucosa bucal é considerada um processo de difusão passivo. As equações matemáticas baseadas na teoria de difusão servem para correlacionar o movimento e o transporte de fármacos com suas propriedades físico-químicas. Um modelo simples utilizado é uma membrana homogênea separando um compartimento doador que contém um reservatório infinito do fármaco, de um compartimento receptor que funciona em "sink condition" (68). As equações de difusão podem ser derivadas deste modelo baseado nas 1ª e 2ª Leis de Fick (68). O método mais utilizado para analisar os dados de permeação de experimentos *in vitro* obtidos com a técnica de "dose infinita", é o método do LagTime (10). Este método utiliza os dados obtidos após o experimento atingir o "steady state" ou fluxo constante, já que a partir deste momento os pontos são lineares fornecendo uma curva de permeação linear onde o fluxo (J) é o coeficiente angular e o LagTime (Tlag) a interseção da reta no eixo do Tempo (x). Assim determina-se o coeficiente de difusão (D) e o coeficiente de partição (K) de um difusante a partir do LagTime (Tlag) e do fluxo (J), conhecendo-se a concentração do fármaco (C) na fase doadora e a espessura da membrana (e) (111).

Através de derivações da equação da 2ª Lei de Fick:

$$\frac{\delta C}{\delta t} = \frac{D}{\delta x^2} \delta^2 C \quad (\text{eq. 1})$$

chega-se a seguinte equação:

$$P = J_{ss} (t - T_{lag}) - \left\{ \frac{12}{\pi^2} J_{ss} T_{lag} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n / n^2 e \left[\left(\frac{n^2 - \pi^2}{6} \right) t / T_{lag} \right] \right\} \quad (\text{eq.2})$$

onde

$$T_{Lag} = \frac{e^2}{6 D} \quad (\text{eq. 3})$$

$$J_{ss} = \frac{D K_m C_s}{e} \quad (\text{eq. 4})$$

Para longos períodos ($t > 3-4 \times T_{lag}$) o segundo termo da equação 2 se torna desprezível e a equação pode ser simplificada para:

$$P = J_{ss} (t - T_{lag}) \quad (\text{eq. 5})$$

Assim os valores apresentados abaixo foram calculados para cada

RESULTADOS

Resultados

A partir das áreas obtidas com a análise cromatográfica das amostras retiradas das células de Franz, foram feitos cálculos para obtenção da quantidade permeada de diclofenaco de sódio por área. A relação destes valores com o tempo em que as amostras foram retiradas nos fornece um gráfico onde o coeficiente linear é o fluxo. A seguir estão relacionados, a título de exemplo, os valores médios e desvio padrão para os experimentos 7, 8 e 9, referentes a fórmula 3 que continha papaína 0,2% p/p.

Tabela 3. Valores da quantidade permeada por área para os experimentos 7, 8 e 9, referentes ao pré-tratamento com papaína 0,2%p/p.

Tempo (h)	Médias	Desvio Padrão
2	0,096899	0,167834
3	0,00542	0,358942
4	0,416964	0,125656
6	1,103817	0,194361
8	2,341471	0,366224
12	3,615162	0,248744
24	10,60417	1,230169
28	12,38277	2,112279
32	14,85903	2,320928
48	28,11575	9,456138
52	29,84457	7,937483
56	34,63985	6,217024

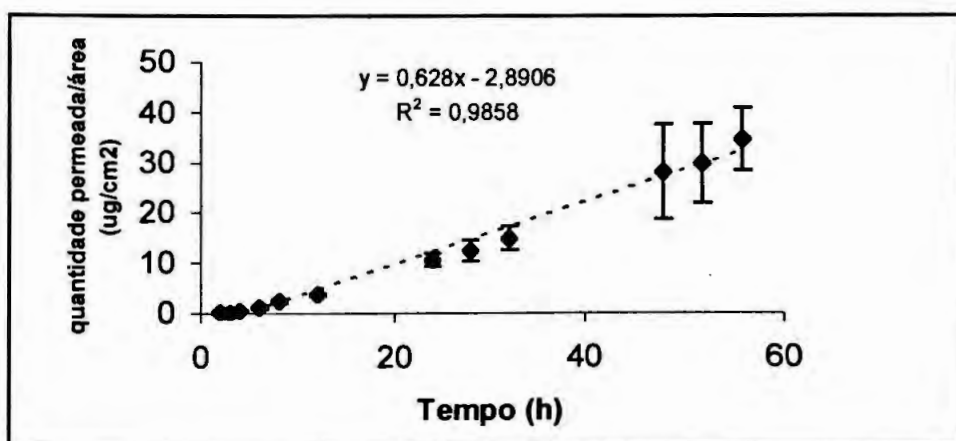


Figura 17. Gráfico das médias e desvio padrão dos valores de quantidade permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) por tempo para os experimentos 7,8 e 9, referentes ao pré-tratamento com papaína 0,2% p/p.

Tabela 4. Valores da quantidade permeada por área para os experimentos 7, 8 e 9, referentes a fórmula com papaína 0,2% p/p.

Tempo (h)	Médias	Desvio Padrão
3	-0,0156	0,4862
4	-0,31965	0,154397
6	0,200176	0,248394
8	0,670051	0,404669
12	1,341138	1,074561
24	5,194982	1,551791
28	6,152503	1,795776
32	7,162656	2,11311
48	11,87032	3,564055
52	12,462	3,667448
56	15,71005	7,507982

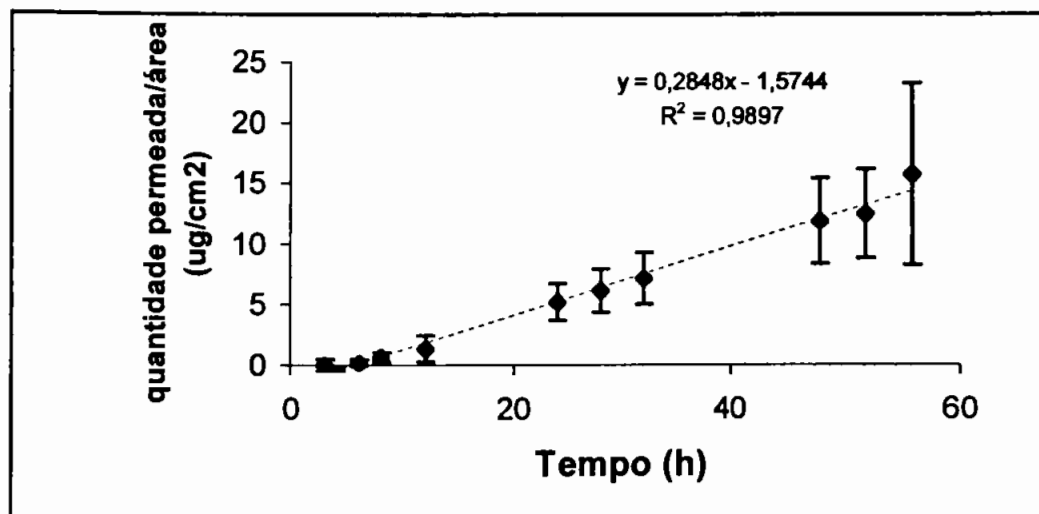


Figura 18. Gráfico das médias e desvio padrão dos valores de quantidade permeada/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em relação ao tempo, para os experimentos 7, 8 e 9, referentes a fórmula com papaína 0,2% p/p.

As tabelas 5 a 19 foram obtidas utilizando-se os cálculos discutidos na metodologia item 2.5., baseando-se nos gráficos dos valores da quantidade de diclofenaco de sódio permeado por área em relação ao tempo, para cada experimento.

Tabela 5. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 1 da fórmula com óleo de pequi 5% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	1,4119	0,2905
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$5,65 \times 10^{-6}$	$1,94 \times 10^{-6}$
LagTime (h)	0,4650585	12,15525
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$90,5 \times 10^{-5}$	$3,43 \times 10^{-5}$
K	$31,2144 \times 10^{-5}$	$282,5 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 32 anos cor: parda local: mama direita data: 20-04-99	

Tabela 6. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 2 da fórmula com óleo de pequi 5% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,3523	0,1627
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$1,41 \times 10^{-6}$	$1,08 \times 10^{-6}$
LagTime (h)	3,743401	9,229871
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$11,1 \times 10^{-5}$	$4,51 \times 10^{-5}$
K	$63,3024 \times 10^{-5}$	$120,1 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 33 anos cor: branca local: mama direita data: 10-02-99	

Tabela 7. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 3 da fórmula com óleo de pequi 5% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,8035	0,2132
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$3,21 \times 10^{-6}$	$1,42 \times 10^{-6}$
LagTime (h)	10,36777	8,757036
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$4,02 \times 10^{-5}$	$4,76 \times 10^{-5}$
K	$399,9 \times 10^{-5}$	$149,4 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 30 anos cor: branca local: mama direita data: 18-01-99	

Tabela 8. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 4 da fórmula com óleo de pequi 10% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,2335	0,1921
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$9,34 \times 10^{-7}$	$1,28 \times 10^{-6}$
LagTime (h)	11,60471	0,278501
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$3,59 \times 10^{-5}$	$149,6 \times 10^{-5}$
K	$130,0656 \times 10^{-5}$	$4,28 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 48 anos cor: parda quase preta local: mama direita data: 15-03-99	

Tabela 9. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 5 da fórmula com óleo de pequi 10% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,4311	0,3514
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$1,72 \times 10^{-5}$	$2,34 \times 10^{-5}$
LagTime (h)	8,126653	5,111838
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$5,13 \times 10^{-5}$	$8,15 \times 10^{-5}$
K	$168,2 \times 10^{-5}$	$143,7 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 24 anos cor: parda local: mama esquerda data: 22-02-99	

Tabela 10. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 6 da fórmula com óleo de pequi 10% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,5437	0,1774
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$2,17 \times 10^{-5}$	$1,18 \times 10^{-5}$
LagTime (h)	5,249034	5,160654
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$7,94 \times 10^{-5}$	$8,07 \times 10^{-5}$
K	137×10^{-5}	$73,2 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 43 anos cor: parda local: mama direita data: 18-11-98	

Tabela 11. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 7 da fórmula com papaína 0,2% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,6003	0,3904
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$2,4 \times 10^{-6}$	$2,6 \times 10^{-6}$
LagTime (h)	5,940863	5,70748
L (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$7,01 \times 10^{-5}$	$7,3 \times 10^{-5}$
K	$171,2 \times 10^{-5}$	$178,3 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 39 anos cor: branca(morena) local: mama esquerda data: 30-11-98	

Tabela 12. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 8 da fórmula com papaína 0,2% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,5091	0,3416
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$2,04 \times 10^{-6}$	$2,28 \times 10^{-6}$
LagTime (h)	3,399529	5,824649
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$12,3 \times 10^{-5}$	$7,15 \times 10^{-5}$
K	$83,0736 \times 10^{-5}$	$159,2 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 21 anos cor: branca local: mama direita data: 12-04-99	

Tabela 13. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 9 da fórmula com papaína 0,2% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,8409	0,2786
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$3,36 \times 10^{-5}$	$1,86 \times 10^{-5}$
LagTime (h)	7,97467	4,828428
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$5,22 \times 10^{-5}$	$8,63 \times 10^{-5}$
K	$321,9 \times 10^{-5}$	$107,6 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 39 anos cor: branca(morena) local: mama direita data: 30-11-98	

Tabela 14. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 10 da fórmula com papaína 0,05% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0	0,2387
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	150000
P (cm/h)	0	$1,59 \times 10^{-5}$
LagTime (h)	0	5,411395
e (cm)	0	0,05
D (cm^2/h)	0	$7,7 \times 10^{-5}$
K	0	$103,3 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 20 anos cor: branca local: mama direita data: 22-03-99	

Observação: A pele da célula A danificou-se durante o experimento.

Tabela 15. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 11 da fórmula com papaina 0,05% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,7796	0,1478
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$3,12 \times 10^{-6}$	$9,85 \times 10^{-7}$
LagTime (h)	6,114418	6,851827
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$6,81 \times 10^{-5}$	$6,08 \times 10^{-5}$
K	$228,8 \times 10^{-5}$	81×10^{-5}
Tipo de pele	idade: 30 anos cor: branca local: mama esquerda data: 18-01-99	

Tabela 16. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 12 da fórmula com papaina 0,05% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,8713	0,2704
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$3,49 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-6}$
LagTime (h)	5,374957	5,670858
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$7,75 \times 10^{-5}$	$7,35 \times 10^{-5}$
K	$224,8 \times 10^{-5}$	$122,7 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade : 24 anos cor: branca local: mama direita data: 14-12-98	

Tabela 17. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 13 da fórmula com associação de óleo de pequi 7,5% e papaína 0,1% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,4916	0,2364
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$1,97 \times 10^{-5}$	$1,58 \times 10^{-5}$
LagTime (h)	6,105777	6,336294
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$6,8 \times 10^{-5}$	$6,58 \times 10^{-5}$
K	$144,1 \times 10^{-5}$	$119,8 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 42 anos cor: branca local: mama esquerda data: 04-03-99	

Tabela 18. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 14 da fórmula com associação de óleo de pequi 7,5% e papaína 0,1% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,8969	0,271
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$3,59 \times 10^{-5}$	$1,81 \times 10^{-5}$
LagTime (h)	4,962315	6,333948
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$8,4 \times 10^{-5}$	$6,58 \times 10^{-5}$
K	$213,6 \times 10^{-5}$	$137,3 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 25 anos cor: branca local: mama direita data: 23-11-98	

Tabela 19. Valores dos parâmetros de Difusão do Experimento 15 da fórmula com associação de óleo de pequi 7,5% e papaína 0,1% p/p.

Parâmetros	Pré-tratamento	Formulação
FLUXO ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0,2345	0,1486
CS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	250000	150000
P (cm/h)	$9,38 \times 10^{-7}$	$9,91 \times 10^{-7}$
LagTime (h)	3,831557	5,245626
e (cm)	0,05	0,05
D (cm^2/h)	$10,9 \times 10^{-5}$	$7,94 \times 10^{-5}$
K	$43,1 \times 10^{-5}$	$62,4 \times 10^{-5}$
Tipo de pele	idade: 29 anos cor: parda local: mama esquerda data: 01-02-99	

As tabelas de 20 a 29 e as figuras 19 a 23 referem-se a análise estatística, baseada no planejamento "one way" da comparação das médias das 5 formulações descritas na metodologia item 1.4.

Tabela 20. Análise de variância para Fórmula e Fluxo, projeto fatorial "one way".

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F calculado	Nível de confiança
Efeito	0,037406	4	0,009351	2,731007	0,097025
Erro	0,030818	9	0,003424		

Significativo quando inferior a 5%.

Tabela 21. Intervalo das médias para análise de variância múltipla para Fórmulas e Fluxo, projeto fatorial "one way".

TRATAMENTO	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	0,2221333	0,1870500	0,3368667	0,2189667	0,2186667
1 {1}		0,527764	0,039809*	0,948605	0,943746
2 {2}	0,527764		0,020557*	0,564909	0,568504
3 {3}	0,039809*	0,020557*		0,035709*	0,035343*
4 {4}	0,948605	0,564909	0,035709*		0,995127
5 {5}	0,943746	0,568504	0,035343*	0,995127	

* denota uma diferença estatisticamente significativa.

{1} óleo de pequi 5%; {2} óleo de pequi 10%; {3} papaína 0,2%; {4} papaína 0,05% e {5} associação. Análise com 95% de confiança.

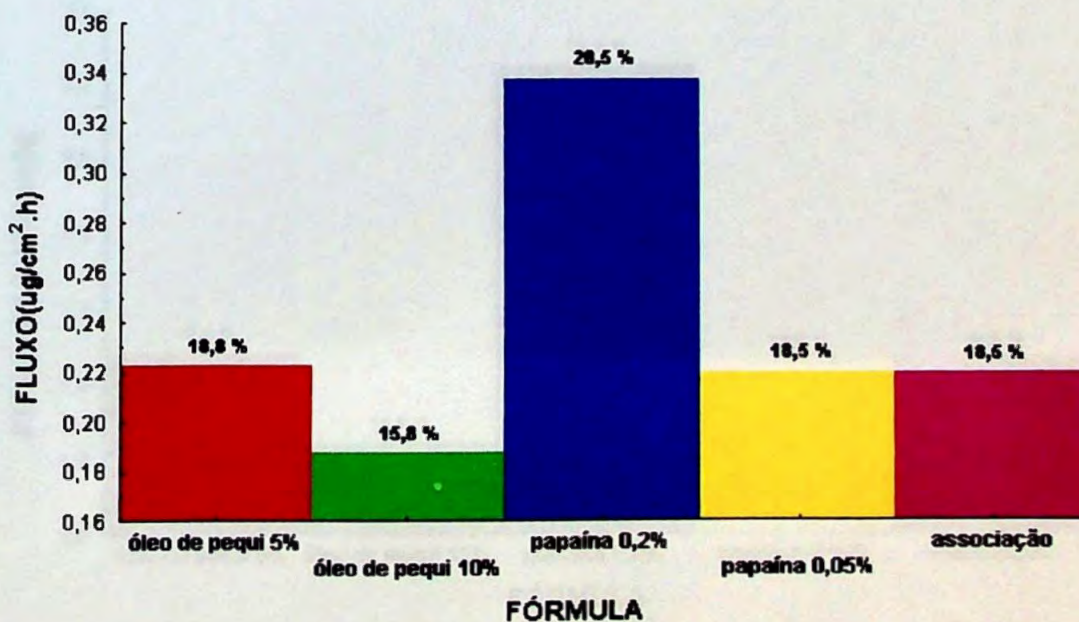


Figura 19. Média dos valores do Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$) em função da Fórmula.

Tabela 22. Análise de variância para Fórmula e Permeabilidade, projeto fatorial "one way".

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F calculado	Nível de confiança
Efeito	1,668464	4	0,417113	2,732013	0,096948
Erro	1,374094	9	0,152677		

Significativo quando inferior a 5%.

Tabela 23. Intervalo das médias para análise de variância múltipla para Fórmulas e Permeabilidade, projeto fatorial "one way".

TRATAMENTO	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	1,480000	1,245000	2,246667	1,45833	1,460333
1 {1}		0,526501	0,039698*	0,947340	0,952194
2 {2}	0,526501		0,020437*	0,564529	0,560954
3 {3}	0,039698*	0,020437*		0,035513*	0,035880*
4 {4}	0,947340	0,564529	0,035513*		0,995135
5 {5}	0,952194	0,560954	0,035880*	0,995135	

* denota uma diferença estatisticamente significativa.

{1} óleo de pequi 5%; {2} óleo de pequi 10%; {3} papaína 0,2%; {4} papaína 0,05% e {5} associação. Análise com 95% de confiança.

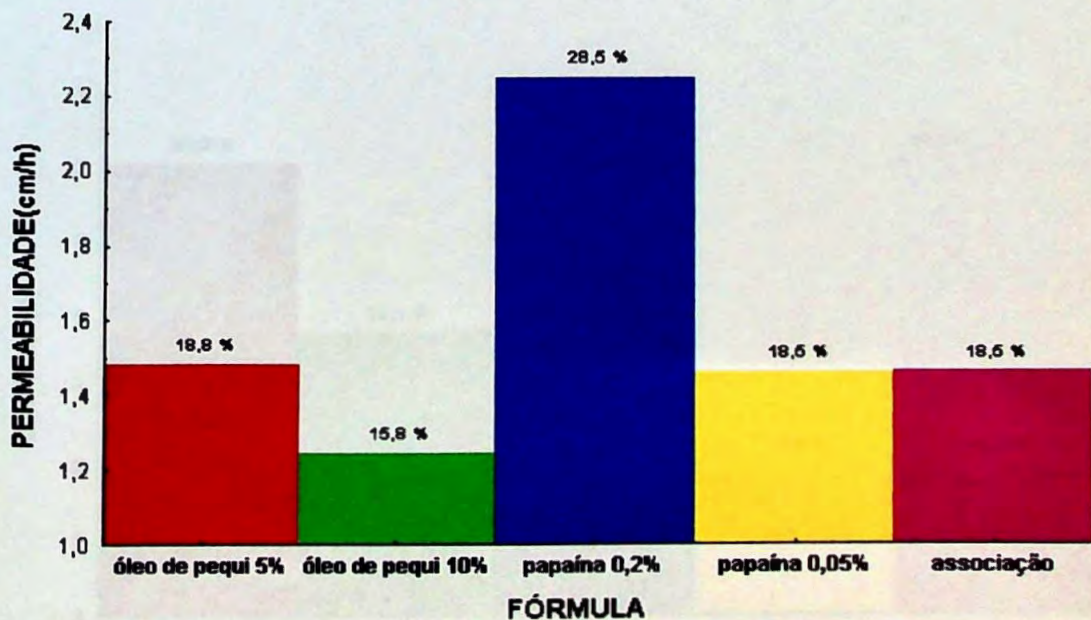


Figura 20. Média dos valores da Permeabilidade (cm/h) em função da Fórmula.

Tabela 24. Análise de variância para Fórmula e LagTime, projeto fatorial "one way".

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F calculado	Nível de confiança
Efeito	42,57146	4	10,64286	4,143432	0,035637
Erro	23,11750	9	2,56861		

Significativo quando inferior a 5%.

Tabela 25. Intervalo das médias para análise de variância múltipla para Fórmulas e LagTime, projeto fatorial "one way".

Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	10,04739	7,78327	5,453519	5,978027	5,9719656
1 {1}		0,156476	0,0066138*	0,012524*	0,012431*
2 {2}	0,156476		0,145445	0,247993	0,246526
3 {3}	0,006613*	0,145445		0,697902	0,701201
4 {4}	0,012524*	0,247993	0,697902		0,996400
5 {5}	0,012431*	0,246526	0,701201	0,996400	

* denota uma diferença estatisticamente significativa.

{1} óleo de pequi 5%; {2} óleo de pequi 10%; {3} papaína 0,2%; {4} papaína 0,05% e {5} associação. Análise com 95% de confiança.

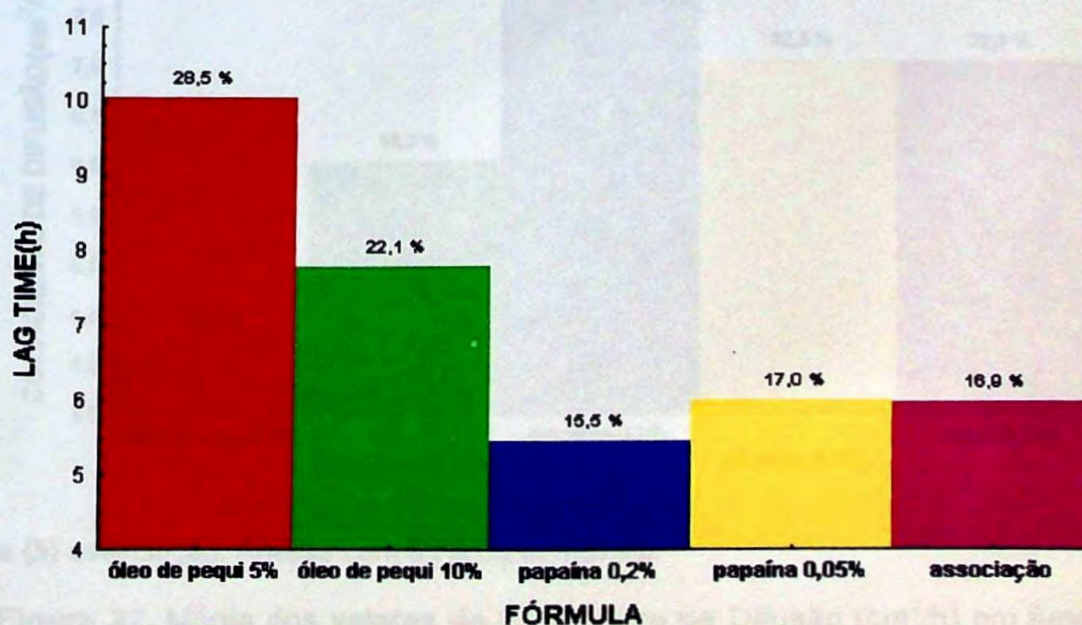


Figura 21. Média dos valores do LagTime (h) em função da Fórmula.

Tabela 26. Análise de variância para Fórmula e Coeficiente de Difusão, projeto fatorial "one way".

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F calculado	Nível de confiança
Efeito	21,79643	4	5,449107	3,688664	0,048133
Erro	13,29532	9	1,477257		

Significativo quando inferior a 5%.

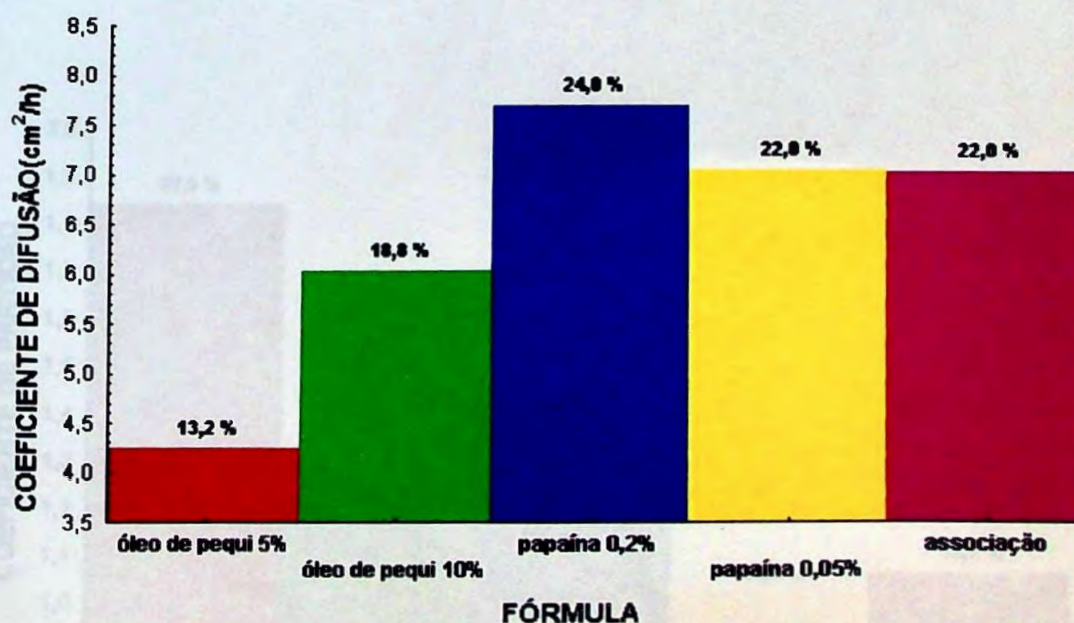
Tabela 27. Intervalo das médias para análise de variância múltipla para Fórmulas e Coeficiente de Difusão, projeto fatorial "one way".

Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	4,233333	6,035000	7,693333	7,043334	7,033333
1 {1}		0,138862*	0,006868*	0,019673*	0,019999*
2 {2}	0,138862*		0,169221	0,387146	0,391674
3 {3}	0,006868*	0,169221		0,528861	0,522687
4 {4}	0,019673*	0,387146	0,528861		0,992180
5 {5}	0,019999*	0,391674	0,522687	0,992180	

* denota uma diferença estatisticamente significativa.

{1} óleo de pequi 5%; {2} óleo de pequi 10%; {3} papaína 0,2%; {4} papaína 0,05%

{5} associação. Análise com 95% de confiança.



e {5} associação. Análise com 95% de confiança.

Figura 22. Média dos valores de Coeficiente de Difusão (cm^2/h) em função da Fórmula.

Figura 22. Média dos valores do Coeficiente de Partição em função da Fórmula

Tabela 28. Análise de variância para Fórmula e Coeficiente de Partição, projeto fatorial "one way".

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F calculado	Nível de confiança
Efeito	1,385697	4	0,346424	1,212577	0,370211
Erro	2,571234	9	0,285693		

Significativo quando inferior a 5%.

Tabela 29. Intervalo das médias para análise de variância múltipla para Fórmulas e Coeficiente de Partição, projeto fatorial "one way".

Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	1,840000	1,185500	1,483667	1,023333	1,065000
1 {1}		0,212662	0,435296	0,094105	0,109497
2 {2}	0,212662		0,556262	0,747231	0,810480
3 {3}	0,435296	0,556262		0,319011	0,362458
4 {4}	0,094105	0,747231	0,319011		0,926030
5 {5}	0,109497	0,810480	0,362458	0,926030	

* denota uma diferença estatisticamente significativa.

{1} óleo de pequi 5%; {2} óleo de pequi 10%; {3} papaína 0,2%; {4} papaína 0,05% e {5} associação. Análise com 95% de confiança.

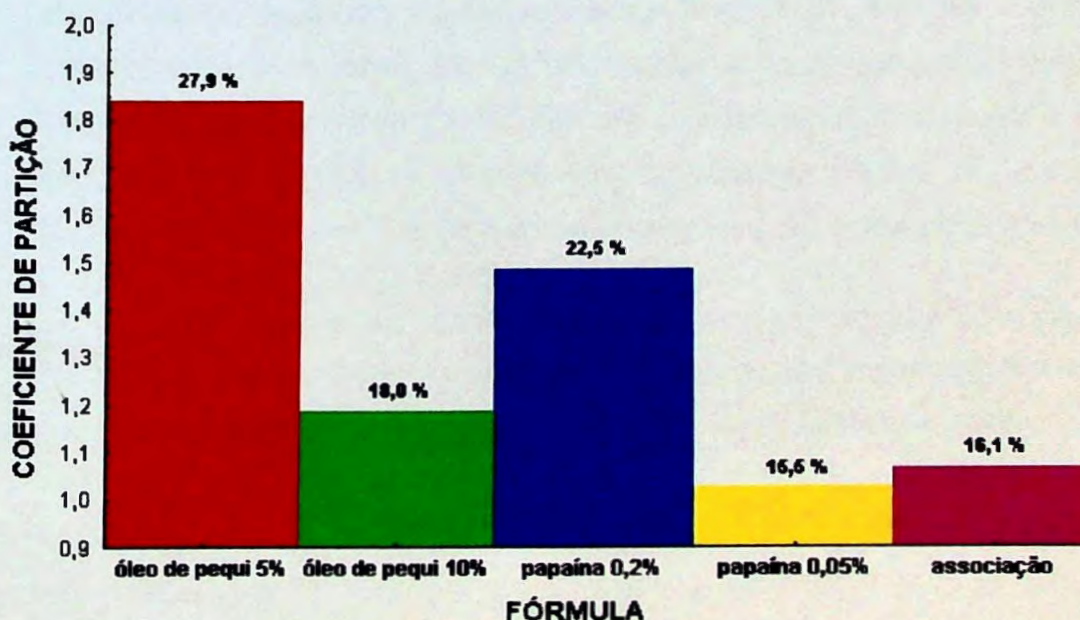


Figura 23. Média dos valores do Coeficiente de Partição em função da Fórmula.

DISCUSSÃO

Discussão

A difusão de uma substância através da pele representa um típico problema de transporte, onde esta passa de um lado para outro por uma membrana parcialmente permeável e restrita. Para facilitar a compreensão deste complexo processo, pesquisadores (22, 26, 38) criaram modelos para descrever a passagem de compostos, de um compartimento doador para um compartimento receptor, através do estrato córneo.

Ao desenvolver-se a metodologia para avaliação da difusão do diclofenaco de sódio procurou-se manter condições mais próximas às decorridas do uso de produtos tópicos e transdérmicos. Assim foi utilizada como membrana pele humana (23, 31, 33, 119).

Vários tipos de fluídos receptores foram estudados na literatura (21, 22, 41, 55, 56, 118). Para esta metodologia selecionou-se o MEM, cuja capacidade de manter a viabilidade da pele por 8 dias, foi descrita por WESTER e colaboradores (124). Reconhecendo-se o estrato córneo como sendo o passo limitante para penetração da maioria das substâncias, e este sendo uma camada morta, o uso deste fluído receptor não seria justificado. Entretanto reconhecendo-se a existência de metabolismo cutâneo e devido a limitações técnicas (23), a pele utilizada apresentou espessura de 500 μ m, abrangendo assim o estrato córneo, epiderme viável e parte da derme.

O MEM é um meio rico, apresentando diversos componentes na sua formulação, o que dificultou a escolha dos parâmetros cromatográficos para o doseamento do diclofenaco de sódio permeado. A técnica utilizada para determinação, embora não validada, já que não foram verificados todos os parâmetros de performance analítica, apresentou precisão e linearidade. Foi determinado uma curva padrão para cada experimento, e os coeficientes de correlação (R^2) apresentaram-se entre 0,9773 e 1.

A velocidade de passagem das moléculas do permeante através da epiderme viável é geralmente maior que a velocidade de difusão no estrato

córneo. Assim a concentração da substância pode ser esperada como maior no compartimento doador e menor no receptor. Foi utilizada concentração saturada de diclofenaco de sódio no compartimento doador garantindo assim dose infinita. Esta condição proporcionou velocidade de fluxo constante após atingir o LagTime (68).

Se o suprimento de soluto no veículo é decrescente ou interrompido, dose finita, o gradiente de concentração do soluto no estrato córneo irá desaparecer, e a tendência deste em ir em direção da epiderme viável, pode atingir o zero quando a diferença de concentração do fármaco aproximar-se do zero. O tempo requerido para atingir este ponto teoricamente infinito pode variar de soluto para soluto na prática (41).

O experimento utilizou o método do LagTime, descrito por BARRY em 1983 (10), baseado nas leis de Fick de difusão, como forma de obter os parâmetros de permeação descritos nas tabelas 5 a 19.

Supondo-se que a pele comporta-se como uma membrana homogênea de apenas uma fase, este método utiliza apenas dados obtidos após estabelecimento de fluxo constante. Sob essa condição estes são lineares possibilitando a determinação do fluxo (J) e do coeficiente de permeabilidade através da equação da reta. O LagTime é calculado através da extrapolação desta reta no eixo do tempo (x). De acordo com estes parâmetros é possível determinar o coeficiente de difusão (D) e o coeficiente de partição (K), aplicando-se as Leis de Fick e conhecendo-se a concentração inicial do diclofenaco de sódio na fase doadora além da espessura da membrana (111, 112).

No estudo teórico de SHAH (111), posteriormente confirmado experimentalmente (112), foi descrito que o método do LagTime deve ser conduzido de forma que o tempo de experimento seja igual ou superior a três vezes o LagTime, o que permite que o fluxo constante ("steady-state") seja alcançado. Segundo a teoria, caso esta condição não seja cumprida, poderia ocorrer erros significativos na estimativa de J e P. Analisando-se os valores de LagTime das tabelas 5 a 19, verifica-se que o maior tempo

encontrado foi de 12 horas (tabela 5). O experimento foi conduzido em 56 horas cumprindo-se, portanto este requisito.

D e K, são estimados dos valores de J, P e LagTime além de serem influenciados pela espessura da membrana, cuja determinação precisa é problemática, portanto estão sujeitos a um maior erro, sendo parâmetros não confiáveis na conclusão de experimentos (111). Comportamento semelhante foi verificado no experimento, onde não ocorreu variação significativa para o parâmetro K (figura 23).

Com relação a análise do parâmetro fluxo (tabela 20), o estudo estatístico demonstrou uma significativa diferença entre a formulação com papaína 0,2% p/p (fórmula 3) e as demais fórmulas testadas. Por meio da análise de variância múltipla para fórmula e fluxo (tabela 21), foi demonstrado que esta é considerada estatisticamente diferente das demais. Observando-se a figura 19 pode-se visualizar claramente uma média de valores do fluxo mais elevada em relação as outras fórmulas, possivelmente causada pela ação promotora da papaína, na concentração 0,2% p/p, sobre a permeação percutânea do diclofenaco de sódio.

Na análise da influência da fórmula sobre o coeficiente de permeabilidade (tabelas 22 e 23, figura 20), observa-se o aumento da média dos valores de permeabilidade para a fórmula 3, confirmando a característica promotora da papaína.

Como mencionado anteriormente, a confiabilidade dos parâmetros fluxo e coeficiente de permeabilidade é maior, pois ambos são obtidos diretamente da plotagem dos dados, portanto livres de erros induzidos pela diferença de espessura da pele (111).

De acordo com as tabelas 24 e 25, relacionadas com o valor de LagTime, as fórmulas 3, 4 e 5 foram consideradas estatisticamente homogêneas (figura 21), isto é, não apresentam diferenças significativas, provavelmente devido a presença da papaína nestas formulações.

Ainda analisando a figura 21, verifica-se que as fórmulas 1 e 2 apresentam valores médios de LagTime superiores a todas as demais, embora a formulação 1 apresente valor médio maior que a fórmula 2, estas pertencem aos mesmo grupo, sendo consideradas estatisticamente semelhantes. Comparando-se os valores podemos reafirmar ser a fórmula 3 a mais eficiente, uma vez que apresenta o menor LagTime.

Os valores da média do coeficiente de difusão, tabelas 26 e 27, evidencia a fórmula 1 como heterogênea, sendo inclusive estatisticamente diferente da fórmula 2. Analisando-se a figura 22, o coeficiente de difusão da fórmula com óleo de pequi 5% p/p apresenta a menor média, portanto menor eficiência como promotor de absorção. Este resultado corrobora com os experimentos de COOPER (30) e NIAZY (77), que compararam diversas formulações contendo ácido oléico, concluindo que este promotor apresentava maior desempenho quando presente na concentração de 6%. Convém ressaltar que o óleo de pequi apresenta na sua composição cerca de 50% de ácido oléico (figura 9) correspondendo a formulação 2 que contém óleo de pequi 10% p/p.

A figura 22 também leva a confirmação da primazia da fórmula 3 que demonstra maior média dos valores do coeficiente de difusão.

A análise estatística do parâmetro coeficiente de partição não forneceu resultados possíveis de serem correlacionados, como se verifica nas tabelas 28 e 29 e na figura 23. A possível explicação deste fato pode estar no emprego de uma mesma formulação básica para ambos os promotores de absorção, que possivelmente interferiu em seu coeficiente de partição. O uso dos promotores neste caso não é um fator influente já que não estão agindo como co-solventes (48, 56, 80), portanto não atuando na partição do diclofenaco de sódio do veículo para a pele.

Segundo GOODMAN e BARRY (41), que postularam a teoria do LPP, o promotor ideal agiria interagindo com a bicamada lipídica, solvantando as proteínas do estrato córneo e aumentando o coeficiente de partição fármaco-pele. Dificilmente um promotor apresenta todas estas características, assim

uma associação de substâncias com diferentes mecanismos de ação é interessante e atraente. O objetivo do estudo da associação de óleo de pequi 7,5 % p/p com papaína 0,1% p/p foi a verificação da interação entre dois promotores de absorção que teoricamente agem por mecanismos diferentes.

Nas figuras 19 a 23 verifica-se comportamento semelhante entre a formulação que continha papaína 0,05% p/p e aquela com a associação. Provavelmente a concentração dos promotores na última não foi suficiente para aumentar a permeação do diclofenaco de sódio. Estudos posteriores serão necessários para constatar a teoria do LPP e otimizar esta formulação.

Como descrito no item 2.3 de Material e Métodos, o experimento foi conduzido comparando-se atividade promotora do óleo de pequi e da papaína, utilizando-se estes incorporados na formulação e na forma de pré-tratamento.

Analisando-se individualmente os dados obtidos com o pré-tratamento (tabelas 5 a 19), constata-se que em geral o coeficiente de partição apresentou-se mais elevado quando comparado com a formulação. Este resultado vai de encontro à literatura (41, 81), onde no pré-tratamento o fármaco encontra-se disponível em solução saturada, portanto livre da interferência do veículo. Sendo o diclofenaco de sódio um fármaco hidrofílico, este pode apresentar uma menor afinidade pela pele, portanto permanecendo no veículo.

Continuando a comparar os valores de Fluxo (J) e coeficiente de permeabilidade (P), verificamos que o primeiro apresenta-se sempre maior, enquanto que para P geralmente estes valores são maiores com o pré-tratamento.

Com intuito de correlacionar os valores individuais de LagTime com as variáveis independentes, verificou-se que houve dispersão de valores, não sendo possível uma análise conclusiva. Este comportamento

provavelmente ocorreu devido a influência da pele utilizada no experimento, a qual apresentava diferenças de idade, raça ou localização.

Em relação ao coeficiente de difusão, os valores encontrados no pré-tratamento permanecem geralmente inalterados quando comparados com os valores obtidos para as formulações. Justifica-se este resultado, pois a substância ao ser liberada do veículo, começa sua difusão pelo estrato córneo mantendo uma velocidade constante o qual depende exclusivamente das características inerentes a substância (15, 68).

A avaliação da penetração percutânea do diclofenaco de sódio neste experimento ampliou perspectivas, possibilitando que novos estudos sejam realizados com estes promotores, os quais apresentaram resultados favoráveis. A otimização da formulação básica e ajustes das concentrações dos promotores são alguns dos pontos que podem ser pesquisados.

Como o estudo da absorção do diclofenaco de sódio foi baseado em planejamento estatístico, os experimentos foram conduzidos de forma aleatória, levando ao aparecimento da pele como um fator que influencia na obtenção dos parâmetros de permeação (tabelas 5 a 19). No entanto não foi possível determinar por este planejamento a correlação entre os fatores idade, cor e localização com os resultados obtidos, necessitando de estudos complementares para determinações mais conclusivas.

Finalmente, para maior entendimento do mecanismo pelo qual os promotores estudados aumentaram a penetração do diclofenaco de sódio é conveniente a análise das peles utilizadas nos experimentos por metodologias analíticas complementares como o DSC, espectroscopia com infravermelho fotoacústica com transformações de Fourier e microscopia eletrônica exploratória.

CONCLUSÕES

Conclusões

1. Entre os parâmetros de difusão, o Fluxo e o coeficiente de Permeabilidade foram os mais adequados na avaliação da permeação do diclofenaco de sódio.

2. O diclofenaco de sódio demonstrou grande afinidade pela fórmula básica estudada, interferindo em seu coeficiente de partição.

3. A papaína apresentou melhor característica promotora na penetração percutânea do diclofenaco de sódio quando comparada com o óleo de pequi sendo a fórmula 3, contendo papaína 0,2% p/p, a mais eficaz entre as fórmulas estudadas.

4. As diferenças individuais da pele exerceram influência nos parâmetros de difusão do diclofenaco de sódio.

RESUMO

Resumo

Diclofenaco de sódio é um anti-inflamatório não esteroide amplamente utilizado na terapêutica. Deve ser administrado frequentemente, já que possui meia-vida biológica reduzida, o que o torna um possível candidato à via transdérmica. No entanto, este fármaco não é facilmente absorvido pela pele. Uma das táticas para desenvolver um sistema transdérmico consiste na utilização de promotores de absorção químicos que modificam a difusão do fármaco através da pele. Como promotores da absorção do diclofenaco de sódio foram utilizados o óleo de pequi a 5 e 10% p/p e papaína a 0,05 e 0,2% p/p. O estudo foi conduzido *in vitro*, utilizando célula de Franz modificada e como membrana, pele humana obtida de cirurgia plástica. Foram testadas cinco formulações contendo os promotores isolados e em associação, de acordo com planejamento estatístico de experimentos. A formulação que apresentou melhores resultados quanto aos parâmetros de fluxo, coeficiente de permeabilidade, LagTime e coeficiente de difusão foi a que continha papaína 0,2% p/p.

Palavras-chaves:

permeação, via transdérmica, promotor de absorção, célula de Franz, pele humana, diclofenaco de sódio, óleo de pequi, papaína.

ABSTRACT

Abstract

Diclofenac Sodium is a nonsteroidal antiinflammatory drug widely used in therapeutics. Since it has a short biological half-life, the drug has to be given frequently, which makes it a potential candidate for the transdermal route. However, diclofenac sodium is not easily absorbed by the skin. Using penetration enhancers to modify the diffusion of the chemical through the skin has proved to be efficient. Pequi oil 5 and 10 % p/p and papain 0,05 e 0,2% p/p have been used as penetration enhancers. The experiment was carried out *in vitro*, with modified Franz-type diffusion cell and, as membrane, human skin obtained from plastic surgery. Five different formulations were tested according to the statistic plan of the experiment. The formulation which presented the best result in terms of flux, permeation coefficient, LagTime, and diffusion coefficient was the one with papain 0,2% p/p.

Key words:

permeation, transdermal route, penetration enhancers, Franz-type diffusion cell, human skin, diclofenac sodium, Pequi oil, papain.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas*

1. AGACHE, P. Epiderme, pêlo, glândulas sebáceas e sudoríparas. In PRUNIÉRAS, M., **Manual de cosmetologia dermatológica**. 2.ed., São Paulo: Organizações Andrei Editora LTDA, 1994. cap.1, p.17-81.
2. AHMED, S., IMAI, T., OTAGIRI, M. Stereoselective Hydrolysis and Penetration of Propranolol Prodrugs: In Vitro Evaluation Using Hairless Mouse Skin. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 84, n. 7, p. 877-883., 1995.
3. AL-SAIDAN, S.M., BARRY, B.W., WILLIAMS, A.C. Differential scanning calorimetry of human and animal stratum corneum membranes. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.168, p.17-22, 1998.
4. ANDERSON, B.D. Prodrugs and their topical use. In SHAH, V.P., MAIBACH, H.I. **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration**. New York: Plenum Press, 1993. cap.3, p.69-89.
5. ARELLANO, A., SANTOYO, S., MARTÍN, C., YGARTUA, P. Enhancing effect of terpenes on the in vitro percutaneous absorption of diclofenac sodium. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.130, p.141-145, 1996.

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1994.

6. ARIMA H., MIYAJI, T., IRIE, T., HIRAYAMA, F., UEKAMA, K. Enhancing effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on cutaneous penetration and activation of ethyl 4- biphenyl acetate in hairless mouse skin. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.6, p.53-59, 1998.
7. BANDO, H., MOHRI, S., YAMASHITA, F., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. Effects of Skin Metabolism on Percutaneous Penetration of Lipophilic Drugs. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.86, n.6, p.759-761, 1997.
8. BANDO, H., YAMASHITA, F., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. Skin Penetration Enhancement of Acyclovir by Prodrug-Enhancer Combination. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.17, n.8, p.1141-1143, 1994.
9. BANGA, A.K., BOSE, S., GHOSH, T.K. Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts. Review article. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.179, p.1-19, 1999.
10. BARRY, B.W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption.** New York: Marcel Dekker, 1983. v.18, cap.1, p.1- 48.
11. BARRY, B.W. Vehicle effect: what is an enhancer? In SHAH, V.P., MAIBACH, H.I. **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration.** New York: Plenum Press, 1993. cap.14, p.261-276.
12. BARRY, B.W., BENNETT, S.L. Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.39, n.7, p.535-546, 1987.
13. BENTLEY, M.V.L.B. **Desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo corticosteróides: avaliação da liberação e penetração**

transcutânea por metodologia in vitro. São Paulo, 1994. 155p.
(Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmaceuticas - USP).

14. BHATIA, S.K., GAO, S., SINGH, J. Effects of penetration enhancers and iontophoresis on the FT-IR spectroscopy and LHRH permeability through porcine skin. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v. 47, p. 81-89, 1997.
15. BLOCK, L.H. Medicated Applications. In GENNARO, A.R., ed. **Remington's pharmaceutical sciences**. 18.ed., Easton: Mack, 1990. cap 84, p.1596-1602.
16. BOND, J.R., BARRY, B.W. Limitations of Hairless Mouse Skin as a Model for In-Vitro Permeation Studies Through Human Skin: Hydration Damage. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.90, n.4, p.486-489, 1988.
17. BONINA, F.P., MONTENEGRO, L., DECAPRARIIS, P., PALAGIANO, F., TRAPANI, G., LISO, G. In vitro and in vivo evaluation of polyoxyethylene indomethacin esters as dermal prodrugs. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v. 34, p. 223-232, 1995.
18. BORRÁS-BLASCO, J., LÓPEZ, A., MORANT, M.J., DÍEZ-SALES, O., HERRÁEZ-DOMÍNGUEZ, M. Influence of sodium lauryl sulphate on the in vitro percutaneous absorption of compounds with different lipophilicity. *E. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.5, p.15-22, 1997.
19. BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. **Statistics for experiments**. New York: John Wiley, 1978.653P.
20. BRONAUGH, R.L., COLLIER, S.W. In vitro methods for measuring skin permeation. In ZATZ, J.L., ed., **Skin permeation: fundamentals and**

application. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993. cap.4, pg. 93-111.

21. BROUNAUGH, R.L., STEWART, R. F. Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies III: Hydrophobic Compounds. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.73, n.9, p.1255-1258, 1984.
22. BROUNAUGH, R.L., STEWART, R.F. Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies IV: The Flow-Through Diffusion Cell. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.74, n.1, p.64-67, 1985.
23. BROUNAUGH, R.L., STEWART, R.F. Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies VI: Preparation of the Barrier Layer. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.75, n.5, p.487-491, 1986.
24. BROUNAUGH, R.L., STEWART, R.F., CONGDON, E.R. Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies II: Animal Models for Human Skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v.62, n.3, p.481-488, 1982.
25. CAPPEL, M.J., KREUTER, J. Effect of nonionic surfactants on transdermal drug delivery: I. Polysorbates. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.69, n.2, p.143-153, 1991.
26. CHIEN, Y.W. **Transdermal controlled systemic medications.** New York: Marcel Dekker, 1987. 440p.
27. CHOW, D.S-L., KAKA, I., WANG, T.I. Concentration-Dependent Enhancement of 1-Dodecylazacycloheptan-2-one, on the Percutaneous Penetration Kinetics of Triamcinolone Acetonide. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.73, n.12, p.1794-1799, 1984.

28. **CLEARY, G.W.** Transdermal delivery systems: a medical rationale. In **SHAH, V.P., MAIBACH, H.I.** **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration.** New York: Plenum Press, 1993. cap. 2, p.17-68.
29. **COOPER, E.R.** Alteration in skin permeability. In **CHIEN, Y.W.** **Transdermal controlled systemic medications.** New York: Marcel Dekker, 1987. cap.3, p.83-91.
30. **COOPER, E.R.** Increased Skin Permeability for Lipophilic Molecules. *J. Pharm. Sci.*, Wshington, v.73, n.8, p.1153-1156, 1984.
31. **CORDERO, J. A., ALARCON, L., ESCRIBANO, E., OBACH, R., DOMENECH, J.** A Comparative Study of the Transdermal Penetration of a Series of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.86, n.4, p.503-508, 1997.
32. **CORNWELL, P.A., BARRY, B.W., BOUWSTRA, 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. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.127, p.9-26, 1996.
33. **DI COLO, G., GIANNESI, C., NANNIPIERI, E., SERAFINI, M.F., VITALE, D.** Influence of drug-surfactant and skin-surfactant interations on percutaneous absorption of two model compounds from ointment bases in vitro. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.50, n.1, p.27-34, 1989.
34. **DIAS, M., FARINHA, A., FAUSTINO, E., HADGRAFT, J., PAIS, J., TOSCANO, C.** Topical delivery of caffeine from some commercial formulations. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.182, p.41-47, 1999.

35. ELYAN, B.M., SIDHOM, M.B., PLAKOGIANNIS, F.M. Evaluation of the Effect of Different Fatty Acids on the Percutaneous Absorption of Metaproterenol Sulfate. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.85, n.1, p.101-105, 1996.
36. FANG, J.Y., WU, P.C., HUANG, Y.B., TSAI, Y.H. In vitro permeation study of capsaicin and its synthetic derivatives from ointment bases using various skin types. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.126, p.119-128, 1995.
37. FLYNN, G.L. General introduction and conceptual differentiation of topical and transdermal drug delivery systems: differentiation with respect to delivery kinetics. In SHAH, V.P., MAIBACH, H.I. **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration**. New York: Plenum Press, 1993. cap.20, p.369-391.
38. FRANZ, T.J., LEHMAN, P.A., MCGUIRE, E.L. In vivo methods for the assessment of percutaneous absorption in man. In ZATZ, J.L., ed., **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993. cap. 3, p.73-92.
39. GODWIN, D.A., MICHNIAK, B.B., CREEK, K.E. Evaluation of Transdermal Penetration Enhancers Using A Novel Skin Alternative. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.86, n.9, p.1001-05, 1997.
40. GOLDEN, G.M., GUZEK, D.B., KENNEDY, A.H., MCKIE, J.E., POTTS, R.O. Stratum Corneum Lipid Phase Transitions and Water Barrier Properties. *Biochemistry*, Columbus, v.26, p.2382-2388, 1987.
41. GOODMAN M., BARRY, B.W. Lipid- protein- partitioning (LPP) theory of skin enhancer activity: finite dose technique. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.57, p. 29-40, 1989.

42. GUY, R.H., HADGRAFT, J. Percutaneous penetration enhancement: physicochemical considerations and implications for prodrugs design. In SLOAN, K.B., ed. **Prodrugs: topical and ocular drug delivery**. New York: Marcel Dekker, 1992. cap.1, p.1-16.
43. HADGRAFT, J., WALTERS, K.A., WOTTON, P.K. Facilitated percutaneous absorption: a comparison and evaluation of two in vitro models. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.32, p.257-263, 1986.
44. HARRISON, J.E., GROUNDWATER, P.W., BRAIN, K.R., HADGRAFT, J. Azone[®] induced fluidity in human stratum corneum. A fourier transform infrared spectroscopy investigation using the perdeuterated analogue. *J Controlled Release*, Amsterdam, v. 41, p.283- 290, 1996.
45. HARRISON, J.E., WATKINSON, A.C., GREEN, D.M., HADGRAFT, J., BRAIN, K. The Relative Effect of Azone[®] and Transcutol[®] on Permeant Diffusivity and Solubility in Human Stratum Corneum. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.13, n.4, p.542-546, 1996.
46. HENRY, S., MCALLISTER, D.V., ALLEN, M.G., PRAUSNITZ, M.R. Microfabricated Microneedles: A Novel Approach to Transdermal Drug Delivery. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.87, p.922-925, 1998.
47. HEWITT, P.G., POBLETE, N., WESTER, R.C., MAIBACH, H.I., SHAINHOUSE, J.Z. *In vitro* Cutaneous Disposition of a Topical Diclofenac Lotion in Human Skin: Effect of a Multi Dose Regimen. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.15, n.7, p.988- 992, 1998.
48. HO, H.O., HUANG, F.C., SOKOLOSKI, T.D., SHEU, M.T. The Influence of Cosolvents on the In- vitro Percutaneous Penetration of Diclofenac Sodium From a Gel System. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.46, p.636-642, 1994.

49. HORI, M., SATOH, S., MAIBACH, H.I. Classification of percutaneous penetration enhancers: a conceptual diagram. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.42, n.1, p.71-72, 1990.
50. HUANG, H.Y., WU, S-M., WANG, C-Y. Response Surface Method: A Novel Strategy to Optimize Iontophoretic Transdermal Delivery of Thyrotropin-releasing Hormone. *Pham. Res.*, Stuttgart, v. 13, n. 4, p. 547-552, 1996.
51. IMOTO, H., ZHOU, Z., STINCHCOMB, A.L, FLYNN, G.L. Transdermal Prodrug Concepts: Permeation of Buprenorphine and Its Alkyl Esters through Hairless Mouse Skin and Influence of Vehicles. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.19, p.263-267, 1996.
52. KALBITZ, J., NEUBERT, R., WOHLRAB, W. Modulation der Wirkstoffpenetration in die Haut. *Pharmazie*, Berlin, v.51, p.619-637, 1996.
53. KENNEDY, A.H., GOLDEN, G.M., GAY, C.L., GUY, R.H., FRANCOEUR, M.L., MAK, V.H.W. Stratum Corneum Lipids of Human Epidermal Keratinocyte Air-Liquid Cultures: Implications for Barrier Function. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.13, p.1162-1167, 1996.
54. KIMBER, I., The skin immune system. In MARZULLI, F.N., MAIBACH, H.I. *Dermatotoxicology*. Washington: Taylor & Francis, 1996. cap.10, p.131-141.
55. KITAGAWA, S., HOSOKAI, A., KASEDA, Y., YAMAMOTO, N., KANEKO, Y., MATSUOKA, E. Permeability of benzoic acid derivatives in excised guinea pig dorsal skin and effects of L-menthol. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.161, p.115-122, 1998.

56. KITAGAWA, S., LI, H., SATO, S. Skin permeation of parabens in excised guinea pig dorsal skin, its modification by penetration enhancers and their relationship with n-octanol /water partition coefficients. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.45, n.8, p.1354-1357, 1997.
57. KITAGAWA, S., YOKOCHI, N., MUROOKA, N. pH- Dependence of phase transition of the lipid bilayer of liposomes of stratum corneum lipids. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.126, p.49-56, 1995.
58. KOST, J., LANGER, R. Ultrasound - mediated transdermal drug delivery. In SHAH, V.P., MAIBACH, H.I. **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration**. New York: Plenum Press, 1993. cap.4, p.91-104.
59. KRAELING, M.E.K., LIPICKY, R.J., BRONAUGH, R.L. Metabolism of Benzocaine during Percutaneous Absorption in the Hairless Guinea Pig: Acetylbenzocaine Formation and Activity. *Skin Pharmacol.*, Basel, v.9, n.3, p.221-230, 1996.
60. KURAMOTO, M., TANAKA, T., MAKITA, H., NAKAMURA, Y., YATA, N. Characteristics of Shed Snake Skin Permeability to Indomethacin and Fatty Alcohols. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.48, p.680-684, 1996.
61. KURIHARA-BERGSTROM, T., KNUTSON, K., DENOBLE, L.J., GOATES, C.Y. Percutaneous Absorption Enhancement of an Ionic Molecule by Ethanol-Water Systems in Human Skin. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.7, n.7, p.762-766, 1990.
62. LAMBERT, W.J., HIGUCHI, W.I., KNUTSON, K., KRILL, S.L. Dose Dependent Enhancement Effects of Azone on Skin Permeability. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.6, p.798-803, 1989.

63. LIN, S.Y., HOU, S.J., HSU, T.H.S., YEH, F.L. Comparisons of Different Animal Skins with Human Skin in Drug Percutaneous Penetration Studies. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, Barcelona, v.14, n.8, p.645-654, 1992.
64. MAGNUSSON, B.M., RUNN, P. Effect of penetration enhancers on the permeation of the thyrotropin releasing hormone analogue pGlu-3-methyl-His-Pro amide through human epidermis. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.178, p.149-159, 1999.
65. MAITANI, Y., COUTEL - EGROS, A., OBATA, Y., NAGAI, T. Prediction of Skin Permeabilities of Diclofenac and Propranolol from Theoretical Partition Coefficients Determined from Cohesion Parameters. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.82, n.4, p.416-420, 1993.
66. MAITANI, Y., SHIMADA, K., NAGAI, T. *l*-Menthol, Oleic Acid and Lauricidin in Absorption Enhancement of Free and Sodium Salt of Diclofenac Using Ethanol Treated Silicone Membrane as Model for Skin. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.44, p.403-408, 1996.
67. MAK, V.H.W., POTTS, R.O., GUY, R.H. Percutaneous Penetration Enhancement in Vivo Measured by Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v. 7 , n.8, p. 835-841, 1990.
68. MARTIN, A., BUSTAMANTE, P. **Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences.** 4.ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap.13, p.324-361.
69. MEYER, M.C. Bioavailability of transdermal and topical dosage forms. In WELLING, P.G., TSE, F.L.S., DIGHE, S.V. **Pharmaceutical bioequivalence.** New York: Marcel Dekker, 1991. cap.7, p.169-221.

70. MICHNIAK, B.B., PLAYER, M.R., GODWIN, D.A., LOCKHART, C.C., SOWELL, J.W. In vitro evaluation of azone analogs as dermal penetration enhancers V. Miscellaneous compounds. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.161, p.169-178, 1998.
71. MODAMIO, P., LASTRA, C.F., MARIÑO, E.L. Transdermal absorption of celiprolol and bisoprolol in human skin in vitro. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.173, p.141-148, 1998.
72. MONTAGNA, W., CARLISLE, K. Structural Changes in Human Skin. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.73, p.47-53, 1979.
73. MONTEIRO-RIVIERE, N.A., Anatomical factors affecting barrier function. In MARZULLI, F.N., MAIBACH, H.I, *Dermatotoxicology*. Washington: Taylor & Francis, 1996. cap.1, p.3-33.
74. MONTI, D., SAETTONE, M.F., GIANNACCINI, B., GALLI-ANGELI, D. Enhancement of transdermal penetration of dapiprazole through hairless mouse skin. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.33, p.71-77, 1995.
75. MÜLLER, M., MASCHER, H., KIKUTA, C., SCHÄFER, S., BRUNNER, M., DORNER, G., EICHLER, H.G. Diclofenac concentrations in defined tissue layers after topical administration. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v.62, n.3, p.293-299, 1997.
76. NAITO, S., TSAI, Y.H. Percutaneous absorption of indomethacin from ointment bases in rabbits. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.8, p.263-276, 1981.

77. NIAZY, E.M. Influence of oleic acid and other permeation promoters on transdermal delivery of dihydroergotamine through rabbit skin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.67, n.1, p.97-100, 1991.
78. NISHIHATA, T., KAMADA, A., SAKAI, K., TAKAHASHI, K., MATSUMOTO, K., SHINOZAKI, K., TABATA, Y., KEIGAMI, M., MIYAGI, T., TATSUMI, N. Percutaneous absorption of diclofenac in rats and humans: aqueous gel formulation. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.46, p.1-7, 1988.
79. NISHIHATA, T., RYTTING, J. H., TAKAHASHI, K., SAKAI, K. Effects of Dithiothreitol and Ascorbate on the Penetration of Diclofenac Across Excised Rat Dorsal Skin. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.5, n.11, p.738-740, 1988.
80. OBATA, Y., TAKAYAMA, K., MAITANI, Y., MACHIDA, Y., NAGAI, T. Effect of ethanol on skin permeation of nonionized and ionized diclofenac. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.89, p.191-198, 1993.
81. OBATA, Y., TAKAYAMA, K., MAITANI, Y., MACHIDA, Y., NAGAI, T. Effect of Pretreatment of Skin with Cyclic Monoterpenes on Permeation of Diclofenac in Hairless Rat. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.16, n.3, p.312-314, 1993.
82. OBATA, Y., TAKAYAMA, K., OKABE, H., NAGAI, T. Effect of Cyclic Monoterpenes on Percutaneous Absorption in the Case of a Water-Soluble Drug (Diclofenac Sodium). *Drug Des. Delivery*, London, v.6, p.319-328, 1990.
83. OKAMOTO, H., HASHIDA, M., SEZAKI, H. Structure-Activity Relationship of 1-Alkyl - or 1-Alkenylazacycloalkanone Derivatives as

Percutaneous Penetration Enhancers. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.77, n.5, p.418-423, 1988.

84. OKAMOTO, H., MUTA, K., HASHIDA, M., SEZAKI, H. Percutaneous Penetration of Acyclovir Through Excised Hairless Mouse and Rat Skin: Effect of Vehicle and Percutaneous Penetration Enhancer. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.7, n.1, p.64-68, 1990.
85. OSTRENGA, J., STEINMETZ, C., POULSEN, B. Significance of Vehicle Composition I: Relationship between Topical Vehicle Composition, Skin Penetrability, and Clinical Efficacy. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.60, n.8, p.1175-1179, 1971.
86. OSTRENGA, J., STEINMETZ, C., POULSEN, B., YETT, S. Significance of Vehicle Composition II: Prediction of Optimal Vehicle Composition. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.60, n.8, p.1180-1183, 1971.
87. PATIL, S., SINGH, P., SZOLAR-PLATZER, C., MAIBACH, H. Epidermal Enzymes as Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery? *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.85, n.3, p.249-252, 1996.
88. PERSHING, L.K., LAMBERT, L.D., KNUTSON, K. Mechanism of Ethanol-Enhanced Estradiol Permeation Across Human Skin in Vivo. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.7, n.2, p.170-175, 1990.
89. PIROT, F., BERARDESCA, E., KALIA, Y.N., SINGH, M., MAIBACH, H.I., GUY, R.H. Stratum Corneum Thickness and Apparent Water Diffusivity: Facile and Noninvasive Quantitation *In Vivo*. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.15, n.3, p.492-494, 1998.

90. PORZIO, S., CASELLI, G., PELLEGRINI, L., PALLOTTINI, V., ROSARIO, M., COPPOLA, A., BOLTRI, L., GENTILE, M., CLAVENNA, G., MELILLO, G. Efficacy of a new topical gel-spray formulation of ketoprofen lysine salt in the rat: Percutaneous permeation *in vitro* and *in vivo* and pharmacological activity. *Pharmacol. Res.*, London, v.37, p.41-47, 1998.
91. PRÍBORSKÝ, J., MÜHLBACHOVÁ, E. Evaluation of *In Vitro* Percutaneous Absorption across Human Skin and in Animal Models. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.7, n.7, p.468-472, 1990.
92. QUINTANAR-GUERRERO, D., GANEM-QUINTANAR, A., TAPIA-OLGUÍN, P., KALIA, Y.N., BURI, P. The effect of Keratolytic Agents on the Permeability of Three Imidazole Antimycotic Drugs Through the Human Nail. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v.24, p.685-690, 1998.
93. REGNIER, M., CARON, D., REICHERT, U., SCHAEFER, H. Barrier Function of Human Skin and Human Reconstructed Epidermis. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.82, n.4, p.404-407, 1993.
94. REIFENRATH, W.G., HAWKINS, G.S., KURTZ, M.S. Percutaneous Penetration and Skin Retention of Topically Applied Compounds: an *In Vitro* - *In Vivo* Study. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.80, n.6, p.526-532, 1991.
95. RIEGER, M.M. Factors affecting sorption of topically applied substances. In ZATZ, J.L., ed., **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993. cap.2, p. 33-72.

96. ROLLAND, A., DEMICHELIS, G., JAMOULLE, J.C., SHROOT, B. Influence of Formulation, Receptor Fluid, and Occlusion, on in Vitro Drug Release from Topical Dosage Forms, Using an Automated Flow- Through Diffusion Cell. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.9, n.1, p.82-86, 1992.
97. ROLLAND, A., WAGNER, N., CHATELUS, A., SHROOT, B., SCHAEFER, H. Site- Specific Drug Delivery to Pilosebaceous Structures Using Polymeric Microspheres. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.10, n.12, p.1738-1744, 1993.
98. ROPER, C.S., HOWES, D., BLAIN, P.G., WILLIAMS, F.M. Percutaneous Penetration of 2-Phenoxyethanol through Rat and Human Skin. *Food Chem. Toxic.*, Oxford, v.35, p. 1009-1016, 1997.
99. ROY, S.D., ROOS, E., SHARMA, K. Transdermal Delivery of Buprenorphine Through Cadaver Skin. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.83, n.2, p.126-138, 1986.
100. SAH, A, MUKHERJEE, S, WICKETT, R.R. An *in vitro* study of the effects of formulation variables and product structure on percutaneous absorption of lactic acid. *J. Cosmet. Sci.*, New York, v.49, p.257- 273, 1998.
101. SAIJA, A., TOMAINO, A., TROMBETTA, D., GIACCHI, M., DE PASQUALLE, A., BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.175, p.85-94, 1998.
102. SANTOS, D., BAHIA, M.F.G. Promotores de Absorção e Penetração. *Cosmet. Toiletries Ed. Port.*, São Paulo, v.7, n.5, p.42-51, 1995.

103. SANTOS, D., PRISTA, L.V.N., GUEDES BAHIA, M.F., SANTOS, E.R. Estudos de cedência do fentiazac "in vitro": influência da dimetilformamida (DMF), laurilsulfato de sódio (LsS) e do Tween 80. *Rev. Port. Farm.*, Lisboa, v.XLIII, n.1, p.29-31, 1993.
104. SARPOTDAR, P.P. Iontophoresis. In ZATZ, J.L., ed., **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993. cap.12, p.239-250.
105. SARPOTDAR, P.P., ZATZ, J.L. Evaluation of Penetration Enhancement of Lidocaine by Nonionic Surfactantes Through Hairless Mouse Skin In Vitro. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 75, n.2, p.176-181, 1986.
106. SASAKI, H., KOJIMA, M., MORI, Y., NAKAMURA, J., SHIBASAKI, J. Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal drug delivery I. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.44, p.15-24, 1988.
107. SASAKI, H., KOJIMA, M., MORI, Y., NAKAMURA, J., SHIBAZAKI, J. Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal drug delivery. II. Effect of application concentration and pre-treatment of enhancer. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.60, p.177-183, 1990.
108. SASAKI, H., NISHIDA, K., NAKAMURA, J., Pyrrolidones as penetration enhancers. In SMITH, EW., MAIBACH, H.I. *Percutaneous penetration enhancers*. Boca Raton: CRC Press, 1995. cap 7.1, p.211-220.
109. SATO, S., HIROTANI, Y., OGURA, N., SASAKI, E., KITAGAWA, S. Enhancing Effect of N- Dodecyl -2- pyrrolidone on the Percutaneous Absorption of 5-Fluorouracil Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.46, p. 831-836, 1998.

110. SEKI, T., KAWAGUCHI, T., SUGIBAYASHI, K., JUNI, K., MORIMOTO, Y. Percutaneous absorption of azidothymidine in rats. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.57, p.73-75, 1989.
111. SHAH, J.C. Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.90, n.2, p.161-169, 1993.
112. SHAH, J.C., KAKA, I., TENJARLA, S., LAU, S.W.J., CHOW, D. Analysis of percutaneous permeation data: II. Evaluation of the lag time method. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.109, p.283-290, 1994.
113. SHAH, V.P., FLYNN, G.L., GUY, R.H., MAIBACH, H.I., SCHAEFER, H., SKELLY, J.P., WESTER, R.C., YACOBI, A. In Vivo Percutaneous Penetration/Absorption, Washington, D.C. May 1989. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.8, p.1071-1075, 1991.
114. SHAH, V.P., MAIBACH, H.I. **Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration.** New York: Plenum Press, 1993. 453p.
115. SHERERTZ, E.F., SLOAN, K.B., MCTIERNAN, R.G. Transdermal delivery of 5- fluorouracil through skin of hairless mice and humans in vitro: a comparison of the effect of formulations and a prodrug. *Arch. Dermatol. Res.*, Berlin, v.282, p.463-468, 1990.
116. SLOAN, K.B. Functional group considerations in the development of prodrugs approaches to solving topical delivery problems. In: **Progrugs - topical and ocular delivery drug delivery.** New York: Marcel Dekker, 1992. cap.1, p.17-116.
117. SILVA, E.C. **Desenvolvimento de emulsões cosméticas utilizando o óleo de pequi, Caryocar brasilienses camb.** São Paulo, 1994.

112p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

118. SKELLY, J.P., SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., GUY, R. H., WESTER, R.C., FLYNN, G., YACOBI, A. FDA and AAPS Report of the Workshop on Principles and Practices of In Vitro Percutaneous Penetration Studies: Relevance to Bioavailability and Bioequivalence. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.4, n.3, p. 265-267, 1987.
119. TREFFEL, P., GABARD, B. Skin Penetration and Sun Protection Factor of Ultra-Violet Filters from Two Vehicles. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.13, p.770-774, 1996.
120. TSAI, J.C., GUY, R.H., THORNFELDT, C.R., GAO, W.N., FEINGOLD, K.R., ELIAS, P. M. Metabolic Approaches To Enhance Transdermal Drug Delivery. 1. Effect of Lipid Synthesis Inhibitors. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.85, n.6, p.643-648, 1996.
121. VANBEVER, R., BOULENGÉ, E., PRÉAT, V. Transdermal Delivery of Fentanyl by Electroporation I. Influence of Electrical Factors. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.13, n. 4, p.559-565, 1996.
122. VELASCO, M.V.R. **Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico.** São Paulo, 1993. 144p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
123. WALKER, M., HULME, T.A., RIPPON, M.G., WALMSLEY, R.S., GUNNIGLE, S., LEWIN, M., WINSEY, S. In Vitro Model(s) for the Percutaneous Delivery of Active Tissue Repair Agents. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.86, n.12, p.1379-1384, 1997.

124. WALTERS, K.A., BRAIN, K.R., DRESSLER, W.E., GREEN, D.M., HOWES, D., JAMES, V.J., KELLING, C.K., WATKINSON, A.C., GETTINGS, S.D. Percutaneous Penetration of N-Nitroso-N-Methyldodecylamine through Human Skin *In Vitro*: Application from Cosmetic Vehicles. *Food Chem. Toxic.*, Oxford, v.35, p.705-712, 1997.
125. WESTER, R.C., CHRISTOFFEL, J., HARTWAY, T., POBLETE, N., MAIBACH, H.I., FORSELL, J. Human Cadaver Skin Viability for *In Vitro* Percutaneous Absorption: Storage and Detrimental Effects of Heat-Separation and Freezing. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.15, n.1, p.82-84, 1998.
126. WHITE, S.H., MIREJOVSKY, D., KING, G.I. Structure of Lamellar Lipid Domains and Corneocyte Envelopes of Murine Stratum Corneum. An X- ray Diffraction Study. *Biochemistry*, Columbus, v.27, p.3725- 3732, 1988.
127. WILLIAMS, A.C., BARRY, B.W. Urea analogues in propylene glycol as penetration enhancers in human skin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.36, p.43-50, 1989.
128. WU, P.C., HUANG, Y.B., FANG, J.Y., TSAI, Y.H. Percutaneous Absorption of Captopril from Hydrophilic Cellulose Derivatives Through Excised Rabbit Skin and Human Skin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v.24, p.179-182, 1998.
129. YAMAGUSHI, Y., USAMI, T., NATSUME, H., AOYAGI, T., NAGASE, Y., SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y. Evaluation of Skin Permeability of Drugs by Newly Prepared Polymer Membranes. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.45, p.537-541, 1997.

130. YAMASHITA, F., BANDO, H., KOYAMA, Y., KITAGAWA, S., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. In Vivo and In Vitro Analysis of Skin Penetration Enhancement Based on a Two- Layer Diffusion Model with Polar and Nonpolar Routes in the Stratum Corneum. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.11, n.2, p.185-191 ,1994.
131. YAMASHITA, F., YOSHIOKA, T., KOYAMA, Y., OKAMOTO, H., SEZAKI, H., HASHIDA, M. Analysis of Skin Penetration Enhancement Based on a Two- Layer Skin Diffusion Model with Polar and Nonpolar Routes in the Stratum Corneum: Dose-Dependent Effect of 1-Geranylazacycloheptan-2- one on Drugs with Different Lipophilicities. *Biol Pharm. Bull.*, Tokyo, v. 16 , p. 690-697, 1993.
132. YOKOMIZO, Y., SAGITANI, H. Effects of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of guinea pigs in vitro. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.38, p.267-274, 1996.
133. ZATZ, J. L. Aumento da Penetração Cutânea. *Cosmet. Toiletries Ed. Port.*, São Paulo, v.7, n.5, p.52-58, 1995.
134. ZATZ, J.L. Scratching the surface: rationale and approaches to skin permeation. In: **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993. cap 1, p.11-31.
135. ZHANG, I., SHUNG, K.K., EDWARDS, D.A. Hydrogels with Enhanced Mass Transfer for Transdermal Drug Delivery. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.85, p.1312-1316, 1996.