

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

**Avaliação da eficácia e segurança da papaína como promotor de  
absorção cutâneo utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de  
queratinócitos humanos**

**Patricia Santos Lopes**

**Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR**

**Orientador:  
Profa. Dra. Telma Mary Kaneko**

**São Paulo  
2003**

*17.667*

**DEDALUS - Acervo - CQ**



30100005535

**Ficha Catalográfica**

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

Lopes, Patricia Santos

L864a      Avaliação da eficácia e segurança da papaína como promotor de absorção utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de queratinócitos humanos / Patricia Santos Lopes. -- São Paulo, 2003.

215p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Kaneko, Telma Mary

1. Fármaco : Controle de qualidade 2. Célula : Cultura : Biologia 3. Papaína : Farmacologia 4. Biofísica : Métodos I. T. II. Kaneko, Telma Mary, orientador.

615.19015 CDD

Patricia Santos Lopes

Avaliação da eficácia e segurança da papaína como promotor de absorção cutâneo utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de queratinócitos humanos

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko  
orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

---

3º. examinador

---

4º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

***Agradeço a Deus, que em Sua Infinita Sabedoria e Bondade, colocou em meu caminho pessoas tão especiais, me iluminou, ensinou, e ensina todos os dias, as grandes virtude da humildade e paciência. Obrigada Senhor pela Sua constante presença na minha vida, pelo consolo na hora do desespero e pela alegria de alcançar mais um objetivo!***

***Muito obrigada a meu Pai, Carlos, exemplo constante de realização e minha Mãe, Thereza, pelo colo e incentivo. Obrigada pelo amor infinito de vocês.***

***Aos meus irmãos, Mariana e Daniel, minhas tias Tula e Mota e minha querida Naira, agradeço todo apoio que vocês sempre me deram, além da paciência e atenção, sem as quais sei que o caminho teria sido muito mais difícil.***

***Lara e Elda, obrigada por ouvirem os problemas, sugerirem soluções e me compreenderem sempre.***

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



## Agradecimentos

A realização do presente trabalho não seria possível sem a valiosa e imprescindível colaboração de pessoas extremamente especiais e generosas que se dispuseram a ajudar, socorrer e ensinar. São elas:

- Professor Dr. Yoshio – laboratório de Caracterização de Polímeros do Instituto de Química da USP.
- Professor Dr. Henrique Toma – laboratório de Química Supramolecular do Instituto de Química da USP.
- Professor Dr. Ii-sei Watanabe – Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Anatomia do ICB/USP – Biomédicas III.
- Professora Dra. Dalva Lúcia Faria – laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da USP
- Dra. Mônica Beatriz Mathor – Centro de Tecnologia de Radiações - IPEN
- Dra. Marisa Roma Herson – Banco de Tecidos – FMUSP

Auxílio valioso também foi prestado pelos técnicos Ana Maria, Boletta, Wilson, Gerson e Silvana e pós-graduandos, Laércio, Andréa Rodas e Luciana Menegatti. Gostaria de agradecer aos estagiários Daniel Fantinatti e Carol Takano pela inestimável colaboração e a Ruth, Beth, Benê, Jorge e Elaine, pelo esclarecimento das dúvidas burocráticas.

Agradecimentos especiais a Profa. Dra. Elizabeth Igne por todo apoio, a Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto pela ajuda, a Prof. Dra. Mitsuko Taba Ohara pela colaboração e a Prof. Dra. Maria Valéria Robles por todos os esclarecimentos com relação a papaína.

Agradeço a Adriana de Almeida Barreiros, bibliotecária do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, pela pronta revisão das referências bibliográficas, pelas conversas, risadas e conselhos.

Agradecimentos especiais aos meus queridos amigos, que estiveram presente em todos os momentos, me apoiando, ajudando, consolando, me fazendo chorar de rir ou enxugando minhas lágrimas. Claudinéia, Paola, Tonho, Enrique, Márcio Ferrarini, Marcelo Coimbra, Julia Yamamoto, Caci, Carla Schultze, Vânia, Pedro, Leda, Daniela, Elissa, Álvaro, Carla, José Sobrinho, Ana Faria, Renata, Fabiana, Edu e Naira.

Enfim, agradeço a todos aqueles que direta e indiretamente, contribuíram para a finalização deste trabalho.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	5
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1 Epiderme.....	9
3.1.1 Lipídeos .....	12
3.1.2 Proteínas .....	19
3.1.3 Coesão celular e descamação do estrato córneo na manutenção da barreira da pele.....	26
3.2 Promotores de absorção .....	34
3.3 Avaliação, através do uso de cultura celular de queratinócitos humanos, da segurança e eficácia da papaína como promotor de absorção. ....	41
3.4 Metodologias biofísicas .....	49
3.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC .....	50
3.4.2 Espectroscopia vibracional .....	56
3.4.3 Microscopia.....	74
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	77
4.1 Material .....	78
4.2 Métodos .....	79
4.2.1 Avaliação da eficácia e da segurança da papaína.....	80
4.2.2 Preparação das membranas para as análises por métodos biofísicos.....	85

4.2.3. Técnicas Biofísicas .....	86
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>92</b>
5.1 Influência da papaína em diversos estágios da cultura celular de queratinócitos .....	96
5.2 Determinação do tempo de vida celular – “Life Span” .....	121
5.3 Metodologias biofísicas .....	137
5.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC .....	139
5.3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada - ATR FT-IR .....	151
5.3.3 Espectroscopia fotoacústica .....	165
5.3.4 Espectroscopia FT- Raman .....	171
5.4 Microscopia eletrônica de transmissão .....	179
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>196</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS* .....</b>	<b>198</b>

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Tipos de lipídeos encontrados nas diferentes camadas da pele e suas principais funções.....	16
<b>Tabela 2.</b> Proteínas estruturais da pele e cabelo .....	22
<b>Tabela 3.</b> Freqüências ( $\text{cm}^{-1}$ ) de FT Raman e FT-IR e descrição aproximada dos modos vibracionais para o estrato córneo humano, encontradas em literatura .....	62
<b>Tabela 4.</b> Esquema do experimento para verificar a influência da papaína 0,2% (p/v) como promotor de absorção em cultura celular de queratinócitos humanos HK186. ....	82
<b>Tabela 5.</b> Dados relativos ao controle no experimento 1 da determinação do tempo de vida celular. ....	120
<b>Tabela 6.</b> Dados relativos ao tratamento de 4 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 2 da determinação do tempo de vida celular.....	123
<b>Tabela 7.</b> Dados relativos ao tratamento de 24 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 2 da determinação do tempo de vida celular.....	125
<b>Tabela 8.</b> Dados relativos ao tratamento de 48 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 2 da determinação do tempo de vida celular.....	127
<b>Tabela 9.</b> Cálculo do número de gerações celulares para o controle, 4 horas, 24 horas e 48 horas de contato dos queratinócitos humanos HK 186, com a solução de papaína 0,2% (p/v) no experimento 2 da "life span". ....	129
<b>Tabela 10.</b> Dados relativos ao controle no experimento 3 da determinação do tempo de vida celular. ....	131
<b>Tabela 11.</b> Dados relativos ao tratamento de 4 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 3 da determinação do tempo de vida celular.....	132
<b>Tabela 12.</b> Dados relativos ao tratamento de 24 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 3 da determinação do tempo de vida celular.....	133
<b>Tabela 13.</b> Dados relativos ao tratamento de 48 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 3 da determinação do tempo de vida celular.....	134

<b>Tabela 14.</b> Cálculo do número de gerações celulares para o controle, 4 horas, 24 horas e 48 horas de contato dos queratinócitos humanos HK 186, com a solução de papaína 0,2% (p/v) no experimento 3 da “life span”.....	135
<b>Tabela 15.</b> Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) encontrados nos espectros obtidos com espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier em refletância total atenuada. ....	156
<b>Tabela 16.</b> Características das bandas no infravermelho das amidas protéicas . ....	159
<b>Tabela 17.</b> Frequência características e tentativas de atribuição a diferentes aminoácidos. ....	161
<b>Tabela 18.</b> Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) encontrados nos espectros obtidos com espectroscopia fotoacústica. ....	167
<b>Tabela 19.</b> Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) encontrados nos espectros obtidos com espectroscopia Raman com transformadas de Fourier. ....	177

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desenho pele humana, mostrando as diversas camadas que a compõe. ....	9
<b>Figura 2.</b> Desenho da epiderme humana, mostrando camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, lúcida e estrato córneo, assim como ducto sudoríparo e pêlo. ....	11
<b>Figura 3.</b> Três modelos de $\alpha$ -hélice, mostrando diferentes aspectos de sua estrutura. (a) Formação de $\alpha$ -hélice com orientação à direita. (b) Modelo mostrando as pontes de hidrogênio intracadeia. (c) Unidade repetitiva é um único passo da hélice. ....	20
<b>Figura 4.</b> A $\beta$ -conformação das cadeias da $\beta$ -queratina. (a) Três cadeias arranjadas em folhas pregueadas, mostrando as pontes de hidrogênio interligando cadeias adjacentes. (b) Vista lateral mostrando os grupos R projetando-se para fora da folha pregueada. ....	21
<b>Figura 5.</b> Diagrama esquemático da diferenciação epidérmica mostrando as mudanças na morfologia dos queratinócitos durante o processo de diferenciação, relacionado com as alterações conhecidas na expressão gênica das proteínas estruturais envolvidas. ....	24
<b>Figura 6.</b> O desmossomo. Estrutura em espelho constituindo um ponto de junção entre as duas células, a e b ....	28
<b>Figura 7.</b> Sub-sítios específicos da papaína revelados pelo mapa de sitio ativo. ....	40
<b>Figura 8.</b> Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre "feeder layer" de fibroblastos 3T3 irradiados do controle do experimento 1, estágio de colônias separadas. A = início; B = após 4 horas; C = após 8 horas; D = após 24 horas; E = após 48 horas; F = após 56 horas; G = após 5 dias; H = após 7 dias (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100). ....	97

**Figura 9.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após 4 horas de tratamento com papaína 0,2% (p/v) do experimento 1, estágio de colônias separadas. A = após 4 horas; B = após 8 horas; C = após 24 horas; D = após 48 horas; E = após 7 dias (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).....98

**Figura 10.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após 8 horas de tratamento com papaína 0,2% (p/v) do experimento 1, estágio de colônias separadas. A = T8 após 8 horas (colônias boas seta preta, colônias feias seta vermelha); B = após 24 horas; C = após 48 horas; D = após 5 dias (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).....100

**Figura 11.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após 24 horas de tratamento com papaína 0,2% (p/v) do experimento 1, **estágio de colônias separadas**. A = T24 após 24 horas; B = após 48 horas; C = após 7 dias (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).....101

**Figura 12.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após 48 horas de tratamento com papaína 0,2% (p/v) do experimento 1, **estágio de colônias separadas**. A = T48 após 48 horas; B = após 56 horas; C = após 5 dias; D = após 7 dias; E = após 15 dias (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).....103

**Figura 13.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após 56 horas de tratamento com papaína 0,2% (p/v) do experimento 1, **estágio de colônias separadas** (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).....104

**Figura 14.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados relativas ao experimento 1, estágio de **colônias em semi-confluência**. A = início; B = após 4 horas de tratamento; C = controle após 8 horas; D = após 8 horas de tratamento; E = controle após



24 horas; F = após 24 horas de tratamento (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).....105

**Figura 15.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados, experimento 1, **estágio de colônias em semi-confluência**. A = controle após 48 horas; B = T48 após 48 horas; C = controle após 56 horas; D = T56 após 56 horas (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).....106

**Figura 16.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados relativas ao experimento 1, **estágio de confluência de 1 dia**. A = início do experimento; B = após tratamento com papaína por 4 horas; C = controle após 8 horas; D = 8 horas de tratamento; E = após 24 horas; F = T4 após 24 horas (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100). .....108

**Figura 17.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após tratamento com papaína 0,2% (p/v), experimento 1, **estágio de 1 dia de confluência**. A = controle após 48 horas; B = T48 após 48 horas; C = controle após 56 horas; D = T56 após 56 horas de tratamento (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100). .....109

**Figura 18.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados relativas ao experimento 1, **estágio de 1 semana de confluência**. A = início; B = após 4 horas; C = T4 após 4 horas de tratamento; D = após 8 horas (com meio de cultura); E = após 8 horas (sem meio de cultura); F = T8 após 8 horas de tratamento (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).....112

**Figura 19.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após tratamento com papaína 0,2% (p/v), experimento 1 **estágio de 1 semana de confluência**. A = após 24 horas; B = T24 após 24 horas; C = após 48h; D = T48 após 48 horas; E = após 56 horas; F = T56 após 56 horas (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100). .....113

**Figura 20.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados relativas ao experimento 1, estágio de **15 dias de confluência**. A = controle no início; B = controle após 4 horas; C = T4 após 4 horas; D = controle após 8 horas; E = T8 após 8 horas (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100). .....116

**Figura 21.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados relativas ao experimento 1, estágio de **15 dias de confluência**. A = controle após 24 horas; B = T24 após 24 horas; C = controle após 48 horas; D = T48 após 48 horas; E = controle após 56 horas; F = T56 após 56 horas (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100). .....117

**Figura 22.** Epitélios formados após 21 dias de experimento após tratamento em diferentes tempos com papaína 0,2% (p/v) em diversos estágios da cultura celular de queratinócitos. A = todos os epitélios formados; B = Detalhe de um epitélio. ....118

**Figura 23.** Histograma do número de colônias totais e abortivas do controle em relação as passagens semeadas no teste de EFC (Eficiência de Formação de Colônia) do experimento 2. ....120

**Figura 24.** Colônias formadas por queratinócitos humanos HK 186 da passagem P3 do experimento 2 (“life span”). .....121

**Figura 25.** Colônias formadas por queratinócitos humanos HK 186 em diferentes passagens do controle do experimento 2 (“life span”). .....121

**Figura 26.** Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 4 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (Eficiência de Formação de Colônia) do experimento 2. ....123

**Figura 27.** Colônias formadas por queratinócitos humanos HK 186 em diferentes passagens após tratamento de 4 horas com papaína 0,2% (p/v) do experimento 2 (“life span”). .....124

<b>Figura 28.</b> Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (eficiência de formação de colônia) do experimento 2.....	125
<b>Figura 29.</b> Colônias formadas por queratinócitos humanos HK 186 em diferentes passagens após tratamento de 24 horas com papaína 0,2% (p/v) do experimento 2 ("life span"). .....	126
<b>Figura 30.</b> Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (eficiência de formação de colônia) do experimento 2. ....	127
<b>Figura 31.</b> Colônias formadas por queratinócitos humanos HK 186 em diferentes passagens após tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v) do experimento 2 ("life span"). .....	128
<b>Figura 32.</b> Tempo de geração dos queratinócitos humanos HK 186 nos diferentes tempos de exposição a papaína 2% (p/v) e no controle. Experimento 2 da "life span". .....	129
<b>Figura 33.</b> Histograma do número de colônias totais e abortivas do controle em relação as passagens semeadas no teste de EFC (Eficiência de formação de colônia) do experimento 3.....	131
<b>Figura 34.</b> Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 4 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (Eficiência de formação de colônia) do experimento 3. ....	132
<b>Figura 35.</b> Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (eficiência de formação de colônia) do experimento 3. ....	133

<b>Figura 36.</b> Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (eficiência de formação de colônia) do experimento 3. ....	134
<b>Figura 37.</b> Tempo de geração dos queratinócitos humanos HK 186 nos diferentes tempos de exposição a papaína 2% (p/v) e no controle. Experimento 3 da "life span". ....	135
<b>Figura 38.</b> Curva de DSC da epiderme cultivada controle (sem tratamento), primeira corrida. ....	139
<b>Figura 39.</b> Curva de DSC da epiderme cultivada controle (sem tratamento), segunda corrida. ....	140
<b>Figura 40.</b> Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2% (p/v) por 4 horas, primeira corrida. ....	140
<b>Figura 41.</b> Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2% (p/v) por 4 horas, segunda corrida. ....	141
<b>Figura 42.</b> Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2% (p/v) por 24 horas, primeira corrida. ....	142
<b>Figura 43.</b> Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2% (p/v) por 24 horas, segunda corrida. ....	142
<b>Figura 44.</b> Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2% (p/v) por 48 horas, primeira corrida. ....	144
<b>Figura 45.</b> Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2%(p/v) por 48 horas, segunda corrida. ....	144
<b>Figura 46.</b> Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen controle (sem tratamento), primeira corrida. ....	145

<b>Figura 47.</b> Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen controle (sem tratamento), segunda corrida.	146
<b>Figura 48.</b> Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 4 horas, primeira corrida.	147
<b>Figura 49.</b> Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 4 horas, segunda corrida.	147
<b>Figura 50.</b> Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 24 horas, primeira corrida.	148
<b>Figura 51.</b> Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 24 horas, segunda corrida.	148
<b>Figura 52.</b> Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 48 horas, primeira corrida.	149
<b>Figura 53.</b> Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 48 horas, segunda corrida.	149
<b>Figura 54.</b> Espectro obtido com ATR FT-IR da epiderme cultivada sem tratamento (controle) e exposta por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v).	154
<b>Figura 55.</b> Espectro obtido com ATR FT-IR do estrato córneo humano sem tratamento (controle) e exposto por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v).	155

<b>Figura 56.</b> Espectro fotoacústico da epiderme cultivada sem tratamento (controle) e exposta por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). .....	165
<b>Figura 57.</b> Espectro fotoacústico do estrato córneo humano sem tratamento (controle) e exposto por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). .....	166
<b>Figura 58.</b> Espectro FT-Raman da epiderme cultivada sem tratamento (controle) e exposta por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). Faixa de número de onda de 100-3500 $\text{cm}^{-1}$ . .....	170
<b>Figura 59.</b> Detalhe do espectro FT-Raman da epiderme cultivada sem tratamento (controle) e exposta por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). Faixa de número de onda de 100-1800 $\text{cm}^{-1}$ . .....	171
<b>Figura 60.</b> Espectro FT-Raman da epiderme cultivada sem tratamento (controle) e exposta por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). Faixa de número de onda de 2750-3250 $\text{cm}^{-1}$ . .....	172
<b>Figura 61.</b> Espectro FT-Raman do estrato córneo humano sem tratamento (controle) e exposto por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). Faixa de número de onda de 250-3500 $\text{cm}^{-1}$ . .....	174
<b>Figura 62.</b> Detalhe do espectro FT-Raman do estrato córneo humano sem tratamento (controle) e exposto por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). Faixa de número de onda de 900-1800 $\text{cm}^{-1}$ . .....	175
<b>Figura 63.</b> Detalhe do espectro FT-Raman do estrato córneo humano sem tratamento (controle) e exposto por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). faixa de número de onda de 2750-3250 $\text{cm}^{-1}$ . .....	176
<b>Figura 64.</b> Micrografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia óptica, aumento x 40. ....	181
<b>Figura 65.</b> Micrografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia óptica, aumento x 100. ....	181

<b>Figura 66.</b> Micrografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia eletrônico de transmissão x 30.000 .....	182
<b>Figura 67.</b> Micrografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia eletrônica de transmissão x 50.000 .....	182
<b>Figura 68.</b> Micrografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia eletrônica de transmissão x 50.000. Observar os corneodesmossomos, caracterizados por uma placa mais densa (seta)....	182
<b>Figura 69.</b> Micrografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia eletrônica de transmissão, aumento x 50.000. Observar os corneodesmossomos ligando os corneócitos. ....	183
<b>Figura 70.</b> Micrografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia eletrônica de transmissão, aumento x 75.000. ....	183
<b>Figura 71.</b> Micrografia da epiderme humana após tratamento por 4 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia óptica, aumento x 100.....	184
<b>Figura 72.</b> Micrografia da epiderme humana após tratamento por 4 horas com papaína 0,2% (p/v) e período de recuperação de 44 horas. Microscopia eletrônica de transmissão. A = aumento x 20000; B = aumento x 50000; C = aumento x 25000; D = aumento x 50000.....	185
<b>Figura 73.</b> Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia óptica, aumento x 40.....	186
<b>Figura 74.</b> Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia óptica, aumento x 100.....	186
<b>Figura 75.</b> Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia eletrônica de transmissão, A = x 15000, última camada; B = x 40000, citoesqueleto; C = x 50000, concentração de desmossomos; D = x 75000, citoesqueleto. ....	187

<b>Figura 76.</b> Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v) e período de recuperação de 24 horas. Microscopia óptica, aumento x 40.....	188
<b>Figura 77.</b> Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v) e período de recuperação de 24 horas. Microscopia óptica, aumento x 100.....	188
<b>Figura 78.</b> Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v) e período de recuperação de 24 horas. Microscopia eletrônica de transmissão, A = x 10000; B = x 20000; C = x 50000; D = x 50000.....	189
<b>Figura 79.</b> Micrografia da epiderme humana após tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia óptica, aumento x 40.....	190
<b>Figura 80.</b> Micrografia da epiderme humana após tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia óptica, aumento x 100.....	190
<b>Figura 81.</b> Micrografia da epiderme humana após 48 horas de tratamento com papaína 0,2 % (p/v). Microscopia eletrônica de transmissão, A = x 30.000; B= x 30000, desmossomos; C = x 60000, desmossomos; D= x 60000; E = x 75000.....	191



## **LISTA DE ABREVIações**

ATR FT-IR – espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada;

DMSO – dimetil sulfóxido

DSC – calorimetria exploratória diferencial;

EFC – eficiência de formação de colônia;

EGF – fator de crescimento epidermal;

FDA – food and drug administration

FT- Raman – espectroscopia Raman com transformada de Fourier;

KGM – keratynocyte growth medium

LPP – teoria de lipídeos, proteína e partição;

PAS – espectroscopia Fotoacústica;

SCCE – stratum comeum chymotryptic enzyme;

SCCL – stratum comeum cathepsin L – like enzyme

SCTE – stratum comeum tripsin enzyme

SCTP – stratum comeum thiol protease

SEM – scanning electron microscopy – microscopia eletrônica de varredura;

TEM – transmission electron microscopy – microscopia eletrônica de transmissão

## RESUMO

Com o intuito de verificar a eficácia e segurança da papaína como promotor de penetração cutâneo foram utilizados métodos biofísicos, microscopia eletrônica e cultura celular de queratinócitos humanos. Foi empregado como material biológico o estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen e mama, além de epitélios formados *in vitro*, a partir da cultura celular de queratinócitos humanos. Os métodos biofísicos, como o DSC, ATR FT-IR, PAS, FT-Raman e a microscopia eletrônica de transmissão, reduzem o tempo e o material utilizados nas análises, apresentando limites de detecção mais baixos e possibilitando a automação, além de ajudarem a desvendar como as estruturas altamente especializadas do estrato córneo agem na penetração cutânea. Entretanto, os novos métodos devem ser avaliados em relação aos tradicionais antes de serem implantados, e uma comparação entre os vários métodos é útil para verificar os níveis de confiança dos resultados obtidos. A papaína demonstrou ser inócua e segura já que permitiu a recuperação dos queratinócitos humanos em todos os estágios de cultura celular testados e em todos os intervalos de tempo avaliados, levando a formação de epitélios ao final de 21 dias. A eficácia da papaína como promotor de absorção cutâneo foi comprovada através dos métodos biofísicos onde foi observada a desestruturação dos componentes do estrato córneo, o que permite a passagem de substâncias ativas através da pele. Com base nos resultados obtidos, concluímos que a papaína pode ser utilizada como um promotor de absorção cutâneo seguro e eficaz.

## ABSTRACT

We have investigated the effectiveness and safety of papain as cutaneous penetration enhancer, using biophysical methods, electronic microscopy and cellular culture of human keratinocytes. As biological material, were used human stratum corneum obtained from plastic surgery of abdominal and breast reduction, and an epithelium formed *in vitro*, from cellular culture of human keratinocytes. Biophysical methods, like DSC, ATR FT-IR, PAS, FT-Raman and the transmission electronic microscopy, reduce time and material used in the analyses, presenting lower detection limits and making possible the automation. They help to understand how the highly specialized structures of stratum corneum performed in cutaneous penetration. Nevertheless, the new methods should be validated before they could be implanted, and a comparison among the several methods is useful to verify the trusted levels of the results. Papain demonstrated to be innocuous and safe since it allowed the recovery of the human keratinocytes in all cellular culture stages tested, and in all intervals of time appraised, forming an epithelium at the end of 21 days. The effectiveness of papain as cutaneous absorption enhancer was proven through the biophysical methods where the disruption of the components of the horny stratum was observed, what allows the passage of active substances through the skin. Our results suggest that papain can be used as a cutaneous absorption enhancer safe and effective.

# **1 INTRODUÇÃO**

A rota transdérmica é vista hoje, assim como a via oral, como uma das áreas que mais possui pesquisas inovativas e bem sucedidas. Nos Estados Unidos da América, existem mais de 129 produtos candidatos à administração de fármacos sob investigação clínica. Destes, 51 são sistemas transdérmicos ou dérmicos. Em desenvolvimento pré-clínico, 30% dos 77 candidatos, representam esta forma de administração de fármacos. O mercado de adesivos transdérmicos chega a mais de dois bilhões de dólares, embora esteja baseado principalmente em 10 fármacos, como a escopolamina, nitroglicerina, clonidina, estradiol, testosterona, fentanil e nicotina (BARRY, 2001).

O papel do estrato córneo como principal barreira à penetração da maioria das substâncias na pele está bem estabelecido. A estrutura deste, anteriormente descrita na literatura como simples, é complexa e organizada, com certos tipos celulares que formam uma barreira altamente especializada. A microscopia eletrônica e as metodologias biofísicas ajudam a desvendar como estas estruturas agem, seja interferindo na permeação de substâncias através da pele ou sofrendo ação destas mesmas substâncias.

A penetração de uma substância através da pele pode ocorrer basicamente de duas formas: intercelular ou transcelular, sendo a rota intercelular utilizada pelas substâncias não-polares e a rota transcelular, pelas substâncias polares (MOGHIMI *et al.*, 1996a).

GOODMAN & BARRY em 1989 sugeriram que os promotores de absorção podem modificar a estrutura dos lipídeos ou interagir com as proteínas do estrato córneo, ou simultaneamente exercer ambas as funções, resultando no aumento da permeação do fármaco ou substância ativa através da pele (teoria LPP). A papaína, como promotor de absorção aumenta a permeação do diclofenaco de sódio na pele humana *in vitro*, agindo principalmente nas proteínas do estrato córneo, devido as suas características físico-químicas (LOPES, 1999).

Os métodos biofísicos reduzem o tempo, o trabalho e o material utilizados nas análises, apresentando limites de detecção mais baixos e

possibilitando a automação. Os novos métodos devem ser avaliados em relação aos tradicionais antes de serem implantados, e uma comparação entre os vários métodos é útil para verificar os níveis de confiança dos resultados obtidos.

Muitos métodos analíticos como a Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC (ZELLMER *et al.*, 1995; CORNWELL *et al.*, 1996; MOGHIMI *et al.*, 1996a,b; AL-SAIDAN, BARRY e WILLIAMS, 1998; LEE & TOJO, 1998); Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada – ATR FT-IR (TOUITOU, MEIDAN e HORWITZ, 1998) e Espectroscopia Raman com transformada de Fourier (WILLIAMS & BARRY, 1994; ARMSTRONG *et al.*, 1996; WEGENER *et al.*, 1996; LAWSON *et al.*, 1998) têm sido utilizados para investigar o comportamento dos lipídeos e das proteínas do estrato córneo e comprovar como os promotores de absorção agem sobre estas estruturas.

Recentemente também vem sendo utilizada a espectroscopia fotoacústica no infravermelho com transformada de Fourier (SCHENDZIELORZ *et al.*, 1999), que apresenta como vantagem a necessidade de amostras reduzidas, além de não requerer uma prévia preparação das mesmas.

As células do estrato córneo estão firmemente unidas, através de moléculas desmossômicas e forças coesivas provenientes de proteínas endógenas, lipídeos e lectinas. A Microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para ajudar a indicar os possíveis mecanismos de ação da papaína no estrato córneo, já que esta técnica enfoca as ultraestruturas.

A papaína, uma enzima proteolítica extraída do mamão papaia, é utilizada na terapêutica como debridante de feridas necrosadas, facilitando a cicatrização de lesões e removendo secreções, e também como agente de esfoliação (VELASCO, 1993; STARLEY, 1999).

Com o intuito de verificar a eficácia e segurança da papaína como promotor de penetração cutâneo foram utilizados métodos biofísicos e a

microscopia eletrônica. Foi empregado como material biológico o estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen e mama, além de epitélios formados *in vitro*, a partir de cultura celular de queratinócitos humanos.

## **2 OBJETIVOS**



- Avaliar a segurança da papaína no seu uso como promotor de absorção utilizando cultura celular de queratinócitos humanos e estrato córneo humano;
- Avaliar a eficácia da papaína como promotor de absorção cutâneo, no estrato córneo humano, por meios de métodos biofísicos, como a Calorimetria Exploratória Diferencial, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e acessório de Refletância Total Atenuada e Espectroscopia Fotoacústica, Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier e Microscopia Eletrônica de Transmissão.

## **3 REVISÃO DE LITERATURA**

A pele, como uma roupagem contínua e flexível, envolve-nos por completo. É o mais antigo e sensível dos órgãos, o primeiro meio de comunicação, um eficiente protetor que recobre todo o corpo (MONTAGU, 1988).

Tanto a pele como o sistema nervoso, originam-se da mais externa das três camadas de células embrionárias, a ectoderme, que constitui uma superfície geral que envolve todo o corpo embrionário. A ectoderme também se diferencia em cabelo, dentes e nos órgãos dos sentidos, o olfato, paladar, audição, visão e tato, ou seja, tudo o que acontece fora do organismo. O sistema nervoso central cuja função principal é manter o organismo informado do que acontece externamente, desenvolve-se como a porção da superfície geral do corpo que se vira para dentro. O restante do revestimento de superfície, após a diferenciação do cérebro, medula espinal e de todas as demais partes do sistema nervoso central, transforma-se em pele e seus anexos: pêlos, unhas e dentes (MONTAGU, 1988).

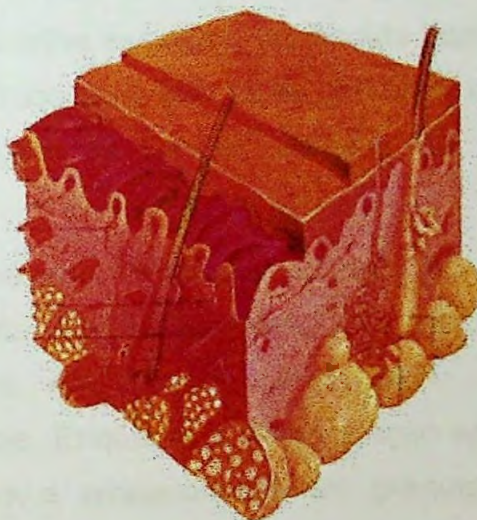
A pele, o maior dos órgãos do corpo humano, interage com as mucosas do trato respiratório, digestivo e urogenital, formando uma cápsula que separa a parte interna do corpo do ambiente externo. Esta estrutura auto-regenerativa defende os fluídos internos e os tecidos vivos contra as variações de temperatura, umidade, radiação e poluição (BARRY, 1983; SHAH & MAIBACH, 1993).

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 propicia as sensações do tato, dor, calor e frio, demonstra o rubor 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 (BARRY, 1983; SHAH & MAIBACH, 1993). Este órgão ainda sintetiza e metaboliza substâncias, tendo como uma das suas funções secretar compostos orgânicos.

Na qualidade de órgão do sentido mais antigo e extenso do corpo, a pele permite que o organismo aprenda o que é seu ambiente (MONTAGU, 1988).

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 e poluentes.

Atualmente, com a preocupação com a segurança de produtos cosméticos e farmacêuticos de uso tópico, existe a necessidade de conhecer a ação não só das substâncias ativas, mas também dos demais componentes da formulação, como é o caso dos promotores de absorção. Para estudar a penetração de qualquer substância através da pele é imprescindível conhecer sua anatomia, fisiologia e composição química.



**Figura 1.** Desenho pele humana, mostrando as diversas camadas que a compõe (Cosméticos & Perfumes, n.7, p.32-41, 2000)

### **3.1 Epiderme**

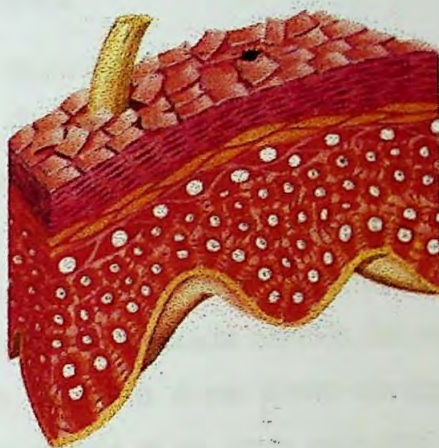
A epiderme humana é constituída por 4 a 5 camadas de células, dependendo da localização no corpo. A primeira camada, ou estrato basal, é formada por uma única fileira de células, de formato cubóide ou colunar, que estão ancoradas às células adjacentes por desmossomos e, a irregular membrana basal, por hemidesmossomos. A população de células basais é

heterogênea já que existem dois tipos de células morfologicamente distintas. A primeira funciona como células mães e tem a capacidade de se dividir e produzir novas células, enquanto o segundo tipo serve para ancorar a epiderme à membrana basal (LAVKER & SUN, 1982; 1983). A segunda camada é o estrato espinhoso, que é constituído por diversas camadas de células irregulares e poliédricas. Estas células estão conectadas às células do estrato basal e as células do estrato espinhoso adjacente através de desmossomos. As estruturas mais proeminentes nesta camada são os tonofilamentos, que juntamente com os desmossomos podem conectar as células, umas às outras. É nas camadas superiores do estrato espinhoso que os grânulos lamelares começam a aparecer. A terceira camada é o estrato granuloso, que é constituído por várias camadas de células achatadas paralelas à junção dermo-epidermal. De formato irregular, grânulos de querato-hialina eletrodensa, sem ligações membranosas, estão presentes e contêm a proteína estrutural conhecida como profilagrina, uma precursora da filagrina. Sugere-se que estes grânulos estão envolvidos na queratinização e formação da função barreira da pele (MONTEIRO-RIVIERE, 1996).

Os grânulos lamelares, "Odland bodies" ou corpos lamelados, contendo amontoados de discos lamelares são encontrados no estrato granuloso e aumentam em número e tamanho conforme vão se aproximando da superfície. Enquanto a diferenciação epidérmica ocorre, os lipídeos são sintetizados e empacotados em grânulos lamelares. Estes grânulos se fundem com a membrana celular para liberar o conteúdo lipídico por exocitose no espaço intercelular entre o estrato granuloso e o estrato córneo (YARDLEY & SUMMERLY, 1981). Os grânulos então, sofrem uma modificação bioquímica e física para formarem as folhas de lipídeos que constituem a barreira permeável. Extrações de lipídeos da pele demonstraram que a composição lipídica da epiderme é modificada drasticamente quando os queratinócitos se diferenciam. A composição epidérmica lipídica pode ser constituída por fosfolipídios, glicosilceramidas, ceramidas, colesterol, ácidos graxos livres, triacilgliceróis e esfingosina.



Em regiões mais grossas da pele, sem pêlos, como as palmas das mãos e planta dos pés está presente também o estrato lúcido. Esta é uma linha fina, translúcida e homogênea, entre o estrato granuloso e o estrato córneo. É constituída por células densas e totalmente queratinizadas, as quais não apresentam núcleo e organelas citoplasmáticos. Esta área translúcida contém substâncias semifluidas conhecidas como “eleiden”, que são similares a queratina, porém apresentam um padrão manchado, assim como diferentes fosfolipídios ligados a proteínas.



**Figura 2.** Desenho da epiderme humana, mostrando camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, lúcida e estrato córneo, assim como ducto sudoríparo e pêlo (Cosméticos & Perfumes, n.7, p.32-41, 2000).

A camada mais externa é o estrato córneo, que é constituído por várias camadas de células mortas completamente queratinizadas, as quais não apresentam núcleo e organelas citoplasmáticos, e estão constantemente sendo desprendidas. A camada mais superficial do estrato córneo é, algumas vezes, chamada de estrato disjunctum. A espessura do estrato córneo e/ou o número de camadas de células variam dependendo do sítio e da espécie.

Conforme as células vão migrando externamente da camada basal, elas sofrem a queratinização, que é o processo pelo qual as células epidérmicas se diferenciam. Assim que as células basais sofrem mitose, elas migram para cima, aumentando de tamanho e produzindo um grande número de produtos de diferenciação como tonofilamentos, grânulos de

querato-hialina e corpos lamelares. Posteriormente seu núcleo e organelas se desintegram, os filamentos de querato-hialina se arranjam em pacotes e os grânulos lamelares descarregam seus conteúdos nos espaços intercelulares. O ponto final da queratinização é uma célula não viável, rica em proteína, diferenciada terminalmente, com um plasmalema grosso e contendo queratina e querato-hialina fibrosa, envolta por uma matriz extracelular lipídica. Este forma o chamado modelo “parede com tijolos” (ELIAS, 1983), que é a base morfológica para o modelo heterogêneo de estrato córneo bi-compartimental.

A membrana basal é sintetizada por células basais e separa o epitélio do tecido conectivo abaixo. É uma matriz extracelular fina formada por uma estrutura altamente organizada de macromoléculas. Através de análises por microscopia eletrônica de transmissão, a membrana basal cutânea é composta por quatro elementos principais: 1) uma membrana de células epiteliais basais; 2) uma área eletro-lúcida abaixo da membrana plasmática chamada de lamina lúcida; 3) uma área eletro-densa, abaixo da lamina lúcida chamada de lamina densa e 4) uma camada sub-basal contendo fibrinas de ancoragem, elementos parecidos com microfibrinas e fibras de colágeno únicas. Além desta ultraestrutura, novos componentes da junção dermo-epidermal estão sempre sendo descobertos, como as lamininas e fibronectinas.

Muitas funções são atribuídas a membrana basal, incluindo um papel na manutenção da adesão derme-epiderme e a ação de restringir ou permitir a passagem de certas substâncias (MONTEIRO-RIVIERI, 1996).

### **3.1.1 Lipídeos**

A palavra lipídeo diz muito pouco sobre a estrutura ou função da família de moléculas que a define, porém sugere qual solvente deve ser utilizado para dissolver as moléculas. Como os carboidratos, os lipídeos são classificados baseando-se na sua estrutura química, propriedades e funções. As duas maiores classes de lipídeos são:

- a) Ésteres simples: formados através de condensação dos ácidos carboxílicos e álcoois, o que inclui as ceras, gorduras animais, óleos de plantas e peixes. Estes são quase que exclusivamente compostos de carbono, hidrogênio e uma percentagem relativamente pequena de oxigênio. A maior influência nas propriedades destes lipídeos vem do número de átomos de carbono e da estrutura de hidrocarbonetos, por exemplo, se eles são saturados ou insaturados, ramificados ou não, com cadeia curta ou longa.
- b) Os ésteres e amidas mais complexas incluem outros elementos como nitrogênio, fósforo e enxofre, assim como outras classes de moléculas como os aminoácidos, carboidratos ou esteróis como parte das moléculas. Muitas das moléculas, nesta segunda classe, intumescem em contato com água e sua principal função é formar camadas interfaciais ou membranas entre um ambiente e outro (CRITCHLEY, 1993).

A principal função da primeira classe de lipídeos é agir como alimento ou fonte de energia, embora algumas ceras protetoras são encontradas no reino vegetal e estão nesta categoria. A segunda classe de lipídeos desempenha muitas funções, sendo a principal a de formar barreiras seletivas entre fases. A permeabilidade da barreira à difusão passiva pode ser regulada pela composição específica de misturas complexas de lipídeos que forma a barreira ou membrana (CRITCHLEY, 1993).

O ácido esteárico é uma cera sólida, porém suas propriedades mudam ligeiramente formando um líquido a temperatura do corpo. Quando pares de átomos de hidrogênio são removidos da cauda de hidrocarbonetos produzem ácido oléico (dezoito carbonos com uma insaturação entre os carbonos 9 e 10). A remoção de mais pares de átomos de hidrogênio produz o ácido linoleico com duas insaturações (C9 e C12) e ácido lineoleico com três insaturações (C9, C12 e C15) que são líquidos a temperatura ambiente (CRITCHLEY, 1993).



A razão para estas drásticas mudanças nas propriedades físicas com pequenas alterações no peso molecular é devido ao fato de que as caudas dos hidrocarbonetos no ácido esteárico totalmente saturado estão colocadas juntas, enquanto a presença de duplas ligações interrompe este empacotamento. Moléculas “empacotadas” apresentam um nível de cristalização formando ceras sólidas ou cristais líquidos, enquanto cadeias que apresentam interrupções em sua seqüência, como, por exemplo, duplas ligações ou ramificações (ácido isoesteárico), não podem ser “empacotadas” tão conjuntamente (CRITCHLEY, 1993).

A presença de duas cadeias longas ligadas a um grupo polar significativo, por exemplo, fosfolípido, permite a molécula formar camadas mais estáveis, particularmente na presença de outras moléculas como o colesterol, um componente de muitas membranas biológicas. Na presença de um excesso de água este assume a típica estrutura de bicamada, na qual os grupos polares estão associados com a água e as caudas escondidas pela bicamada. Quando em ambiente com pouca água o reverso também acontece: os grupos polares se arranjam de forma a proteger a água dos hidrocarbonetos presentes no meio-ambiente (CRITCHLEY, 1993).

A mistura complexa de lipídeos que são encontrados nas membranas de diferentes organismos vivos pode ser compreendida através das funções destas membranas em relação à temperatura e concentração osmótica do ambiente. As espécies que crescem na Antártica apresentam número mais elevado de lipídeos insaturados e ramificados que aqueles encontrados perto do Equador. A presença de altas concentrações salinas tem dois efeitos principais: interação com a água, particularmente de moléculas com grupos carboxílicos; e proteção das forças de repulsão entre as cabeças polares de moléculas mais carregadas como os fosfolípidios, permitindo-os permanecerem mais juntos (CRITCHLEY, 1993).

O conceito de que mudanças estruturais produzem mudanças no empacotamento dos lipídeos é essencial para a compreensão do porquê a pele muda de fosfolípidios para cerebrosídeos e então para ceramidas

quando analisamos a composição lipídica de dentro do organismo para a interface com o meio ambiente (CRITCHLEY, 1993).

O processo de diferenciação na epiderme dos mamíferos gera uma membrana externa relativamente impermeável. O estrato córneo é constituído por células embebidas em um interstício neutro, rico em lipídeos (LAMPE, 1983).

Os lipídeos do estrato córneo dos mamíferos são conhecidos por exercerem um importante papel regulador na permeabilidade da pele. Já que existem estas variações regionais de permeabilidade, pesquisadores começaram a inquirir quanto ao conteúdo lipídico, sua distribuição e composição de ácidos graxos, tentando desta forma, justificar as diferenças ocorridas (LAMPE, 1983).

SMITH *et al.* (1982), verificaram através de cultura celular que os lipídeos estão intimamente envolvidos na adesão e na formação da propriedade barreira do estrato córneo, fato também comprovado por WERTZ & DOWNING (1982).

A derme apresenta poucas células comparando com a epiderme e os principais lipídeos estão concentrados em glândulas específicas, que são extensões da epiderme viável, e no tecido adiposo. As camadas gordurosas são compostas principalmente por triglicérides que representam a energia potencial estocada sob situações de jejum e fornece isolamento contra o frio para manter a temperatura corpórea e conseqüentemente mantendo a temperatura ótima de funcionamento enzimático.

A composição dos ácidos graxos, relatada na tabela 1, é reflexo da dieta alimentar, e das condições ambientais. A composição lipídica na maioria dos organismos, incluindo os mamíferos, varia conforme a temperatura do ambiente na qual os lipídeos foram armazenados. O tecido adiposo pode funcionar como reservatório de materiais, como por exemplo, os esteróides administrados topicamente (CRITCHLEY, 1993).

**Tabela 1.** Tipos de lipídeos encontrados nas diferentes camadas da pele e suas principais funções (CRITCHLEY, 1993).

<b>CAMADAS DA PELE</b>	<b>TIPOS DE LIPÍDEOS</b>	<b>FUNÇÕES</b>
Tecido Adiposo	Triglicérides	Estoque de nutrientes e isolamento térmico
Camada basal	Fosfolipídios, colesterol, pequena quantidade de triglicérides.	Permeabilidade seletiva de membranas
Camada espinhosa	Lipídeos de membrana mais corpúsculos lamelares com cerebrosídeos, colesterol, ácidos graxos e triglicérides.	Síntese e organização dos lipídeos lamelares entre as células.
Epiderme viável	Cerebrosídeos e ceramidas, colesterol, ácidos graxos, esteróis e ésteres de ceras.	Modificação enzimática final de impermeabilidade da barreira.
Estrato córneo	Lipídeos lamelares (sem cerebrosídeos).	Barreira
Em partes específicas do corpo	Lipídeos sebosos (triglicérides, esqualeno); esteróides apócrinos.	Reconhecimento pelo odor.
	Lipídios externos, cosméticos, poluentes.	Nenhuma função, porém se dissolvem no sebo e nos lipídeos da pele.

Os lipídeos que estão nas membranas dos queratinócitos e outras células da epiderme são típicos fosfolipídios e colesterol de membranas. Alguns triglicérides estão presentes como gotas de óleo entre as células representando uma fonte de energia potencial para alimentar a diferenciação celular pelo qual os queratinócitos passam assim que deixam a membrana basal (CRITCHLEY, 1993).

Materiais lipossolúveis que entram em contato com a pele irão se difundir na membrana e, em concentrações não fisiológicas, podem causar alguns distúrbios na função normal da membrana celular. No entanto, a capacidade do tecido epidérmico de manter suas funções de crescimento e diferenciação, mostra que a pele saudável pode suportar e superar a maioria

das agressões rapidamente. As muitas glândulas na pele podem ser vistas como extensões do epitélio, já que estão praticamente cercadas por uma camada contínua de células epiteliais. As três glândulas principais são:

- Glândulas écrinas, que agem como termoreguladores, secretando principalmente água e sais;
- Glândulas sebáceas que produzem lipídeos;
- Glândulas apócrinas que produzem proteínas e uma variedade de esteróides.

As duas últimas estão associadas com o folículo piloso e a distribuição de todas é diferenciada conforme o sítio do corpo (CRITCHLEY, 1993).

As **glândulas apócrinas** produzem secreções holócrinas, isto é, as células da glândula continuam a dividir, crescer e acumular a secreção até estourarem, liberando seu conteúdo no lúmen da glândula que esta conectada com o folículo piloso. Estas glândulas estão restritas a áreas específicas do corpo como axilas, região areolar dos seios femininos e região púbica. Um volume muito pequeno de secreção amarelo-pálida e viscosa é produzido, particularmente após estimulação para produção de hormônios adenóides (CRITCHLEY, 1993).

A composição de secreção apócrina não está completamente caracterizada, porém a viscosidade é devida ao alto conteúdo protéico. Existem poucos ácidos nucleicos, assim o metabolismo seletivo deve ocorrer para reciclar os nucleotídeos disponíveis antes da ruptura da célula. Muito do mistério das glândulas e suas secreções, se volta para sua localização anatômica e imensa variedade de misturas esteroidais presente nas suas secreções. Muitos dos esteróides são moléculas voláteis com odor almiscarado ou apimentado que é característico de odores axilares. A secreção apócrina coletada da axila humana e esterilizada, não apresenta nenhum odor, já que os esteróides voláteis estão presentes na forma de sulfatos que devem ser hidrolisados por enzimas produzidas por bactérias na superfície da pele para que ocorra a liberação de esteróides livres.

Outras moléculas, particularmente ácidos graxos de cadeia curta, contribuem na formação de todos os odores do corpo e em muitos animais, é a mistura particular destes ácidos graxos que fornecem a demarcação do território e sinais de reconhecimento. Existem algumas evidências de que bebês reconhecem suas mães pelo cheiro do mamilo, sugerindo que as glândulas apócrinas produzem ferormônios (CRITCHLEY, 1993).

As **glândulas sebáceas** humanas estão concentradas principalmente na face, couro cabeludo e parte superior do dorso, estando ausentes nas palmas das mãos e planta dos pés. Elas também produzem uma secreção holócrina composta predominantemente por lipídeos neutros. Proteínas, DNA e fosfolipídios são reciclados, juntamente com a glândula. A composição do sebo é diferente entre grupos de mamíferos, mas é muito similar em espécies próximas (CRITCHLEY, 1993).

O tamanho da glândula e sua atividade estão sob o controle de hormônios androgênicos, e em pele de humanos pré-púberes as glândulas são muito pequenas e a maioria dos sebócitos contém relativamente pouco lipídeo. Em glândulas maduras, as células aumentam de volume até 150 vezes. Em crianças pequenas a composição do sebo é diferente, contendo uma proporção maior de colesterol e ésteres de colesterol comparado com as ceras esterificadas. Quando as glândulas são estimuladas por andrógenos, particularmente a dehidrotesterona, e maturam, a composição muda para 40-57% triglicérides, 25% ceras esterificadas, acima de 16% de ácidos graxos livres, 12% esqualeno e apenas 4-5% de esteróis livres, mais esteróis esterificados. Os ácidos graxos livres não são expelidos pela glândula e sim produzidos pela ação das lipases bacterianas no canal piloso. A ação bacteriana está bem documentada e os ácidos graxos livres penetram e irritam o folículo piloseboso causando a acne (CRITCHLEY, 1993).

Enquanto os caminhos biossintéticos que formam o bloqueio lipídico são relativamente padronizados, o perfil específico dos lipídeos do sebo é ligeiramente diferente daqueles dos lipídeos circulantes, carreadores de albumina, ou dos lipídeos da membrana celular dos sebócitos na glândula.

Assim, podemos concluir, que a maioria das estruturas são sintetizadas localmente (CRITCHLEY, 1993).

A variação da taxa de produção de sebo devido a mudanças climáticas pode ser explicada por variações sazonais hormonais. No couro cabeludo esta taxa é de 100µg de sebo por centímetro quadrado por hora. O fluxo de sebo é influenciado pela temperatura e produção de perspiração (CRITCHLEY, 1993).

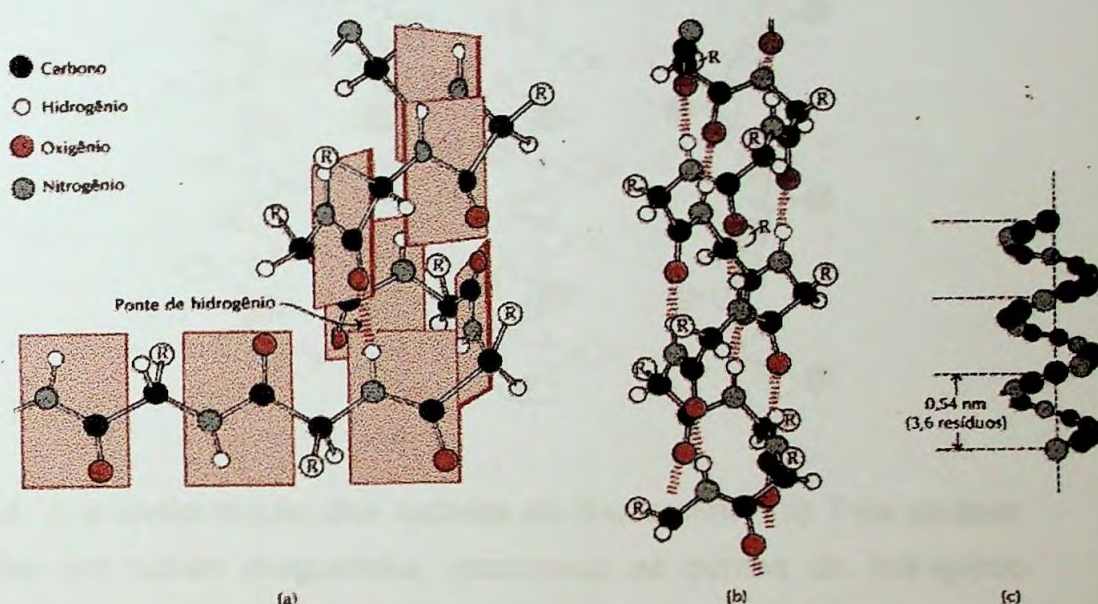
### 3.1.2 Proteínas

A pesquisa nos últimos 20 anos aumentou de forma significativa o conhecimento sobre a estrutura das proteínas que formam a pele humana e seus apêndices, como o cabelo e as unhas. Os pesquisadores procuraram saber além das propriedades físicas da pele como era a estrutura das proteínas que a formava (BOWDEN, 1993).

O arranjo mais simples que uma cadeia polipeptídica pode assumir, com suas ligações peptídicas rígidas (mas com as outras ligações simples girando livremente), é a estrutura em hélice, a qual é denominada de  $\alpha$ -hélice (**figura 3**). Nesta estrutura o esqueleto polipeptídico está enrolado ao redor do eixo maior da molécula, enquanto os grupos R dos resíduos de aminoácidos projetam-se para fora da hélice formada pelo esqueleto covalente. Esta é uma conformação estável, preferida pela cadeia polipeptídica da  $\alpha$ -queratina. Permite a formação de pontes de hidrogênio entre cada átomo de hidrogênio ligado ao átomo eletronegativo de nitrogênio da ligação peptídica e o átomo de oxigênio eletronegativo da carbonila do quarto aminoácido da sequência em que aparecem na hélice. Todas as ligações peptídicas da cadeia participam destas pontes de hidrogênio, assim cada passo sucessivo da  $\alpha$ -hélice é unido ao passo adjacente por várias pontes de hidrogênio intracadeia, dando estabilidade a toda estrutura (LEHNINGER, 1988).



As  $\alpha$ -hélices são ricas em aminoácidos que permitem tal conformação, isto é, que não apresentam grupos volumosos ou grupos R adjacentes carregados positivamente. As  $\alpha$ -queratínas são conhecidas também pela sua insolubilidade em água a pH 7,0 e a temperatura corporal. Isto acontece em parte devido ao tipo de aminoácidos que predominam na cadeia, que contem geralmente grupos R hidrofóbicos, ou insolúveis em água (LEHNINGER, 1988).

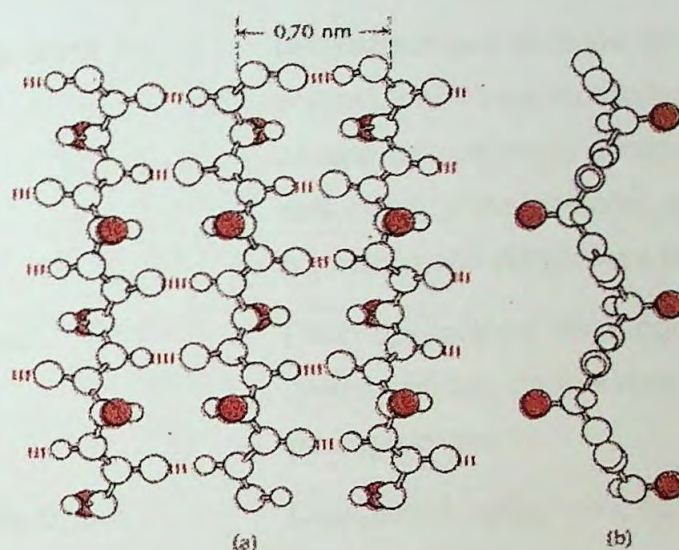


**Figura 3.** Três modelos de  $\alpha$ -hélice, mostrando diferentes aspectos de sua estrutura. (a) Formação de  $\alpha$ -hélice com orientação à direita. (b) Modelo mostrando as pontes de hidrogênio intracadeia. (c) Unidade repetitiva é um único passo da hélice (LEHNINGER, 1988).

Já as  $\beta$ -queratínas (**figura 4**), também proteínas filamentosas e insolúveis, são flexíveis e facilmente dobráveis, ao contrário das  $\alpha$ -queratina, porém não se distendem. Na  $\beta$ -conformação o esqueleto da cadeia polipeptídica dispõe-se em ziguezague e não em forma helicoidal, formando uma estrutura semelhante a uma série de pregas, chamada de folha pregueada. Na conformação  $\beta$  não há pontes de hidrogênio intracadeias e



sim intercadeias ligando cadeias polipeptídicas adjacentes. Todas as ligações peptídicas da  $\beta$ -queratina participam das pontes de hidrogênio, e os grupos R dos aminoácidos projetam-se para fora da estrutura em ziguezague. Não existem ligações de cistina entre as cadeias e essas cadeias de polipeptídeos estão orientadas de forma antiparalela (LEHNINGER, 1988).



**Figura 4.** A  $\beta$ -conformação das cadeias da  $\beta$ -queratina. (a) Três cadeias arranjadas em folhas pregueadas, mostrando as pontes de hidrogênio interligando cadeias adjacentes. (b) Vista lateral mostrando os grupos R projetando-se para fora da folha pregueada (LEHNINGER, 1988).

A origem do nome queratina da superfície da pele é derivado do nome grego *Kéras* (*chifre*), devido a sua semelhança com chifres e outras estruturas epiteliais duras, como cascos, unhas, garras, pêlos e penas de animais. Assim, queratina é um termo geralmente utilizado, para designar todos estes tipos de estruturas. Todos estes tecidos macios ou duros, de fato apresentam semelhanças estruturais em termos protéicos, diferindo apenas em propriedades químicas e desta forma produzindo materiais de diferentes naturezas (BOWDEN, 1993).



**Tabela 2. Proteínas estruturais da pele e cabelo (BOWDEN, 1993).**

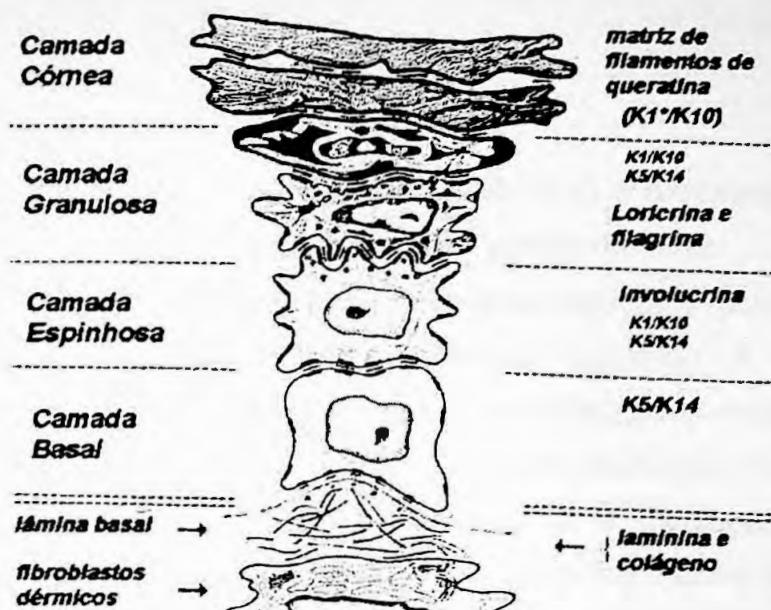
Epiderme	Actina, $\alpha$ -actina, adducina, filagrina, integrinas, involucrina, queratina (específicas da pele), loricinas, espectrina
Folículo piloso	Queratinas (específicas da pele), trico-hialina
Haste pilosa/ base da unha	Queratinas (específicas de cabelos e unhas), proteínas matriciais altamente sulfúricas e extremamente sulfúricas, proteínas com alta concentração de glicinas-tirosinas.
Junções intercelulares	Desmoplaquinas, desmogleinas, desmocollinas, cadherinas, placoglobinas.
Zona da base da membrana	Colágenos, epiligrinas, fibronectinas, integrinas, laminina, niceinas, nidogenio (entactina), trombospondina
Derme (fibroblastos)	Colágenos, elastina, fibrilina, integrinas, plectinas, vimentina.

A correta regulação da expressão gênica da queratina e a formação de uma rede funcional são essenciais para a diferenciação epidérmica normal. A epiderme dos mamíferos é um epitélio escamoso estratificado, que sofre uma série de complexas mudanças morfológicas e bioquímicas durante o processo de queratinização. Isto culmina com a formação do estrato córneo, que promove uma durável e efetiva barreira de células mortas empacotadas firmemente, os queratinócitos modificados, chamados de corneócitos. Em torno de 25-30% das proteínas encontradas na epiderme

dos mamíferos é de filamentos intermediários de queratina, porém outros três tipos de proteínas estruturais também são encontrados: filagrinas ou proteínas ricas em histidina, presente nos grânulos querato-hialinos; loricrina ou proteínas ricas em cisteína, também presentes nos grânulos querato-hialinos e involucrina, um envelope protéico encontrado nos primatas (BOWDEN, 1993).

Além das proteínas que formam a matriz amorfa filamentosa das células epidermais, os queratinócitos são mantidos juntos por um complexo desmossômico. As proteínas dos desmossomos foram caracterizadas bioquimicamente, como a desmoplaquina I, 250 kDa; desmoplaquina II, 220 kDa; desmoplaquina III ou placoglobina, 83 kDa; desmoplaquina IV, 70 kDa; desmocalmína, 240 kDa, além de outras glicoproteínas envolvidas na “colagem” das porções transmembranas dos espaços extracelulares, desmogleínas e desmocolinas. Muitos destes componentes são os mesmos tanto nos desmossomos quanto nos hemidesmossomos, porém os últimos apresentam alguns componentes estruturais únicos (BOWDEN, 1993).

Quatro queratinas constitutivas são expressas pela epiderme humana (K1, K5, K10, K14), duas são expressas em estados hiperproliferativos (K6, K16) e outras duas são encontradas em maior quantidade somente nas regiões plantar/palmar (K9 e uma queratina de 59 kDa que migra entre K6 e K5 no gel). Quantidades menores de K13, K15 e K19 também foram descritas na pele humana (BOWDEN, 1993).



**Figura 5.** Diagrama esquemático da diferenciação epidérmica mostrando as mudanças na morfologia dos queratinócitos durante o processo de diferenciação, relacionado com as alterações conhecidas na expressão gênica das proteínas estruturais envolvidas (BOWDEN, 1993).

As células basais do compartimento epidérmico proliferativo têm um sistema filamentoso não muito grande e composto majoritariamente por K5 e K14. Assim que as células começam a diferenciação terminal, elas expressam duas outras queratinas: K1 e K10. Evidências sugerem que a expressão de K1 precede a de K10, e que uma vez que a célula expresse estas queratinas suprabasais, elas devem deixar a camada basal (**Figura 5**). Dados bioquímicos, imunológicos e hibridização *in situ* mostraram que K5 e K14 são progressivamente sub-reguladas e que o sistema filamentoso nas células das camadas superiores suprabasais não somente aumenta de densidade, mas também mudam sua composição, enquanto mais K1-K10 aparece. Quando as células alcançam a camada granulosa superior, o sistema filamentoso é composto quase em sua totalidade por K1 e K10. Estes filamentos são então proteoliticamente modificados, tornando-se menores e mais ácidos conforme as organelas vão sendo removidos e os corneócitos mortos vão sendo formados (BOWDEN, 1993).

A proteína de envelope involucrina (95 kDa) é expressa nas células espinhosas superiores sendo ligadas posteriormente a membrana plasmática pelas transglutaminases epidérmicas (ligação  $\gamma$ -glutamil- $\epsilon$ -lisina), na diferenciação terminal (camada granulosa superior). A matriz e as proteínas de ancoragem do envelope são sintetizadas mais tarde nos grânulos de querato-hialina que nomeia a camada granulosa. A profilagrina é expressa nos grandes grânulos vacuolados e é modificada tanto por fosforilação, desfosforilação e proteólise. As filagrinas individuais variam de tamanho (30-50 kDa) em diferentes espécies e são liberadas na camada granulosa superior, onde interagem com os filamentos de queratina. Esta interação, extremamente específica, é necessária para organizar e empacotar os filamentos em superestruturas, regularmente densas, requeridas nos corneócitos da camada córnea. Uma vez os filamentos neste estado de firme empacotamento, as filagrinas são digeridas pelas proteases a resíduos únicos de aminoácidos que ajudam a manter as características de ligação de água da camada córnea (BOWDEN, 1993).

A loricrina é uma proteína rica em resíduos de glicina, serina e cisteína. É sintetizada na camada granulosa e associada com os grânulos de querato-hialina pequenos e densos. Clonagem e seqüenciamento demonstraram que a estrutura primária remete a seqüência terminal de N- e C- das queratinas suprabasais (K1 e K10). Previsões sobre a estrutura secundária mostram que estas regiões podem interagir entre si através de pontes dissulfeto. Assim, a loricrina é provavelmente responsável pela ligação dos filamentos entre os corneócitos e da ancoragem dos mesmos no envelope de ligações cruzadas (BOWDEN, 1993).

### **3.1.3 Coesão celular e descamação do estrato córneo na manutenção da barreira da pele**

O principal papel dos lipídeos intercelulares do estrato córneo como principais constituintes da permeabilidade da barreira da pele está bem estabelecido. Já que a superfície da pele é continuamente submetida a agressões, existe também a necessidade de uma barreira mecânica, que não apenas proteja as camadas seguintes, mas também atue como um escudo para os lipídeos intracelulares do estrato córneo. A alta resistência mecânica desta camada advém da sua construção em blocos, os corneócitos. Estes representam estágio final de diferenciação dos queratinócitos e estão altamente adaptados a sua função. Basicamente um corneócito é constituído por um feixe coeso de filamentos de queratina intracelular cercado por uma parede celular extremamente resistente, formada por proteínas covalentemente ligadas, os envelopes de células cornificadas. A transformação de propriedades mecânicas dos corneócitos individuais em um tecido como um todo, é dependente de estruturas coesas intercelulares, que devem ter uma resistência mecânica ótima comparável a resistência dos blocos de células (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

Para compreender a função do estrato córneo normal e seu “turnover” é importante não apenas entender a coesão dos corneócitos, mas também o mecanismo que permite a perda desta coesão no processo de descamação (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

Uma vez que a camada córnea é continuamente produzida em uma velocidade regulada pela proliferação das células da camada basal, deve existir uma contínua perda de células da superfície de forma a manter a sua espessura constante. Este processo deve ser bem regulado, pois se ocorre muito devagar pode ocorrer uma hiperqueratinose, e se ocorrer muito rápido, pode destruir a barreira (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

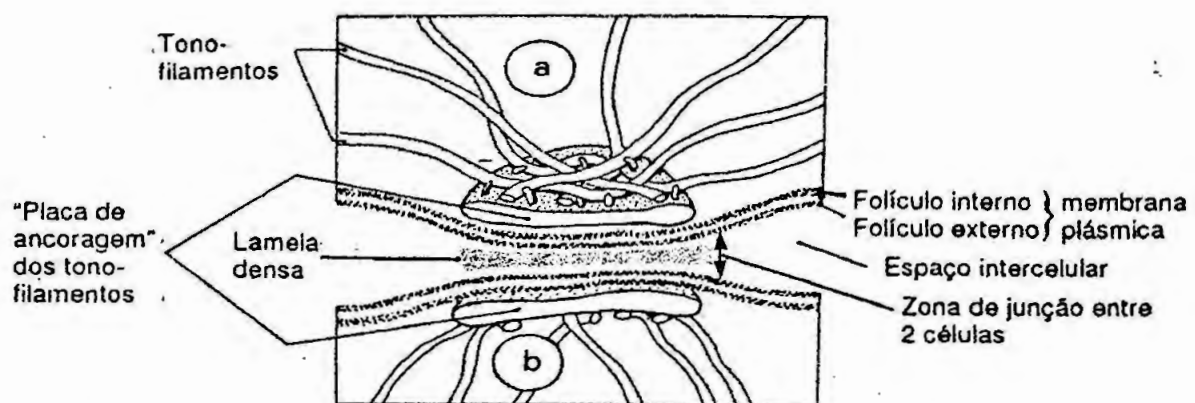
Uma das grandes dúvidas é como este processo pode ser regulado em um tecido morto. Os corneócitos não têm a capacidade de responder a citocinas e outros sinais celulares, portanto eles devem ser programados para este fim no período em que são formadas as células no estrato granuloso. Esta programação deve permitir que a coesão do corneócito seja suficientemente forte para garantir que a célula funcione como uma parede bloqueadora, no estrato córneo, por aproximadamente 2 semanas, ou seja, seu tempo de regeneração. Porém, quando os corneócitos atingirem a superfície da pele (em 26 dias), deve existir uma eliminação total da coesão celular. Já que os corneodesmossomos contribuem para a coesão celular da maior extensão do estrato córneo, a descamação deve envolver a proteólise como um passo crucial. Uma enzima candidata a ser a responsável pela degradação de coesão intracelular das estruturas da camada córnea é a enzima quimiotriptica do estrato córneo (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

### ***Desmossomos***

O papel dos desmossomos como mediadores do contato mecânico entre as células epiteliais viáveis, os queratinócitos, já é conhecido. A aparência espinhosa das camadas intermediárias da epiderme viável (estrato espinhoso), é devido ao grande número de desmossomos presentes. Morfologicamente um desmossomo pode ser descrito como um botão redondo ou oval com diâmetro de 0,2-1  $\mu\text{m}$ . É constituído por duas metades simétricas, cada uma pertencente a células contíguas, e por uma membrana, parte intercelular e parte extracelular. Dentro da célula, logo abaixo da membrana plasmática está a placa desmossomal. A esta estrutura estão ligados filamentos de queratina intracelular (tonofilamentos) assim como glicoproteínas pertencentes à família das caderinas e chamadas de desmogleínas e desmocollinas. Estas glicoproteínas cruzam a membrana plasmática e suas partes glicosiladas ocupam o espaço extracelular onde elas interagem com as partes correspondentes das células contíguas, formando assim uma estrutura coesa entre as células (**Figura 6**). Por meio



da microscopia eletrônica, as placas desmossômicas são visíveis como uma estrutura eletrodensa, com aproximadamente 15 nm entre elas, dentro da membrana plasmática. A parte extracelular dos desmossomos, entre os queratinócitos não corneificados, tem uma aparência moderadamente eletrodensa em um formato plano, com aproximadamente 30 nm entre eles, e tem uma linha central eletrodensa em forma de ziguezague. É importante perceber que os desmossomos e os filamentos de queratina formam unidades funcionais, os complexos desmossomos intermediários filamentosos, e através destes complexos ocorre uma ligação do citoesqueleto das células individuais em uma rede que compreende todo o epitélio (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).



**Figura 6.** O desmossomo. Estrutura em espelho constituindo um ponto de junção entre as duas células, a e b (PEYREFITTE, 1998).

Os desmossomos da epiderme não queratinizada são parcelas integrais do plasma das membranas dos queratinócitos. Desta forma, eles estão envolvidos em muitos processos dinâmicos das células epiteliais viáveis. Conforme os queratinócitos vão migrando em direção a superfície da pele, eles vão sofrendo uma contínua mudança de formato, o que leva a uma constante renovação e degradação dos contatos intercelulares, entre os desmossomos. É óbvio que assim que a célula se encontra envolvida por um envelope resistente protéico, quando atingem o estrato córneo, e quando

não apresentam mais um metabolismo ativo, o “turnover” dos desmossomos pode ocorrer por diferentes mecanismos em relação aqueles da epiderme não queratinizada (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

### ***Corneodesmossomos***

Quando comparados aos desmossomos da epiderme não queratinizada, os corneodesmossomos, isto é, os desmossomos do estrato córneo, têm uma aparência diferente na microscopia eletrônica. Devido aos filamentos de queratina intercelular eletro-denso, densamente empacotados, não é possível identificar a placa intracelular desmossomal. As porções extracelulares planas dos corneodesmossomos têm uma densidade homogênea e altamente elétrica, sem uma linha central visível (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

Outras diferenças entre desmossomos e corneodesmossomos foram reveladas através de análises morfométricas e microscopia imunoelétrica. Analisando o número total de desmossomos, verificaram-se diferenças entre o estrato córneo das palmas das mãos e plantas dos pés e o estrato córneo de outros sítios do corpo. No estrato córneo, que não apresenta camada lúcida, o número de desmossomos em camadas mais profundas é igual àquele presente na camada granulosa, mas somente cerca de 20% deste total estão presentes nas camadas superficiais da pele, considerando-se toda a periferia do corneócito. Embora haja poucos desmossomos na parte central dos corneócitos superficiais, o número de desmossomos por unidade de comprimento da periferia da célula até as bordas sobrepostas dos corneócitos é essencialmente o mesmo das camadas mais internas do tecido. Assim, parece haver uma degradação das partes extracelulares dos desmossomos na área central dos corneócitos conforme as células vão migrando no estrato córneo, enquanto os desmossomos das bordas não parecem ser degradados até as células descamarem. A degradação dos corneodesmossomos parece envolver a separação do material intercelular eletrodenso da parede da célula. No estrato córneo palmo-plantar o número de desmossomos por unidade de comprimento da periferia dos corneócitos é



constante e alta, através do tecido, até as células serem descamadas (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

Estudos com microscopia imunoeletrônica com anticorpos contra as glicoproteínas desmossômicas, desmogleínas I (DG I) detectados com anticorpos secundários marcados com ouro, podem fornecer medidas semiquantitativas de DG I em desmossomos nas diferentes camadas da epiderme. Em epiderme não palmo/plantar, a quantidade de DG I nos desmossomos é mais alta no estrato granuloso, decrescendo moderadamente nas camadas mais profundas, e diminuindo drasticamente nos desmossomos localizados da superfície da pele. Comparado com os desmossomos do estrato córneo não palmo/plantar, os desmossomos da região palmo/plantar contém altas quantidades de DG I imunodetectáveis por todo o tecido. Estudos de fração congelada, também sugeriram um decréscimo nas proteínas desmossomais transmembranas na superfície, quando comparadas com as camadas mais profundas do estrato córneo não palmo/plantar (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

A aparência ultraestrutural dos corneodesmossomos sugere que eles são modificados durante a transição entre a epiderme viável e a queratinizada. Parte desta modificação pode ser devida a incorporação de proteínas, as corneodesmosinas. Esta proteína possui peso molecular de 52 kDa e é exclusivamente expressa no epitélio queratinizado. No estrato granuloso é encontrada intracelularmente em associação com corpos lamelares. Na zona de transição entre o estrato granuloso e o estrato córneo, coincidindo com a mudança da aparência ultraestrutural dos desmossomos, a corneodesmosina é transportada para a parte extracelular dos desmossomos, sendo continuamente degradada a componentes menores no estrato córneo (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

O estudo da influência dos corneodesmossomos na dissociação do estrato córneo é tópico de vários pesquisadores. LUNDSTRÖM & EGELRUD (1990) estudaram a descamação de células do estrato córneo plantar, verificando a existência do envolvimento de dois tipos diferentes de

estruturas protéicas degradadas por uma enzima a SCCE (stratum corneum chymotryptic enzyme), encontrada no estrato córneo.

Esta enzima, responsável pela degradação das estruturas coesivas, foi primeiramente descoberta em regiões de estrato córneo plantar (ELGERUD & LUNDSTRÖM, 1991; LUNDSTRÖM & ELGERUD, 1991). Tem 25 kDa de massa molecular, sendo parcialmente glicosilada e com ponto isoelétrico perto de 10. Embora tenha um pH ótimo de neutro a alcalino, é ativa também em pH 5,5, o pH do estrato córneo. Comparações da seqüência do terminal N dos aminoácidos da forma nativa e da seqüência de aminoácidos deduzidos da seqüência de nucleotídeos do cDNA, sugerem que a SCCE é produzida na forma precursora inativa, com sete pró-peptídeos de aminoácidos longos. A remoção de pró-peptídeos de pró-SCCE recombinante, com tratamento com tripsina, leva a uma enzima proteolítica ativa. A seqüência de aminoácidos deduzida contém regiões conservadas, típicas de proteinases serinas, mas, é apenas cerca de 40% homóloga a outras enzimas conhecidas. A SCCE demonstra similaridade, mas também diferenças significantes com relação à atividade em substratos peptídicos e a sensibilidade a vários inibidores de proteases, quando comparado a outras enzimas quimiotripticas, como a quimiotripsina bovina e a catepsina. Isto pode ser explicado, em parte, pois a SCCE tem um resíduo de asparagina na base do substrato primário, enquanto este sítio é ocupado por um resíduo de serina, na quimiotripsina e na catepsina G por um resíduo de alanina (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

Análises de RNAm de um grande número de amostras de diferentes tecidos humanos demonstraram alta expressão de SCCE somente na pele. Estudos imunohistoquímicos mostraram que esta enzima é expressa nos queratinócitos supra-basais da epiderme, e na raiz dos folículos pilosos. Na cavidade oral, a SCCE é encontrada no epitélio queratinizado do palato duro, mas não na mucosa bucal ou outros sítios com epitélio não queratinizado. Estes fatos sugerem que a expressão da SCCE é relacionada com o processo de diferenciação que leva a formação de epitélio descamante (ELGERUD *et al.*, 1996).

Resultados de estudos enzimológicos sugeriram, também, que a SCCE está localizada extracelularmente no estrato córneo. Envolvendo a microscopia imunoeletrônica, verificaram que a SCCE é encontrada intracelularmente em associação com os corpos lamelares no estrato granuloso. Na transição entre esta camada e a camada córnea, a SCCE é excretada para o espaço extracelular juntamente com os corpos lamelares. Assim, no estrato córneo esta enzima é encontrada somente nos espaços extracelulares, freqüentemente associadas com os corneodesmossomos (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

Experimentos *in vitro* também comprovaram que propriedades catalíticas e localização tecidual são compatíveis com o papel da SCCE na degradação das estruturas coesivas intercelulares no estrato córneo, como parte de eventos que levam a remodelação do tecido, e provável descamação. Podem existir também, outras proteinases envolvidas neste processo, além de especulações de que a SCCE é importante no processo de queratinização dos corneócitos (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996).

O processo de descamação envolve tanto a presença de corneodesmossomos, importantes para a coesão do estrato córneo como a degradação proteolítica destas estruturas, realizada pela SCCE, porém, como ocorre a regulação desta descamação ainda não está totalmente esclarecido (ELGERUD, 2000).

Existem duas hipóteses: um contínuo decréscimo na coesão, conforme as células migram em direção a superfície da pele, o que leva a descamação quando um ponto é atingido ou a degradação das estruturas coesivas pode acontecer somente nas camadas mais superficiais onde a descamação acontece (EGELRUD, LUNDSTROM e SONDELL, 1996). Outras hipóteses envolvem mudanças na composição dos lipídeos dos espaços intercelulares do estrato córneo ou no conteúdo de água (ELGERUD, 2000).

WALSH & CHAPMAN (1991) investigaram a possibilidade de açúcares (oligossacarídeos) protegerem os desmossomos e os

corneodesmosomos da proteólise. Trabalhando com pele de orelha de porco exposta a hidrolases, monitorando através de microscopia eletrônica de transmissão, os autores concluíram que os açúcares agem prevenindo a descamação prematura, através da proteção aos corneodesmosomos e aos desmosomos contra as proteases extracelulares derivadas dos grânulos de membrana.

EKHOLM & EGELRUD (1999), estudaram a ação da SCCE na psoríase, tentando elucidar a natureza desta enzima presente em lesões psoríticas através de análises bioquímicas. Encontraram que em comparação a pele normal, o número de camadas celulares expressando SCCE em lesões psoríticas é consideravelmente maior.

O papel da catepsina na forma D e da SCCE na descamação epidermal humana, foi também estudado, sob a óptica do pH do meio, por HORIKOSHI *et al.* (1999), concluindo que a descamação epidérmica em pH ácido requer duas atividades proteolíticas, uma das quais é análoga da quimiotripsina e a outra da catepsina D.

Recentemente, EKHOLM, BRATTSAND e EGELRUD (1999) sugeriram que a SCCE é produzida como um precursor inativo sem atividade proteolítica, existindo a necessidade de uma enzima ativadora. Esta ativação envolve a clivagem proteolítica do pró-peptídeo SCCE por uma enzima que apresenta substratos específicos como a tripsina. Em zimogramas de extratos de estrato córneo, componentes caseinolíticos com massa molecular de cerca de 30 kDa foram detectados além de SCCE. Esta protease pode ser inibida pela leupeptina, mas não pela quimostatina, sugerindo um substrato específico de enzimas como a tripsina.

Em 2000, YOUSEF *et al.* decodificaram a SCCE e a classificaram como um novo membro da família das "Kallikreinas", caracterizando-a genomicamente, mapeando-a e estudando sua expressão no tecido e regulação hormonal.

### **3.2 Promotores de absorção**

Como já extensivamente discutido, a mais importante função da pele humana é agir como uma barreira limitando a perda de água e eletrólitos, além de impedir a absorção percutânea de substâncias, indesejadas ou agressivas, presentes no ambiente externo. O estrato córneo é o passo limitante na penetração cutânea, embora a epiderme viável possa segurar a penetração de compostos extremamente hidrofóbicos (MORGANTI *et al.*, 2001).

Como o mecanismo de transporte é a difusão, o papel do estrato córneo como barreira é intimamente dependente do grau de hidratação (MORGANTI *et al.*, 2001).

A razão fundamental para que tão poucas substâncias sejam administradas por esta via é a alta impermeabilidade da pele humana, que limita a dosagem diária dos fármacos a 10 mg, liberados de um adesivo de tamanho adequado. Assim, formas de alterar e aumentar este baixo limite são sempre estudadas, a fim de cada vez mais incrementar a utilização desta ótima via de administração (BARRY, 2001).

Quando os xenobióticos estão na superfície da pele, as moléculas entram em contato com restos celulares, microrganismos, sebo e outros materiais, que praticamente não afetam a permeação. O penetrante tem três possibilidades de entrada no tecido viável: através dos folículos pilosos associado as glândulas sebáceas, via ductos sudoríparos ou através do estrato córneo contínuo (BARRY, 2001).

A área disponível para transporte nos apêndices cutâneos é de apenas 0,1%. Esta pode ser uma via importante para íons e moléculas extremamente polares que dificilmente atravessam o estrato córneo intacto. Os apêndices, também provêm atalhos, importante por curtos períodos, antes do “steady state” ser alcançado (BARRY, 2001).

O estrato córneo intacto promove a principal barreira; sua estrutura análoga a um muro de “tijolos e cimento”, onde os corneócitos de queratina hidratada agem como “tijolos” cercados por um “cimento”, composto por múltiplas bicamadas de lipídeos, como ceramidas, ácidos graxos, colesterol e ésteres de colesterol. Estas bicamadas formam regiões de gel semicristalino e domínios de cristais líquidos. A maioria das moléculas penetra através desta micro-rota intercelular e, portanto, as formas de promover uma maior absorção ou penetração cutânea, atuam quebrando ou “afrouxando” esta elegante arquitetura molecular (BARRY, 2001).

A outra micro-rota de penetração é a transcelular, ou seja, através dos corneócitos ou “tijolos”. Embora esta rota seja normalmente negligenciada, devido a dificuldade de passagem, reduções drástica na sua resistência abrem caminhos alternativos. Algumas moléculas podem modificar o material peptídico/protéico no domínio da bicamada, abrindo esta densa estrutura, tornando-a mais permeável e assim aumentando o coeficiente de difusão.

As proteínas do estrato córneo são reconhecidamente insolúveis, resultado de intensas ligações cruzadas (“crosslinking”) tanto do envelope celular quanto das proteínas intracelulares. Assim para aumentar a difusão através dos corneócitos podemos aumentar a turgidez da matriz protéica ou alterar a sua estrutura. Uma diminuição da densidade destas ligações cruzadas do envelope celular pode permitir acesso as células e, dentro das queratinas intracelulares e matriz protéica, diminuir a densidade de “crosslinking” resultando em um aumento da difusão através das regiões celulares (SUHONEN, BOUWSTRA e URTTI, 1999).

Este fato pode gerar dois efeitos: aumento da área superficial acessível para a penetração; diminuição do caminho de penetração. Conseqüentemente, um agente dissulfito redutor (ex. DTT – dithiothreitol) demonstrou aumentar a permeação de compostos hidrofílicos através da epiderme humana, como resultado da alteração da conformação protéica, indicada por um aumento de 100 x no conteúdo de tiol livre e pelo

aparecimento de uma banda de Amida I (estiramento vibracional do carbono da amida), associada com conformação protéica como "β-sheet" na análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. No entanto o DTT fornece apenas um modesto aumento na permeabilidade relativamente a outros promotores de absorção, que agem na matriz lipídica do estrato córneo (SUHONEN, BOUWSTRA e URTTI, 1999).

Alterações nas estruturas protéicas do estrato córneo têm sido freqüentemente atribuídas a promotores de absorção, como propilenoglicol, etanol e dimetilsulfóxido (DMSO). Foi sugerido que eles substituem as moléculas de água ligadas as cadeias polares laterais protéicas, resultando em alterações conformacionais da proteína queratinizada da α-hélice e β-folha. A formação β-folha foi relatada como sendo reversível após a hidratação. O etanol foi descrito como indutor do intumescimento das fibrilas de queratina, além de extrair as proteínas do estrato córneo (SUHONEN, BOUWSTRA e URTTI, 1999).

O uso de enzimas em cosméticos e medicamentos é atualmente uma tendência. Enzimas proteolíticas, como é o caso da papaína, são empregadas para "peeling" e para amaciar a pele (SANTOS, 2001), porém seu uso como promotor de absorção tem sido pouco estudado.

TRAVERSA (2003), estudou a aplicação de papaína em formulações cosméticas, avaliando sua eficácia como agente depilatório. Conclui que a papaína inibe o crescimento de pêlos e descreveu também que a epiderme dos animais apresentava espessamento após a administração da mesma.

As enzimas podem interferir na permeação cutânea, quer favorecendo ou impedindo a absorção de substâncias ativas, portanto podem ser utilizadas como promotores ou retardadores. É interessante notar que o processo natural de substituição da pele é controlado por meio de enzimas específicas que dissolvem os desmossomos, liberando as células mortas da superfície da pele. Essas enzimas são produzidas nos queratinócitos, sendo

os grupos sulfidrilas os pontos ativos que rompem as ligações peptídicas, muito mais que o ácido triglicólico e a cisteína.

Como um adjuvante do amaciamento, já que por si só não aumenta o conteúdo de água da pele, existe a visão de melhorar a pele seca através da remoção enzimática das escamas do estrato córneo. O uso de enzimas proteolíticas aplicadas topicamente demonstrou ser benéfico em remover superfície de pele seca, melhorando os sintomas de xerose. Estas enzimas também foram quimicamente modificadas através da ligação com glicanas aumentando sua estabilidade e reduzindo o potencial alérgico. Existem muitos cosméticos comercialmente disponíveis contendo tais enzimas. Ultimamente, a aplicação tópica de formulações contendo a protease descamatória específica da pele, a SCCE recombinante, pode ser mais eficaz, ao invés do uso de proteases bacterianas (HARDING *et al.*, 2000).

PATIL *et al.* (1996) 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 *et al.* (1998) investigaram *in vitro* a influência de substâncias queratolíticas, tais como a uréia, ácido salicílico e a papaína na permeabilidade do nitrato de miconazol, ketoconazol 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.

BOCK *et al.* (1998) estudaram o transporte de enzimas proteolíticas através de monocamadas de células Caco-2, de forma a elucidar como a tripsina, quimotripsina, papaína e a bromelaína atravessam a barreira mucosa intestinal, após a administração oral. Concluíram que estas enzimas facilitam o transporte de compostos normalmente não absorvíveis.



Papaína é uma enzima proteolítica proveniente do látex das folhas e frutos do mamão verde adulto *Carica papaya* Linn, cultivado nos países tropicais como Índia, Sirilanka, África do Sul e Havaí. A papaína hidrolisa especificamente ligações peptídicas de aminoácidos hidrofóbicos normalmente presentes no estrato córneo (HWANG & IVY, 1951; REMINGTON'S, 1990).

A extração do látex se dá por incisões no fruto, havendo a liberação de um exsudato fluido límpido, aquoso, sensível ao oxigênio e ao calor. Esse látex, depois de seco, pulverizado, peneirado e acondicionado adequadamente em frascos de polietileno, deve ser mantido ao abrigo da luz (ARNON, 1970).

A papaína purificada é encontrada sob forma de um pó higroscópico, de coloração variando desde o branco até o amarelo, com odor característico e leve sabor de pepsina. A atividade da papaína é maior a pH 6, mas a enzima retém aproximadamente 75% de sua atividade entre pH 5 e 7 (GUZMAN & GUZMAN, 1953; MERCK INDEX, 1996).

A molécula de papaína é constituída por 212 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molar igual a 23350 daltons. A conformação estrutural da papaína é estabilizada por pontes S-S que, uma vez destruídas, levam à perda da atividade catalítica, enzimática e imunológica da enzima. A conformação estrutural da papaína é estabilizada por três ligações dissulfeto, e a principal cadeia da enzima é dobrada formando dois domínios com tamanhos equivalentes com uma depressão entre eles. O sítio catalítico de resíduo de cisteína (Cis-25) encontra-se perto da base de uma das paredes que formam o vale, e o sítio catalítico do resíduo de histidina (His-159) e do resíduo de ácido asparático (Asp-158) encontram-se na parede oposta (ZHUANG & BUTTERFIELD, 1991).

Esta enzima é utilizada na terapêutica como debridante enzimático, facilitando a cicatrização de lesões, removendo secreções, tecidos necrosados e crostas de lesões cutâneas (VELASCO, 1993; STARLEY, 1999).

Há problemas associados com a aplicação geral de proteases na superfície da pele, pois é difícil controlar sua ação. A estabilidade de formulações elaboradas com enzimas, também não é facilmente alcançada, levando pesquisadores a estudar formas de imobilizar a papaína, a fim de aumentar seu período de ação (BROOKS, 1999). Enzimas covalentemente modificadas com polímeros grandes podem reter uma considerável atividade biológica e ao mesmo tempo resistir a denaturação provocada por altas temperaturas e agentes caotrópicos (RAJALAKSHMI & SUNDARAM, 1995).

Algumas enzimas têm especificidade quase absoluta por um dado substrato, não atacando nem mesmo moléculas muitíssimo semelhantes. Outras apresentam especificidade relativamente ampla, e agem em muitos compostos com características estruturais comuns. Por exemplo, a quimotripsina catalisa a hidrólise de muitos peptídeos ou polipeptídeos diferentes, entretanto quebra apenas as ligações peptídicas nas quais o grupo carbonila é dado por resíduos de fenilalanina, tirosina ou triptofano (LEHNINGER, 1988).

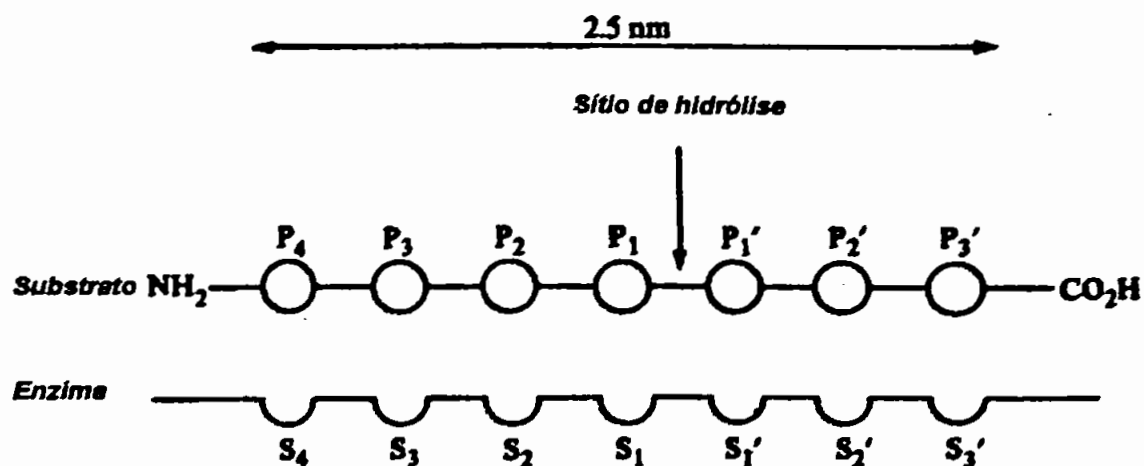
Estudos da especificidade das enzimas pelos substratos levaram ao conceito de uma relação complementar do tipo "chave-fechadura" entre a molécula do substrato e uma área determinada da superfície da molécula da enzima, o sítio catalítico ou sítio ativo, ao qual a molécula de substrato está ligada enquanto sofre a ação catalítica (LEHNINGER, 1988).

A especificidade das enzimas requer que a molécula do substrato tenha duas características estruturais distintas: (1) ligação química específica que pode ser atacada pela enzima e (2) geralmente, algum outro grupo funcional, chamado de grupo de ligação, ao qual a enzima se liga, posicionando a molécula de substrato no sítio ativo de forma apropriada para que a ligação suscetível fique localizada de maneira precisa em relação ao grupo catalítico da enzima (LEHNINGER, 1988).

No caso da papaína, uma proteinase tiol, o grupo nucleofílico é uma cisteína de cadeia lateral, que está parcialmente hidrolisada como resultado da presença de uma histidina de cadeia lateral na vizinhança. A polarização do grupo carbonila da ligação amida, ocorre por ligações de hidrogênio como

no caso das quimotripsina, e o grupo que doa prótons é uma histidina de cadeia lateral (PRICE & STEVENS, 1989).

A papaína não é uma enzima específica, mas preferencialmente P1 deve ser arginina e lisina (PRICE & STEVENS, 1989).



**Figura 7.** Sub-sítios específicos da papaína revelados pelo mapa de sítio ativo. (PRICE & STEVENS, 1989).

Estudos foram feitos para verificar a especificidade da papaína frente a substratos peptídicos sintéticos, demonstrando que existem sete "sub-sítios" na enzima, e que o sub-sítio S<sub>2</sub> interage especificamente com cadeia lateral de L-fenilalanina (Figura 7). Trabalhos posteriores demonstraram que o sub-sítio S<sub>1</sub>' é esteroespecífico para L-aminoácidos com preferência por cadeias laterais hidrofóbicas de leucina e triptofano. A explicação em termos estruturais para esta interação precisa entre enzima e substrato neste caso, demonstrou ser um desafio para a cristalografia de raios X; no entanto a provável localização dos sub-sítios S<sub>1</sub>', S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> na enzima foi deduzido (PRICE & STEVENS, 1989).

### **3.3 Avaliação, através do uso de cultura celular de queratinócitos humanos, da segurança e eficácia da papaína como promotor de absorção.**

Novas substâncias ativas farmacêuticas e cosméticas, assim como aditivos alimentares devem ser testados extensivamente, quanto a sua toxicidade, antes de serem liberados para o uso público. Estes testes geralmente utilizam um grande número de animais de experimentação, o que vem sendo contestado tanto pelo público, quanto pelas sociedades protetora de animais e mesmo por pesquisadores. Na Europa foi atualmente banido o uso de testes *in vivo* em animais, para cosméticos.

Em 1959, dois pesquisadores britânicos, William Russell e Rex Burch, sugeriram algumas formas pelas quais os cientistas poderiam tornar mais humanas as pesquisas que envolvem animais. Suas idéias são conhecidas como os Três Rs: *refinement, reduction e replacement*. O termo alternativo cobre os três Rs (<http://altweb.ihspsh.edu/regulations/cosmetic.htm>, 11/09/2002; <http://www.frame.org.uk/Alternat.htm>, 10/02/2003).

Os testes *in vitro* eram classificados em três grandes grupos: cultura de células de vertebrados, cultura de organismos invertebrados e análises químicas (SILBER, 1991). Atualmente os métodos alternativos podem ser divididos em seis categorias: banco de dados; sistemas computacionais, também conhecidos como testes *in silico*; técnicas físico-químicas; uso de organismos invertebrados ou vertebrados em estágio embrionário; estudos em seres humanos e cultura de células, tecidos e órgãos (<http://www.frame.org.uk/Alternat.htm>, 10/02/2003).

As pressões, tanto humanas quanto econômicas, para que ao menos uma parte dos testes de citotoxicidade fossem feitos *in vitro*, levou ao desenvolvimento acentuado de novas metodologias. Essas utilizam linhagens especializadas de células e culturas organotípicas interativas, resultando em ensaios confiáveis e esclarecedores (FRESHNEY, 2000).

Os testes *in vitro* baseiam-se no uso de pele humana obtida geralmente de cirurgias plásticas, o que confere aos estudos uma boa correlação entre estes dados e aqueles obtidos *in vivo*. A obtenção deste tipo de material nem sempre é fácil, além de existirem problemas com a variedade natural de cada pele.

Uma população celular relativamente bem definida, queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans, fibroblastos e sebócitos, podem ser isoladas da pele humana e utilizadas para testes de atividade biológica de vários compostos medicamentosos ou cosméticos. A cultura pura é mais barata e mais fácil de manter. Cada linhagem celular é caracterizada baseada em sua morfologia e função (MAJMUDAR & SMITH, 1998).

- **Melanócitos:** é a segunda maior população de células na epiderme. São grandes e dendríticas localizadas nas camadas basais da pele. Sua função é produzir melanina que protege as células vizinhas da radiação UV. Eles transportam a melanina aos queratinócitos através dos dendritos.
- **Células de Langerhans:** estas células têm um importante papel no sistema imune da pele. A cultura primária destas células é menos estável que a de queratinócitos e melanócitos e, portanto, menos utilizada como modelo *in vitro*.
- **Fibroblastos:** células mais populosas na derme. São largamente utilizadas na cultura celular devido a sua alta capacidade de crescimento e vigor, quando comparada a outras linhagens celulares. São células maiores que os queratinócitos, de formato alongado, com terminações pontiagudas. A função principal dos fibroblastos é sintetizar proteínas da matriz extracelular, como o colágeno, fibronectina, elastina e proteoglicanas além das suas enzimas de degradação, como a collagenase, elastase e outras metaloproteinases de matriz (MAJMUDAR & SMITH, 1998).

Na cultura celular de queratinócitos, os fibroblastos têm como função prover uma camada de sustentação, fornecendo alguns compostos, além da interação celular, para que estes possam crescer.

- **Queratinócitos:** células epidérmicas primárias de formato irregular. Sintetizam um grande número de fatores de crescimento, proteínas e enzimas.

O uso de cultura celular de queratinócitos possibilita a realização de um grande número de experimentos com o mesmo tipo de células, obtidas de um único doador (KRIWET & PARENTEAU, 1996).

RHEINWALD & GREEN (1975a, 1975b, 1977) desenvolveram protocolo próprio de cultura de queratinócitos a partir de células isoladas introduzindo modificações importantes nos sistemas de culturas propostos até então, entre os quais o cultivo dos queratinócitos humanos sobre camada de fibroblastos 3T3 murinos irradiados, que se comportavam como camada de sustentação ("feeder layer"), e a adição do Fator de Crescimento Epidérmico ("epidermal growth factor" ou EGF) ao meio de cultura. A combinação dessas propostas permitiu estabelecer método onde queratinócitos isolados com potencial clonogênico multiplicavam-se e podiam ser utilizados em culturas secundárias, terciárias, etc.

A dissociação das células da cultura inicial e sua propagação em culturas filhas podem ser realizadas cobrindo toda a longevidade destas células *in vitro*, em até cerca de 150 replicações (RHEINWALD & GREEN, 1975b).

BARRANDON & GREEN (1987), descreveram um método de análise que revela o potencial de crescimento de clones individuais. Os autores demonstraram a existência de três tipos de clones de queratinócitos com diferentes capacidades de crescimento. **Holoclonos** (*holo* = inteiro) formam colônias que crescem rapidamente, sendo que menos que 5% das colônias são abortivas e diferenciadas. **Paraclones** (*para* = intermediária) são programadas para um crescimento limitado e conseqüentemente formam

colônias terminais pequenas e disformes. **Meroclones** (*mero* = parcial) formam dois tipos de colônias, em crescimento e terminal, portanto contém uma proporção de células que foram diferenciadas em paraclones.

A toxicidade é um evento complexo *in vivo*, onde pode haver um dano celular direto, como no caso de fármacos anticancerígenos citotóxicos; efeitos fisiológicos, como o transporte pela membrana do rim ou a neurotoxicidade cerebral; efeitos inflamatórios, tanto no local de aplicação como em outros locais e outros efeitos sistêmicos. Atualmente, é difícil monitorar efeitos sistêmicos e fisiológicos *in vitro* assim, a maioria dos testes, determinam os efeitos a nível celular, ou seja, a citotoxicidade (FRESHNEY, 2000).

Definições de citotoxicidade variam, dependendo da natureza do estudo e se as células morreram ou apenas tiveram seu metabolismo alterado. Enquanto um agente anticancerígeno deve matar as células, demonstrações de atoxicidade de outros medicamentos podem requerer uma análise mais sutil de alterações mínimas metabólicas ou alterações dos sinais célula-célula, como os fornecidos por uma inflamação ou resposta alérgica (FRESHNEY, 2000).

Embora os testes *in vitro* não possam substituir completamente os testes *in vivo* ainda, eles nos fornecem informações úteis quanto aos aspectos que influenciam o crescimento ou a sobrevivência celular. Para tanto a escolha apropriada do teste é de fundamental importância, dependendo da substância a ser estudada e da cultura celular empregada.

Os testes de viabilidade celular fornecem informações quanto a respostas imediatas ou curtas, tais como alterações na permeabilidade da membrana ou uma perturbação de um caminho metabólico específico. Medem a proporção de células viáveis após um procedimento traumático. A maioria destes testes se baseiam na ruptura da integridade da membrana que é determinada pela entrada de um corante ao qual a célula é geralmente impermeável (ex.: "trypan blue") ou a liberação de um corante normalmente

adquirido e retido por células viáveis (ex.: "neutral red"). Este efeito, no entanto, é imediato e não prevê sobrevivência posterior (FRESHNEY, 2000).

Os testes de sobrevivência esclarecem a capacidade de renovação celular. Enquanto os testes de viabilidade são convenientes e geralmente rápidos e fáceis de realizar, eles mostram apenas as células mortas, ou seja, permeáveis, durante a realização do teste. No entanto, freqüentemente as células que foram submetidas a influências tóxicas podem demonstrar efeito horas ou até mesmo, dias depois. A natureza dos testes requeridos para mensurar a viabilidade nestes casos é necessariamente diferente, já que existe a possibilidade de que no momento da medição, as células mortas já estejam desaparecidas. Assim, testes longos são usados para demonstrar a sobrevivência que é definida como a retenção da capacidade regenerativa (FRESHNEY, 2000).

BRAA & TRIGLIA (1991) descreveram o uso de uma pele humana tridimensional, nova e padronizada, para a determinação da inocuidade de 15 xampus utilizando quatro diferentes ensaios com distintos mecanismos de ponto final. Os dados obtidos *in vitro* foram comparados com a classificação do teste de Draize *in vivo* para olhos não lavados. Concluíram que o tecido reconstruído, quando produzido de acordo com as boas normas de fabricação é uma ferramenta útil, como alternativa aos testes *in vivo*, para testar fórmulas cosméticas.

REGNIER *et al.* (1993) compararam o estrato córneo humano e uma epiderme reconstituída, através de exames histológicos, assim como pela estimativa da permeabilidade a água. Medidas de absorção percutânea qualitativas, qualificavam a epiderme reconstruída, porém medidas quantitativas demonstraram que esta é mais permeável que a pele humana normal.

EUN & JUNG em 1994, verificaram o potencial irritante de xampus, porém utilizando cultura de queratinócitos humanos. Os testes de MTT (teste do bromato de difenil tetrazólio) e a liberação de desidrogenase láctica (LDH) foram empregados para verificação da toxicidade celular. Estes



pesquisadores relataram diferenças entre os resultados obtidos *in vitro* e aqueles decorrentes da reação do “patch test” e sugeriram que os dados obtidos *in vitro* devem ser cautelosamente interpretados.

Também em 1994, FABREGUETTE *et al.*, verificaram a citotoxicidade de antisépticos em cultura celular de fibroblastos e queratinócitos. A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o teste MTT, e os resultados indicaram citotoxicidade dos anti-sépticos na concentração terapêutica após exposições de 15 minutos.

OSBORNE, PEKKINS e ROBERTS (1995) desenvolveram um método *in vitro* baseado em células humanas para triagem de substâncias aquosas ou não com potencial ocular irritante, tais como líquidos, sólidos insolúveis, pós, grânulos, emulsões e ácidos/álcalis. O modelo tri-dimensional foi construído remetendo a um epitélio mucoso não cornificado.

Atualmente, modelos que substituem completamente o teste de Draize já podem ser adquiridos de empresas especializadas que produzem em larga escala, e que reproduzem satisfatoriamente o sistema ocular *in vitro*.

Uma outra aplicação da cultura celular foi descrita por PHILLIPS em 1995, onde está foi utilizada para testar plantas. Extratos de cinco vegetais foram testados utilizando hepatócitos e células de ovário de hamster chinês (CHO). Os resultados sugeriram diversas aplicações da cultura celular, que pode ser empregada para a detecção de efeitos de toxinas e antitoxinas em produtos naturais.

A evolução natural da cultura celular resultou no emprego de peles artificiais ou equivalentes dérmicos para testar novas substâncias, procurando entender como estas interagiam com a membrana epidérmica. GODWIN, MICHNIAK e CREEK (1997), utilizaram uma pele alternativa para estudar os promotores de absorção transdérmicos. A pele alternativa era constituída por uma camada dérmica contendo fibroblastos humanos dispersos em uma matriz de colágeno e uma camada epidérmica de

queratinócitos humanos diferenciados e estratificados. Concluíram que embora naquele momento ainda não fosse possível aceitar a pele artificial como um substituto para a pele humana *ex vivo*, ajustes poderiam ser feitos para um maior refinamento dos resultados.

Ainda tentando construir um modelo de pele equivalente para triagem cosmetológica, AUGUSTIN *et al.* (1997), desenvolveram um novo biopeptídeo. Este era compreendido por matriz porosa de um complexo formado por colágeno, glicosaminoglicanas (GAG) e chitosana, ocupado por fibroblastos humanos normais, que sintetizam sua própria matriz extracelular, e sobre a qual foram semeados queratinócitos humanos normais. Concluíram que este novo modelo poderia ser utilizado na triagem de novas moléculas cosmetológicas ou em estudos de eficácia de cosméticos.

Medidas do efeito protetor de protetores solares tópicos foram feitas *in vitro* utilizando um modelo tri-dimensional dérmico e um equivalente da pele (AUGUSTIN, COLLOMBEL e DAMOUR, 1997). A fotoproteção, proveniente dessas substâncias, foi verificada medindo-se a viabilidade celular residual após 24h da irradiação, utilizando-se o método do MTT e verificando a resposta inflamatória através da liberação de interleucina 1 $\alpha$ . Concluíram que os modelos *in vitro* poderiam ser utilizados como testes de triagem para a verificação dos efeitos fotoprotetores.

GYSLER *et al.* (1997) no mesmo ano utilizaram cultura de queratinócitos humanos obtidos de prepúcio e fibroblastos para verificar a biotransformação de prednicarbato (corticosteróide tópico) *in vitro*, demonstrando mais uma utilização da cultura celular.

O objetivo do estudo de BENASSI, BERTAZZONI e SEIDENARI (1999) foi comparar os testes *in vitro* empregando culturas em monocamada com os resultados de "patch tests" em voluntários humanos. Quando comparados com os resultados *in vivo*, todos os quatro testes (contagem de células, conversão do MTT, incorporação de timidina e incorporação de

“Neutral Red”), superestimaram a toxicidade de uma das substâncias sugerindo que os dados devem ser sempre interpretados cautelosamente.

Para as matérias-primas cosméticas, os testes são feitos para identificar o potencial dos mesmos em causar irritação dérmica ou ocular, sensibilidade ou corrosividade dérmica. Os métodos alternativos estão disponíveis para testar a corrosividade dérmica e a fototoxicidade. Em fevereiro de 2000, a Comunidade Européia (CE) formalmente aceitou três métodos alternativos, o que significa que atualmente as indústrias farmacêuticas e cosméticas dos países membros da CE devem utilizar somente estes métodos. São eles:

- TER – “transcutaneous electrical resistance” e EPISKIN™ ambos para testar a corrosividade dérmica. O TER envolve a medida da corrosividade dérmica através dos efeitos que a substância química tem sobre as propriedades elétricas de fragmentos de pele de rato, enquanto o EPISKIN™ mede os efeitos da viabilidade celular em um equivalente dérmico reconstituído.
- 3T3 NRU - teste para verificar a fototoxicidade. Alguns componentes cosméticos e não apenas aqueles utilizados em protetores solares, devem ser testados pela sua fototoxicidade, isto é a capacidade que algumas substâncias tem de causar toxicidade quando expostas a luz UV. O teste de 3T3 NRU mede o número de células que sobreviveram após a exposição a amostra e a luz UV, comparado com o número de sobreviventes após a exposição a amostra (<http://altweb.jhsph.edu/regulations/cosmetics.htm>. 11/09/2002).

### **3.4 Metodologias biofísicas**

A quantificação de xenobióticos na pele é essencial para a pesquisa tanto de formulações tópicas quanto transdérmicas, quando se deseja entender o comportamento destas substâncias nas diversas camadas da pele, assim como o fluxo através desta até atingir a circulação sistêmica (TOUITOU, MEIDAN e HORWITZ, 1998).

Um outro aspecto a ser considerado é o mecanismo da penetração, isto é, a distribuição da substância nas diversas camadas da epiderme e derme e nos apêndices. Para os sistemas tópicos, deseja-se o acúmulo na pele com o mínimo de permeação, enquanto que para os sistemas transdérmicos, prefere-se o comportamento oposto (TOUITOU, MEIDAN e HORWITZ, 1998).

A literatura vem descrevendo várias metodologias diferentes para quantificação de substâncias na pele. As técnicas incluem medidas de extração da pele, cortes horizontais e stripping, remoção dos folículos pilosos, autoradiografias quantitativas e métodos espectroscópicos.

Os métodos analíticos reduzem o tempo, o trabalho e o material utilizados nas análises, apresentam limites de detecção mais baixos e possibilitam a automação. Utilizam pouca amostra de pele, e a mesma pode ser empregada em várias determinações, com equipamentos diferentes, o que implica em diminuição do erro, causado pela variabilidade intrínseca advinda do uso de peles humanas obtidas de diversas fontes.

### 3.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

A análise térmica envolve um conjunto de técnicas com o objetivo de estudar as propriedades física e química de substâncias em função de um programa de temperatura controlada (GIOLITO & IONASHIRO, 1988).

Esse método vem sendo utilizado em diferentes áreas de ciências aplicadas para desenvolver estudos relacionados à estabilidade térmica de espécies químicas, mecanismos de termo decomposição, caracterização de materiais, determinação do grau de pureza ou composição de algumas misturas e para o estudo do estrato córneo humano (AL-SAIDAN, BARRY, WILLIAMS, 1998).

Algumas técnicas existentes são:

- Calorimetria exploratória diferencial ou calorimetria de varredura diferencial – DSC;
- Análise térmica diferencial – DTA;
- Termogravimetria – TG;
- Análise dinâmica mecânica – DMA;
- Análise termomecânica - TMA;
- Análise termodielétrica - DETA;
- Corrente de despolarização termoestimulada / relaxação dielétrica termoestimulada - TSC/RMA;
- Análise microtérmica -  $\mu$ TA.

Dentre estas a mais utilizada para o estudo do estrato córneo é o DSC. Esta é uma técnica térmica em que a diferença de fluxo de calor, para

manter temperaturas iguais, entre a referência e a amostra é medida em função de um programa de temperatura controlada.

Quando uma amostra sofre alterações de temperatura, devido a um evento endotérmico ou exotérmico, em função do aquecimento ou resfriamento a que é submetida, registra-se o fluxo de calor diferencial necessário para mantê-los na mesma temperatura. A diferença de temperatura entre a amostra e o material de referência é devido a reações químicas (decomposição, combustão) ou mudança de estado físico (fusão, sublimação ou transições cristalinas). Fusão, ebulição, sublimação e dessolvatação apresentam picos endotérmicos, o que significa que o sistema absorveu energia. A decomposição normalmente é um processo endotérmico.

Assim o DSC mede a diferença de fluxo de calor necessário para manter temperaturas iguais, entre a referência e a amostra.

Existem dos tipos de aparelhos de DSC:

- a) Fluxo de calor = possui um único forno, que contém no seu interior uma chapa de constantan (liga formada por 60% de Cobre e 40% de Níquel) com dois discos salientes, um para a referência e outro para a amostra. Abaixo destes discos, encontram-se instalados os termopares para as medidas da temperatura. Acima do disco de referência coloca-se o cadinho de referência (cadinho de alumínio vazio e selado) e acima do disco da amostra coloca-se o cadinho com a amostra selada. A chapa de constantan é aquecida eletricamente. A maior parte dos aparelhos DSC comerciais é do tipo com fluxo de calor. Neste tipo de DSC o evento endotérmico apresenta um pico com mínimo e um evento exotérmico um pico com máximo;
- b) Compensação de potência = possui dois fornos de aquecimento independentes, um para a referência e outro para a amostra. A temperatura de ambos os fornos é mantida igual enquanto se aplica um programa de temperatura controlado. Mede-se a

potência elétrica necessária para manter a temperatura da amostra igual ao da referência. Neste tipo de DSC um evento endotérmico apresenta um pico com máximo e um evento exotérmico um pico com mínimo.

Historicamente o estudo do estrato córneo utilizando DSC vem evoluindo ao longo dos últimos 30 anos. VAN DUZEE (1975) utilizou esta técnica para estudar as propriedades termo-estruturais dos lipídeos e proteínas do estrato córneo humano. É interessante notar que as temperaturas de transição relatadas em seu trabalho, que se relacionam com as estruturas da pele são as mesmas encontradas em estudos mais recentes. São elas: 40 °C, 75 °C, 85 °C e 107 °C.

As transições térmicas de lipídeos do estrato córneo de camundongos neonatal foram estudadas por REHFELD & ELIAS em 1982. Foram descritas fases de transições lipídicas nos níveis fisiológicos e supra-fisiológicos.

LAMPE *et al.* (1983), também estudaram os lipídeos do estrato córneo, neste caso de humanos, caracterizando e verificando as variações regionais. Forneceram informações detalhadas de análises quantitativas dos lipídeos do estrato córneo humano, e sobre a variabilidade da composição lipídica em quatro sítios com diferentes permeabilidades.

GOLDEN (1987) estudou o estrato córneo utilizando a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia infravermelho. Estas técnicas eram anteriormente usadas para estudos de transição de lipídeos e proteínas em uma variedade de sistemas biológicos e sintéticos, fornecendo informações independentes, porém complementares, sobre a estrutura das cadeias de hidrocarboneto dos lipídeos.

Focando em transições de lipídeos que ocorrem em/ou abaixo de temperaturas fisiologicamente relevantes GAY *et al.* (1994), enfatizaram com seus resultados que pode existir um erro quando ocorre interpretação de experimentos com lipídeos isolados do estrato córneo; que é sempre indicado analisar uma amostra empregando diversas técnicas biofísicas e

que uma caracterização completa do comportamento dos lipídeos é necessária para a compreensão da estrutura e permeação do estrato córneo.

ZELLMER, PFEIL e LASCH (1995) estudaram a interação de lipossomas de fosfatidilcolina com o estrato córneo humano. Através da análise com o DSC concluíram que a vesícula de lipossoma não penetra intacta na pele, e sim é desintegrada na superfície da mesma. As moléculas de lipídeos individuais então interagem com os lipídeos da barreira e penetram.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) tem sido utilizada para estudar as transições térmicas em estrato córneo de mamíferos. Tipicamente, as transições térmicas ocorrem a 35-42 °C, 60-77 °C, 70-90 °C e 95-120 °C e referem-se a T1, T2, T3 e T4 respectivamente (AL SAIDAN, 1998). T1, T2 e T3 são atribuídas a mudanças de fase nas bicamadas lipídicas intercelulares e T4 é associada com a desnaturação de proteínas. No estrato córneo humano, uma quinta transição a 51-55 °C foi encontrada e atribuída a ligação covalente de lipídeos ao envelope de queratinócitos (CORNWELL *et al.*, 1996).

CORNWELL *et al.* (1996), utilizaram o DSC e espalhamento de Raios X de ângulo baixo, para investigar as ações de três terpenos como promotores de absorção: d- limoneno, nerolidol e 1-8 cineol. Estes terpenos aumentam a permeabilidade da pele humana para compostos hidrófilos.

A interação da indometacina com um novo promotor de penetração e seu efeito na liberação transdérmica, foi estudado por BÜYÜKTIMKIN *et al.* (1996). Utilizando o DSC como uma das metodologias de análise, os autores verificaram a existência de ligações de hidrogênio preferenciais entre os grupos carboxílicos da indometacina e o grupo da amina terciária do promotor.

Já MOGHINI, WILLIAMS e BARRY (1996a) estudaram um modelo de matriz lamelar para os lipídeos do estrato córneo, caracterizando-o e



comparando-o com a estrutura intercelular do estrato córneo humano, propondo que este modelo seja utilizado para estudos de interação entre promotores, fármacos e os lipídeos intercelulares.

MIZUSHIMA, FUKASAWA e SUZUKI, também em 1996, descreveram o comportamento de fase de lipídeos do estrato córneo contendo uma pseudo-ceramida sintética, e estudaram a função do colesterol no mesmo.

A influência da lecitina e da uréia na permeação *in vitro* de acetato de hidrocortisona foi estudado por BENTLEY *et al.* (1997), utilizando a técnica de DSC e FTIR. Resultados demonstraram que a lecitina tem influência significativa na matriz lipídica do estrato córneo, sugerindo a ruptura da estrutura lamelar lipídica intercelular.

AL-SAIDAM, BARRY e WILLIAMS (1998) estudaram e compararam as curvas de DSC, de neonatos de ratos, de camundongos e de coelhos, assim como, o estrato córneo de pele abdominal de adultos humanos, usando condições experimentais idênticas. Amostras secas foram utilizadas nesta comparação para evitar discrepância que poderiam ocorrer devido a variações no grau de hidratação das amostras. A comparação direta do DSC das amostras dissecadas das diferentes espécies mostrou quatro transições endotérmicas. No entanto, a temperatura de transição variou. As temperaturas T2 e T3 foram mais altas para amostras humanas do que para outras espécies animais. Isto pode implicar que as moléculas de lipídeos humanos seriam mais ordenadas e agrupadas, resultando em uma maior estabilidade da barreira e conseqüente impermeabilidade.

Uma outra aplicação do DSC foi descrita por LEE & TOJO (1998), onde foi realizada a caracterização da permeação cutânea da vitamina C, sob o aspecto de análises teóricas e perfis de penetração.

EL MAGHRABY, WILLIAMS e BARRY (2000), estudaram a liberação tópica de lipossomas ultradeformáveis de estradiol através de calorimetria exploratória diferencial ultra-sensível. O objetivo do estudo foi refinar a concentração de tensoativos, utilizados como ativadores.

Nos últimos anos observou-se na literatura a utilização da Calorimetria Exploratória Diferencial associada a técnicas espectroscópicas, tendência esta já preconizada por GAY *et al.* em 1994.

### 3.4.2 Espectroscopia vibracional

A melhoria da sensibilidade dos instrumentos ópticos nos últimos anos facilitou a quantificação de compostos na pele através dos métodos espectroscópicos. Técnicas como a espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier e acessório de refletância total atenuada, espectroscopia de fluorescência e espectroscopia fototérmica, são vantajosas já que não são invasivas e oferecem dados em tempo real da localização do penetrante, quando utilizadas *in vivo* (TOUITOU, MEIDAN e HORWITZ, 1998).

A espectroscopia vibracional provou ser uma poderosa ferramenta para o estudo de sistemas biológico. Sua aplicação para a resolução de problemas inerentes a este sistema está continuamente se expandindo, particularmente com o surgimento da espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) nas últimas décadas. Uma das maiores vantagens da espectroscopia no infravermelho é que virtualmente qualquer amostra em qualquer estado, pode ser estudada. Sistemas biológicos como proteínas, peptídeos, lipídeos, biomembranas, carboidratos, fármacos e tecidos humanos têm sido caracterizados com sucesso utilizando-se esta técnica (STUART, 1997).

Os espectrômetros no infravermelho estão sendo comercializados desde 1940, sendo que os primeiros aparelhos utilizaram prismas como elementos dispersivos. Na metade da década de cinquenta, as redes de difração foram introduzidas em aparelhos de dispersão, porém os mais significantes avanços na espectroscopia no infravermelho vieram com os espectrômetros com transformada de Fourier. O espectrômetro FT-IR melhorou consideravelmente a qualidade dos espectros e diminuiu o tempo de obtenção de dados (STUART, 1997).

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica que estuda a vibração dos átomos nas moléculas. Um espectro é obtido passando-se

radiação infravermelha através de uma amostra e determinando-se que fração da radiação incidente é absorvida em uma energia particular. A energia em que cada banda aparece no espectro de absorção corresponde a frequência de uma vibração normal da molécula amostrada (STUART, 1997).

Amostras de pele são geralmente usadas para estudar a interação entre tecidos vivos e várias misturas complexas, como loções, cremes e géis. A microscopia FT-IR é também uma ferramenta valiosa para estes tipos de análises. Em estudo realizado com pele humana *in vivo* (200x200  $\mu\text{m}$ ) tratada com emoliente, onde a amostra foi submetida a várias lavagens após o tratamento, verificou-se a aparição de uma banda perto de  $730\text{ cm}^{-1}$ , relacionada com a presença de hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa de um dos componentes da loção. Notou-se também a existência de uma banda a  $1040\text{ cm}^{-1}$ , resultante do estiramento C-O, relacionada com um dos componentes ativos do emoliente. Este exemplo mostra como a microscopia no infravermelho pode ser utilizada para verificar a presença de compostos químicos na pele (STUART, 1997).

Já em 1977, OERTEL, estudava as mudanças da conformação das proteínas do estrato córneo humano, induzidas por sulfóxidos orgânicos, utilizando a espectroscopia no infravermelho. Analisando o efeito do dimetilsulfóxido, hexilmetilsulfóxido e decilmetilsulfóxido, o autor descreveu importantes informações, úteis para a compreensão da ação de promotores de absorção cutâneo.

GOLDEN *et al.* (1986), utilizaram esta técnica, juntamente com o DSC para relacionar a função barreira com as estruturas do estrato córneo.

KURIHARA-BERGSTROM *et al.* (1990), estudaram o aumento da absorção percutânea de uma molécula iônica por um sistema etanol-água através da pele humana. Para investigar os possíveis mecanismos para o aumento do fluxo de íons associados com estes sistemas, os efeitos do etanol sobre o estrato córneo humano foram estudados com espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Alterações da estrutura

biofísica nos domínios protéicos assim como a extração de lipídeos foram determinadas.

Utilizando o FT-IR, ONGPIPATTANAKUL *et al.* (1991), realizaram um estudo com uma conotação diferente. O equipamento foi utilizado para verificar se o ácido oléico utilizado como promotor de absorção formava uma fase separada ou se interagiu com os lipídeos do estrato córneo.

Os efeitos da  $\beta$ -ciclodextrina na pele e implicações para o transporte transdérmico de piribedil foram os tópicos de estudo de LEGENDRE *et al.* (1995). As caracterizações físico-químicas realizadas com DSC e FTIR não demonstraram alterações notáveis, explicado pela baixa penetração percutânea do composto.

LIN, DUAN e LIN (1996), usaram as técnicas de FTIR e DSC acoplados a um microscópio simultaneamente, para investigar o processo de conversão da estrutura protéica de estrato córneo porcino após o tratamento com promotores de absorção.

O Azone<sup>®</sup>, um promotor de absorção recentemente proibido pelo FDA, foi estudado em 1996, por HARRISON *et al.*, através de FTIR, de forma a elucidar seu mecanismo de ação.

BHATIA *et al.* (1997), verificaram o efeito de promotores de absorção e da iontoforese na permeabilidade de um hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH), através da pele de porco.

Em 1998, STOTT, WILLIAMS e BARRY, estudaram a liberação transdérmica de sistemas eutéticos, utilizando como fármaco modelo o ibuprofeno. O ponto de fusão e a composição dos diagramas de fase foram determinados por DSC e o FTIR foi utilizado para investigar a natureza das interações.

Na busca de uma maior especificidade, paralelamente iniciou-se a utilização da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier acopladas a um acessório de refletância total atenuada.

### **3.4.2.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada – ATR FTIR**

Em teoria, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR-FTIR) pode ser utilizada para determinação da concentração de um fármaco aplicado topicamente em diversas regiões do estrato córneo, sustentado pelo fato que uma única absorção de radiação infravermelha (IR), distinta daquela absorvida pelo estrato córneo, pode ser identificada. Enquanto, o estrato córneo absorve radiação extensivamente na região do IR médio existem janelas transparentes, mais notadamente entre 1700 e 2500  $\text{cm}^{-1}$  e abaixo de 3600  $\text{cm}^{-1}$ . O estrato córneo também absorve radiação no IR próximo. O método de ATR-FTIR pode também medir outros componentes do sistema aplicado (co-solventes, promotores, etc), de acordo com as mudanças na absorção dos lipídeos e proteínas do estrato córneo induzidos pela aplicação destas substâncias.

A região de infravermelho no espectro eletromagnético (comprimento de onda 2,5 –15  $\mu\text{m}$ ) corresponde a energias vibracionais de deformação angular e estiramento da maioria das vibrações normais. Quando moléculas interagem com a radiação infravermelho, apenas as radiações específicas, equivalente a energia vibracional natural dos grupos funcionais, são absorvidas. A espectroscopia, portanto, apresenta-se como uma técnica rápida e simples de identificar grupos funcionais. Recentemente a técnica foi radicalmente melhorada pelo desenvolvimento dos métodos com transformada de Fourier que permitem que as análises sejam realizadas com menos ruído, aumento de sensibilidade e de resolução e permitem determinações mais precisas e rápidas (TOUITOU, MEIDAN e HORWITZ, 1998).

Quando utilizamos o ATR-FTIR, a radiação infravermelho incide na face de um cristal transparente (elemento interno de reflexão - IRE) que está em contato com a amostra de pele. A configuração do cristal resulta em

reflexões internas múltiplas da radiação até sua saída na face oposta, dirigindo-se ao detector. Durante a passagem através do cristal, a radiação realmente penetra na pele, levemente além da superfície refletora do cristal, antes de retornar. Como resultado, o estrato córneo irradiado absorve energia infravermelho a uma frequência correspondente a seu espectro normal de absorção. Reflexões múltiplas amplificam o sinal. (TOUITOU, MEIDAN e HORWITZ, 1998).

Em 1990, MAK, POTTS e GUY, realizaram um estudo *in vivo*, utilizando o ATR-FTIR, para medir a penetração percutânea de uma substância-modelo em conjunto com diversos promotores de absorção. Concluíram com sucesso que a técnica não invasiva pode ser utilizada para a verificação da cinética, extensão e mecanismo do aumento da penetração percutânea em humanos *in vivo*.

BRAUE & PANNELLA (1990) utilizaram o ATR-FTIR para analisar a efetividade de protetores tópicos contra a penetração de agentes químicos. Este estudo foi desenvolvido com a finalidade de se desenvolver protetores tópicos capazes de proteger os soldados do exército americano das substâncias químicas que muitas vezes são utilizadas como armas de guerra. Assim a espectroscopia vibracional foi utilizada para verificar o tempo necessário para que uma substância química atravessasse o protetor tópico e chegue a pele.

Uma validação da técnica de ATR-FTIR como método quantitativo, para mensurar a absorção percutânea *in vivo*, foi realizada em 1993 por HIGO *et al.*. Os dados obtidos sugeriram que a técnica poderia ser aplicada na medição de biodisponibilidade de substâncias tópicas e bioequivalência de formulações.

Comparações entre os efeitos de corrente elétrica e promotores de absorção nas propriedades da pele humana foi realizada por CLANCY, CORISH e CORRIGAN (1994) utilizando os métodos de ATR-FTIR e DSC.

YOKOMIZO & SAGITANI (1996), utilizaram a ATR-FTIR para analisar o mecanismo e elucidar os efeitos de fosfolipídios na penetração percutânea da prednisolona *in vitro*.

PELLET *et al.* (1997) publicaram dois trabalhos comparando resultados de permeabilidade entre as células de difusão convencionais e a espectroscopia de ATR-FTIR. O primeiro estudou apenas as membranas sintéticas de silicone, demonstrando que existia uma boa correlação entre os coeficientes de permeabilidade utilizando estas técnicas diferentes. O segundo trabalho, determinou a rota difusional nas membranas sintéticas e no estrato córneo humano.

Já os efeitos da iontoforese e de promotores químicos nos parâmetros estruturais envolvidos na permeação de propranolol foram estudados por CHESNOY *et al.* em 1999. A caracterização do estrato córneo humano foi feita por difração de raios X, ATR-FTIR e DSC.

Utilizando espectroscopia ATR-FTIR e DSC, POULIOT *et al.* (1999), compararam um equivalente de pele humana obtida através de cultura celular de queratinócitos humanos sobre um gel de colágeno contendo fibroblastos com a pele humana normal. Concluíram que o comportamento térmico do estrato córneo *in vitro* possui transições térmicas em temperaturas mais baixas que a pele humana e que as vibrações simétricas e assimétricas de CH<sub>2</sub> sugerem que os lipídeos intercelulares estão menos organizados que na pele humana.

BRANCALEON *et al.* (2000) verificaram através da espectroscopia de ATR-FTIR as diferenças espectrais entre o estrato córneo *in vivo* e componentes moleculares do sebo.

Outra aplicação para o ATR-FTIR seria a investigação da influência de produtos cosméticos no estrato córneo. PRASCH *et al.* (2000), concluíram que cremes tópicos causam alterações na maciez da pele e no grau de ordem dos lipídeos do estrato córneo. Um creme lamelar, com estrutura parecida com a dos lipídeos do estrato córneo, aumenta o grau de



ordem das cadeias alquilas do filme lipídico da pele enquanto um creme convencional tipo a/o reduz este grau de ordem.

A biodisponibilidade da terbinafina após administração tópica foi estudada por ALBERTI *et al.* (2001), utilizando a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada, *in vivo*. Os autores demonstraram que o método é fácil e pouco invasivo, útil na avaliação de bioequivalência de formulações tópicas.

**Tabela 3.** Freqüências ( $\text{cm}^{-1}$ ) de FT Raman e FT-IR e descrição aproximada dos modos vibracionais para o estrato córneo humano, encontradas em literatura (BARRY, EDWARDS e WILLIAMS, 1992).

Raman	FT-IR	Descrição
424 w, Br		$\delta$ (CCC) esquelética
526 mw, br		$\nu$ (SS)
600 w, br		$\rho$ (CH) rocking
623 w		$\nu$ (CS)
644		$\nu$ (CS) amida IV
746 w, br		$\rho$ (CH <sub>2</sub> ) em fase
824 w		$\delta$ (CCH) alifática
850 w		$\delta$ (CCH) aromático
883 mw		$\rho$ (CH <sub>2</sub> )
931 w, br		$\rho$ (CH <sub>3</sub> ) terminal; $\nu$ (CC) $\alpha$ -hélice
956 w		$\rho$ (CH <sub>3</sub> ); $\delta$ (CCH) olefinico
1002 m		$\nu$ (CC) anel aromático
1031 mw		$\nu$ (CC) conformação esquelética
1062 mw	1076 w	$\nu$ (CC) esquelético, conformação trans
1082 mw		$\nu$ (CC) esquelético, conformação randomizada
1126 mw		$\nu$ (CC) esquelético, conformação trans
1155 w		$\nu$ (CC); $\delta$ (COH)
1172 w		$\nu$ (CC)
1244 w, sh	1247 w	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) "wagging"; $\nu$ (CN) amida III desordenada

1274 mw		$\nu$ (CN) e $\delta$ (NH) amida III e $\alpha$ -hélice
1296 ms	1298 w	$\delta$ (CH <sub>2</sub> )
	1366 vw	$\delta$ [C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] simétrico
1385 vw	1389 vw	$\delta$ (CH <sub>3</sub> ) simétrico
	1401 w	$\delta$ [C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] simétrico
1421 w, sh		$\delta$ (CH <sub>3</sub> )
1438 s	1440 vw	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) deformação angular
	1451 vw	$\delta$ (CH <sub>3</sub> ) assimétrico
	1460 vw	$\delta$ (CH <sub>2</sub> )
1552 w	1548 vs	$\delta$ (NH) e $\nu$ (CN) amida II
1585 w		$\nu$ (C=C) olefinico
1652 s	1650 vs	$\nu$ (C=O) amida I $\alpha$ -hélice
	1656 vs	$\nu$ (C=O) amida I desordenada
1743 vw	1743 w	$\nu$ (C=O) lipídio
1768 vw		$\nu$ (COO)
2723 w		$\nu$ (CH) alifático
2852 m	2851 s	$\nu$ (CH <sub>2</sub> ) simétrico
	2873 w	$\nu$ (CH <sub>3</sub> ) simétrico
2883 ms		$\nu$ (CH <sub>2</sub> ) assimétrico
	2919vs	$\nu$ (CH <sub>2</sub> ) assimétrico
2931 s		$\nu$ (CH <sub>3</sub> ) simétrico
2958 m, sh	2957 w	$\nu$ (CH <sub>3</sub> ) assimétrico
3000vw,sh		
3060 w		$\nu$ (CH) aromático
	3070 w	Primeira harmônica, amida II em 1548 cm <sup>-1</sup>
	3287 vs,br	$\nu$ (OH) da H <sub>2</sub> O

V = muito (very); s = forte (strong); m= médio (medium); w = fraco (weak); sh = ombro (shoulder); brf = largo (broad);  $\nu$  = estiramento (stretching);  $\delta$  = deformação (deformation);  $\rho$  = "rock".

### **3.4.2.2 Espectroscopia Raman com transformada de Fourier – FT-Raman**

A espectroscopia Raman ocupa hoje uma posição destacada dentre as técnicas usadas na investigação da estrutura microscópica da matéria, seja ela orgânica ou não (FARIA & SANTOS & GONÇALVES, 1997).

Sabe-se que as técnicas espectroscópicas de uma maneira geral fornecem informações detalhadas sobre os níveis de energia das espécies em estudo; particularmente na espectroscopia vibracional, a grande vantagem reside na maior riqueza de detalhes proporcionada pelos níveis de energia vibracional quando comparada aos níveis de energia eletrônicos. Enquanto os espectros eletrônicos são constituídos por bandas largas e geralmente sem estrutura, os vibracionais representam a “impressão digital” das moléculas (FARIA & SANTOS & GONÇALVES, 1997).

A espectroscopia Raman apresenta algumas vantagens sobre a espectroscopia no infravermelho (IR) sendo as principais a possibilidade de obtenção do espectro de substâncias em meio aquoso e a perspectiva do uso de recursos especiais como o efeito Raman ressonante. Trata-se também de uma técnica de investigação não destrutiva, que combinada com o uso de fibras ópticas, permite a monitoração remota de amostras como é o caso das pesquisas biomédicas que estudam tecidos *in vivo* (FARIA & SANTOS & GONÇALVES, 1997).

Pode-se dizer, de forma breve e concisa, que no espalhamento inelástico de luz, a radiação eletromagnética interage com a matéria através de seu campo elétrico, levando-a até um estado virtual, assim chamado por não corresponder a um auto-estado da molécula. Esse estado virtual pode ter sua energia relaxada de dois modos: a molécula pode retornar ao estado vibracional original ou pode retornar a um outro estado de diferente energia. No primeiro caso, tem-se o espalhamento elástico de luz, ou espalhamento Rayleigh, responsável pela coloração azul do céu, enquanto que no segundo caso tem-se o espalhamento inelástico, ou espalhamento Raman (FARIA & SANTOS & GONÇALVES, 1997).

O espalhamento inelástico de luz pode resultar tanto em um fóton de menor energia, quanto em um fóton de maior energia. No primeiro caso, o fóton incidente encontra a molécula em um estado vibracional fundamental e o fóton espalhado a deixa em um estado vibracionalmente excitado; a diferença de energia entre o fóton incidente e o espalhado corresponde, portanto, a energia necessária para excitar esse nível vibracional. O mesmo acontece caso o fóton espalhado tenha maior energia que o fóton incidente: devido a distribuição de Boltzmann, existe um número finito de moléculas que, nas condições ambientes, já estão vibracionalmente excitadas e quando a molécula retorna ao estado fundamental a partir de um estado virtual, um fóton com maior energia do que o fóton incidente é criado (FARIA & SANTOS & GONÇALVES, 1997).

No primeiro caso mencionado tem-se o espectro Raman na chamada região Stokes (fóton espalhado com energia menor que a do incidente), enquanto que no segundo, na região anti-Stokes (fóton espalhado com energia maior que a do incidente). Além da diferença de energia em valores absolutos, o espectro registrado nessas duas regiões apresenta significativas diferenças de intensidade, já que na região anti-Stokes a intensidade de uma banda é diretamente proporcional à população do nível vibracional correspondente, que por sua vez é inversamente proporcional à energia necessária para popular esse nível (FARIA & SANTOS & GONÇALVES, 1997).

Apesar do efeito Raman envolver também dois fótons, ele não deve ser confundido com fluorescência, uma vez que ambos os fenômenos têm naturezas diferentes (FARIA & SANTOS & GONÇALVES, 1997).

A técnica de espectroscopia Raman pode ser utilizada para diversos fins, como o estudo de células e cromossomos (PUPPELS *et al.*, 1990); conformação de DNA *in vitro* e *in vivo* (PETICOLAS & EVERTSZ, 1992) e anomalias moleculares em lesões de pele malignas e benignas (GNIADOCKA *et al.*, 1997). A microscopia Raman também pode fornecer imagens esclarecedoras de sistemas emulsionados, informação útil na

estabilidade de formulações cosméticas e farmacêuticas (ANDREW *et al.*, 1998).

A técnica de espectroscopia Raman de superfície pode confirmar a presença de bactérias na pele, através da detecção de cadeias curtas de ácidos carboxílicos liberados como produtos da fermentação durante o crescimento destas células. Tal estudo é útil na pesquisa de *Propionibacterium acne*, uma das bactérias causadoras da acne (WELDON *et al.*, 1998).

O incrível aumento do uso das técnicas de espectroscopia vibracional nas pesquisas aplicadas a biomédicas pode ser justificado pelas informações detalhadas da estrutura molecular obtidas com os espectros. Como dito anteriormente a espectroscopia Raman apresenta um interesse particular já que a presença de água não influi de forma significativa nos resultados. Infelizmente uma forte presença de fluorescência de fundo ocorre freqüentemente nos sistemas biológicos, restringindo a observação das bandas Raman a uma pequena faixa, pertencente ao espalhamento inelástico da luz (FARIA & SOUZA, 1999).

Para contornar este problema, utilizou-se a excitação na região do infravermelho próximo (NIR) empregando-se o equipamento Raman com transformada de Fourier (FT), que permite a investigação de biopolímeros como é o caso da pele humana, da unha e outros tecidos queratinizados (WILLIAMS, EDWARDS e BARRY, 1992).

A espectroscopia Raman é um efeito de espalhamento de luz resultante da variação do momento dipolo induzido, dependendo da polarização molecular durante a vibração (WILLIAMS, EDWARDS e BARRY, 1992). É analisada a superfície da pele, sendo esta uma análise quantitativa, inclusive não sendo afetada pela variação da pigmentação da pele.

O estrato córneo dos mamíferos é naturalmente hidratado, o que pode causar problemas nas investigações que utilizam radiação infravermelho. Utiliza-se a espectroscopia Raman com transformada de Fourier já que esta

fornece espectros de boa qualidade, geralmente livres de interferência das bandas de água que absorvem muito fracamente no espectro Raman. (FARIA & SOUZA, 1999)

Verifica-se o estiramento das ligações C-H dos lipídeos nas amostras de pele. A pele de porco e a pele humana contêm tipos de lipídeos semelhantes, porém em quantidades diferentes. Tais diferenças entre o conteúdo lipídico e sua estruturação são particularmente interessantes já que podem fornecer indicações sobre a permeação de substâncias polares (WILLIAMS & BARRY, 1994).

WILLIAMS *et al.* (1992) utilizaram a espectroscopia Raman com transformada de Fourier para estudar a estrutura do estrato córneo verificando o espectro vibracional e comparando-o com o espectro obtido com a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.

Em 1993 WILLIAMS *et al.*, realizaram um estudo comparando algumas técnicas de espectroscopia Raman utilizadas nos estudos do estrato córneo humano. Concluíram que as variações intra e inter peles de cadáver tem uma mínima influência sobre os espectros Raman. Verificaram também que a água tem um efeito remoto, indicando que a hidratação do tecido não é um fator a ser extremamente controlado durante os experimentos com Raman como acontece com o FT-IR. As amostras de estrato córneo também mostraram serem estáveis a excitação com laser.

WILLIAMS & BARRY (1994), descreveram as diferenças estruturais entre a pele humana, pele de porco e pele de cobra, tentando correlacionar as variações nas características de permeabilidade dos agentes terapêuticos.

A técnica de espectroscopia FT-Raman foi utilizada por EDWARDS, WILLIAMS e BARRY (1995) a fim de verificar a aplicação desta na obtenção de diagnósticos dermatológicos, particularmente a condição de hiperqueratose.

Esta técnica também foi utilizada para verificar a interação entre o promotor de absorção, DMSO, e o estrato córneo humano (ANIGBOGU *et al.*, 1995). Os resultados demonstraram mudanças na conformação da queratina da forma de  $\alpha$ -hélice para  $\beta$ -folha pregueada, além de interações com os lipídeos do estrato córneo.

WEGENER *et al.* (1996), estudaram a estrutura dos lipídeos do estrato córneo através da espectroscopia de FT-Raman. Em um primeiro momento o objeto de estudo foi as ceramidas, lipídeo presente no estrato córneo, juntamente com ácidos graxos e colesterol, além de seus derivados. A ceramida tem um importante papel na manutenção da água no estrato córneo humano, participando da função barreira epidérmica. Um outro trabalho verificou uma mistura de colesterol e ceramidas (WEGENER *et al.*, 1997), além de uma mistura de ceramidas e ácido oléico (WARTEWIG *et al.*, 1998).

Os sistemas transdérmicos também foram estudados através da técnica de FT-Raman. ARMSTRONG *et al.* (1996), verificaram a distribuição do oestradiol em um adesivo transdérmico, demonstrando através de um mapeamento que o fármaco foi cristalizado durante o processo de produção, perdendo sua homogeneidade.

O cabelo humano foi objeto de estudo através desta técnica. AKHTAR *et al.* (1997), utilizando amostras de cabelo normal, não tratado e clareado, verificaram que mudanças na conformação associadas com as ligações dissulfeto nos componentes queratinizados são vistas em modos vibracionais próximos a  $500\text{ cm}^{-1}$ . Os autores sugeriram que esta técnica poderia ser empregada para investigações biomédicas de doenças de cabelo.

LAWSON *et al.* (1998), verificaram a desordem molecular induzida termicamente nos lipídeos do estrato córneo humano comparando-a com um sistema fosfolipídico.

De forma a estudar a estrutura protéica e a água em peles cronologicamente envelhecidas e fotoenvelhecidas, GNIADCKA *et al.*

(1998), utilizaram a espectroscopia de FT-NIR Raman (espectroscopia Raman no infravermelho próximo com transformada de Fourier). Concluíram que a pele fotoenvelhecida revela um alto grau de dobramento das proteínas e um aumento no conteúdo de água, sugerindo diminuição da interação água-proteína. Este fenômeno pode ser um importante mecanismo molecular de comparação da conformação de proteínas estruturais e função na pele fotoenvelhecida.

#### **3.4.2.3 Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho - PAS**

A espectroscopia fotoacústica (PAS) demonstrou ser adequada para a análise da penetração de substâncias aplicadas topicamente sobre a pele e outros tecidos biológicos. Na área da dermatologia, tem sido utilizada como uma técnica não invasiva para estudos de determinação de conteúdo de água no estrato córneo e para a determinação da distribuição de substâncias ativas na pele.

Alexander Graham Bell, em 1880, descreveu seu trabalho com fofone, aparelho formado por um espelho ativado por voz, uma célula de selênio e um receptor elétrico de telefone. Um raio de sol teve a intensidade modulada (I-M) em um ponto particular pelo espelho ativado por voz. Essa luz I-M foi então focalizada na célula de selênio, que por sua vez foi incorporada a um circuito de um telefone elétrico convencional. Como a resistência da célula de selênio depende da intensidade da luz aplicada sobre ela, o raio de luz solar modulado por voz resultou em uma conversa telefônica reproduzida eletronicamente (CIURCZAK, 1999).

Bell mostrou que um sinal audível pode ser obtido diretamente ao interromper um raio de luz com um disco rotativo dotado de fendas. O raio pode então ser focalizado sobre o selênio ou qualquer sólido sob a forma de diafragmas conectados a um sistema de audição. Ele demonstrou que o efeito fotoacústico baseou-se na absorção de luz e que o sinal resultante foi proporcional a intensidade da luz incidente. Como suas investigações,



contudo, foram baseadas no uso do ouvido humano, como detector, poucos projetos envolveram esse método até que equipamentos adequados foram desenvolvidos em 1970 (CIURCZAK, 1999).

Os equipamentos modernos possuem uma fonte de luz, um modulador de frequência, um monocromador, que pode ser substituído por um interferômetro do tipo existente em FT IR, e uma célula de amostragem com um microfone embutido. A radiação, que é modulada em uma frequência detectável por microfone, é focalizado sobre a amostra através de uma janela transparente e de um gás "transparente", como o hélio, que envolve a amostra no interior da célula. A amostra absorve a radiação convertendo-a em energia térmica que se propaga até a superfície, produzindo ondas sonoras que são detectadas pelo microfone. Esses pulsos são conhecidos como sinais fotoacústicos (CIURCZAK, 1999).

Um espectro no infravermelho é obtido pela representação gráfica do sinal fotoacústico em função do comprimento de onda incidente. Dessa maneira, um espectro idêntico a aquele produzido por um sistema infravermelho convencional é obtido, sem preparação da amostra (CIURCZAK, 1999).

Outra vantagem da espectroscopia fotoacústica é seu poder de penetração. Variando a frequência do anteparo, é possível regular a profundidade de penetração do sinal modulado. Por exemplo, em amostras com difusibilidade térmica de  $\sim 0,1 \text{ cm}^2/\text{s}$  (quase um condutor), a profundidade de penetração varia de 6 mm a 0,1 Hz até 20 mm a  $10^4 \text{ Hz}$ . Isso significa que uma onda incidente penetra profundamente e emite radiação rapidamente (CIURCZAK, 1999).

Difusibilidade térmica é a medida de quão rapidamente o calor é liberado em uma amostra excitada. Um alto valor de difusibilidade significa que a amostra retorna as condições ambientais rapidamente, permitindo que o sinal penetre mais profundamente. Um valor de difusibilidade baixo implica o bloqueio do sinal de frequência modulada como resultado da saturação de uma amostra ou alta temperatura (BROWN *et al.*, 1993; BAESSO, SHEN e SNOOK, 1994; SNOOK, LOWE e BAESSO, 1998; CIURCZAK, 1999).

Em 1978, PINES demonstrou uma nova técnica de verificação da efetividade de protetores solares utilizando a espectroscopia fotoacústica. No entanto, o equipamento realizava as leituras na região do ultravioleta, corroborando com o teste de uso do produto.

NORDAL & KANSTAD (1981) utilizaram a técnica fotoacústica para analisar os lipídeos da pele, indicando o método como rápido e simples no uso de análises de rotina laboratoriais.

POULET & CHAMBRON (1983), descreveram o conceito e as características de um detector fotoacústico com final aberto desenvolvido para medidas ópticas de absorção da pele *in vivo*. Os autores demonstraram que o sinal fotoacústico pode ser medido *in vivo* com redução do ruído causado pela vibração da pele do indivíduo quando um microfone diferenciado é utilizado.

Ainda utilizando metodologia *in vivo*, KÖMEL *et al.* (1986), verificaram a penetração de protetores solares utilizando medidas fotoacústicas. Protetores solares, segundo os autores, absorvem luz mais intensamente na faixa de UVA e UVB que a pele não tratada, assim sua penetração no estrato córneo pode ser detectada sensivelmente através destas medidas. Utilizando o mesmo equipamento que POULET & CHAMBRON (1983), foram estudados três agentes fotoprotetores, Eusolex 232, Eusolex 6300 e Eusolex 8020 em diferentes formulações. Os resultados experimentais demonstraram diferenças na penetração de dois agentes fotoprotetores incorporados em diferentes veículos, sendo que o agente dissolvido em álcool penetrou mais rapidamente que aqueles incorporados em cremes.

TAKAMOTO *et al.* (1990), associaram medidas fotoacústicas com medidas de absorbância. Utilizando a mesma sonda que POULET & CHAMBRON e KÖMEL *et al.*, os autores associaram a esta uma célula de difusão longitudinal de forma a medir a redução da substância aplicada a membrana através do método fotoacústico e a quantidade de droga que penetrou a membrana na célula de difusão, através da absorbância, simultaneamente em tempo real. Como resultado, após o tempo Lag, a absorbância aumentou em proporção a raiz quadrada do tempo. Como o

sinal obtido pelo PAS corresponde a quantidade de droga liberada da formulação, foi obtida uma boa correlação com a teoria de Higuchi.

Em 1994, BAESSO, SHEN e SNOOK empregaram a espectroscopia fotoacústica no infravermelho na configuração "step-scan" com transformada de Fourier para estudar a penetração de substâncias através da pele abdominal de porco. Os experimentos *in vitro* utilizaram o DMSO (dimetilsulfóxido) como substância penetrante, resultando na verificação da propagação do DMSO em diferentes tempos através de diferenças observadas nos espectros.

O fotoacústico, como uma ferramenta para estudos de permeação cutânea, foi mais uma vez investigado, por BERNENGO & GASQUEZ (1998), utilizando-se vários carreadores e um corante como marcador. A influência da natureza hidrofílica ou lipofílica do carreador aparece claramente na cinética de difusão, e a capacidade da técnica na investigação da profundidade foi indicada pelos resultados obtidos em várias modulações de frequência. Foram feitos estudos *in vivo* e *in vitro*.

SCHENDZIELORZ *et al.* (1999) estudaram a penetração do clotrimazol em formulação semi-sólida utilizando a "Step-Scan" PAS FT-IR. Utilizando membranas e metodologia *in vitro*, concluíram que o método é adequado já que as amostras podem ser investigadas sem preparação prévia e que os resultados obtidos são mais acurados que aqueles provenientes das outras técnicas utilizadas (sistemas de membranas multicamadas e modelo matemático).

A penetração de ditranol e metoxsaleno em preparação semi-sólida de vaselina através de uma membrana artificial foi estudada por HANH *et al.* (2000) através de três métodos espectroscópicos não invasivos: ATR-FTIR, Step-Scan FTIR-PAS e PAS ultravioleta (UV-PAS). Os estudos comparativos demonstraram que o ATR-FTIR é indicado para estudos de permeação, enquanto as técnicas fotoacústicas são capazes de fornecer o perfil da penetração das substâncias na membrana.

Utilizando o PAS, PUCETTI & LEBLANC (2000), verificaram o efeito de um agente auto-bronzeador, dihidroxiacetato (DHA), aplicado sobre

amostras de pele humana, obtidas de autópsias recente. O efeito bronzeante é aumentado pela radiação UV e o estudo demonstrou como perfis profundos de luz absorvida podem fornecer informações visuais na interação de cosméticos com as primeiras camadas da pele humana.

No mesmo ano, PUCETTI, TRANCHANT e LEBLANC (2000), apresentaram em congresso científico a estabilidade e penetração de aplicações epidérmicas (DHA e melatonina) analisadas por PAS.

HANH *et al.* (2001) estudaram a penetração de compostos através do estrato córneo humano utilizando FTIR-PAS. O estrato córneo humano isolado, um permeante lipofílico e a quantidade do composto retido na membrana foi quantificado, monitorando-se alterações do espectro durante a penetração, utilizando-se análises de multi-variância.

### 3.4.3 Microscopia

A microscopia eletrônica pode ser empregada para avaliar as estruturas da pele após aplicação de uma formulação contendo um promotor de absorção. Pode-se verificar modificações nos apêndices, nas diversas camadas da pele e nas ultraestruturas.

Dois tipos básicos de instrumentos são chamados de microscópios eletrônicos. Ambos foram inventados ao mesmo tempo, mas apresentam usos fundamentalmente diferentes. O microscópio eletrônico de varredura (*Scanning electron microscopy* – SEM) produz uma imagem que aparenta ser tri-dimensional, ao se utilizar um feixe de elétrons que varre a superfície da amostra gerando elétrons secundários que são detectados pelo sensor. A imagem é produzida depois de determinada área da amostra ter sido varrida. Já a microscopia de transmissão eletrônica (*Transmission electron microscopy* - TEM) projeta elétrons através de um tecido muito fino produzindo uma imagem bi-dimensional em uma tela fosforescente. O brilho de uma determinada área da imagem é proporcional ao número de elétrons que são transmitidos através da amostra (BOZZOLLA & RUSSEL, 1992).

A preparação do tecido para a microscopia eletrônica de transmissão pode ser dividida em oito passos principais: fixação primária, lavagem, fixação secundária, desidratação, infiltração com solventes de transmissão, infiltração com resina, inclusão e preparação dos blocos. O processo começa com um tecido vivo e hidratado e termina em uma amostra virtualmente livre de água e preservada em uma matriz de resina plástica estática. A mistura de resina plástica permeia os tecidos, substituindo a água entre as células e tornando-as firmes o suficiente para serem cortadas (BOZZOLLA & RUSSEL, 1992).

A fixação tem por objetivo preservar as estruturas dos tecidos vivos sem modificações. Os fixadores usados na TEM têm um baixo poder de

penetração nos tecidos, tanto animais ou vegetais. Assim, todo o material deve ser recortado em fragmentos pequenos, aproximadamente 1 mm de espessura, para uma fixação adequada e homogênea. Geralmente usa-se a solução fixadora de Karnovsky modificada ou solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% (v/v).

O fixador de Karnovsky usa uma porcentagem baixa de formaldeído no fixador primário, já que o uso de formaldeído com glutaraldeído leva a penetração mais rápida do fixador. O tempo de fixação é de 2 a 3 horas, já que não se recomenda um tempo prolongado, pois existe a possibilidade de extração de substância das células, e do aparecimento de artefatos de fixação. Recomenda-se temperatura ambiente ou 4 °C, nunca colocando o material no congelador, o que levaria a formação de cristais de gelo e conseqüente ruptura das organelas.

A desidratação tem por finalidade a troca de toda a água do material por um fluido que seja miscível tanto na água quanto no meio de inclusão. Esta desidratação é gradativa, passando o material por uma série crescente de etanol: do 70% ao absoluto.

Na infiltração as resinas empregadas apresentam alta viscosidade e devem ser introduzidas no material progressivamente, através de diluições gradativas realizadas no solvente intermediário, que é o óxido de propileno. Este óxido é muito volátil e rapidamente é eliminado do tecido, entretanto, o excesso deste produto ou de agente desidratante no tecido pode interferir na polimerização do meio de inclusão e na obtenção de um bloco com a dureza desejada. Para evitar este fato, recomenda-se deixar o material em resina pura a 37 °C, com o frasco aberto, antes da inclusão.

Na etapa da inclusão, o material é colocado em moldes adequado e coberto por resina, por 5 dias em temperatura de 60 °C para ocorrer a polimerização.

Ao final deste período, os blocos devem ser submetidos a uma delicada e importante operação para redução da superfície de corte a

proporções apropriada, operação esta denominada de trimagem. Os cortes semi-finos são então realizados com 400 nm de espessura, em ultramicrotomo, coletados em lamínas de vidro e corados com azul de toluidina, para observação ao microscópio óptico.

Após a observação dos cortes semi-finos, seleciona-se a área em estudo e faz-se uma nova trimagem. São então feitos cortes ultra-finos, com 70 a 60 nm de espessura, coletados em tela de cobre, geralmente de 200 mesh. As amostras são então contrastadas com uma solução alcoólica de acetato de uranila por 30-40 minutos.

DUPUIS *et al.* (1984) verificaram a relação *in vivo* entre o efeito reservatório na camada córnea e a absorção percutânea em humanos e ratos, empregando a microscopia eletrônica de transmissão.

A microscopia eletrônica de transmissão pode ser utilizada para uma variedade de estudos. WALSH & CHAPMAN (1991), demonstraram a importância dos açúcares na proteção das glicoproteínas dos desmossomas e corneossomas contra a proteólise.

LAW *et al.* (1995) verificaram a variação regional do conteúdo, composição e organização dos lipídeos da barreira epitelial de porcos. A microscopia eletrônica revelou que o espaço intercelular no estrato córneo epidermal contém múltiplas lamelas de lipídeos que se arranjam de forma alternada em espaços largos e estreitos. Os resultados sugeriram que as ceramidas são importantes componentes da barreira, mesmo em epitélios não queratinizados onde se encontram em um número reduzido, e que as diferenças na organização física da barreira lipídica também pode contribuir para as diferentes funções da barreira.

BERGH *et al.* (1999) estudaram a interação de vesículas elásticas e rígidas, com a pele humana *in vitro*, utilizando a técnica de microscopia eletrônica e microscopia de dois fótons excitados.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**



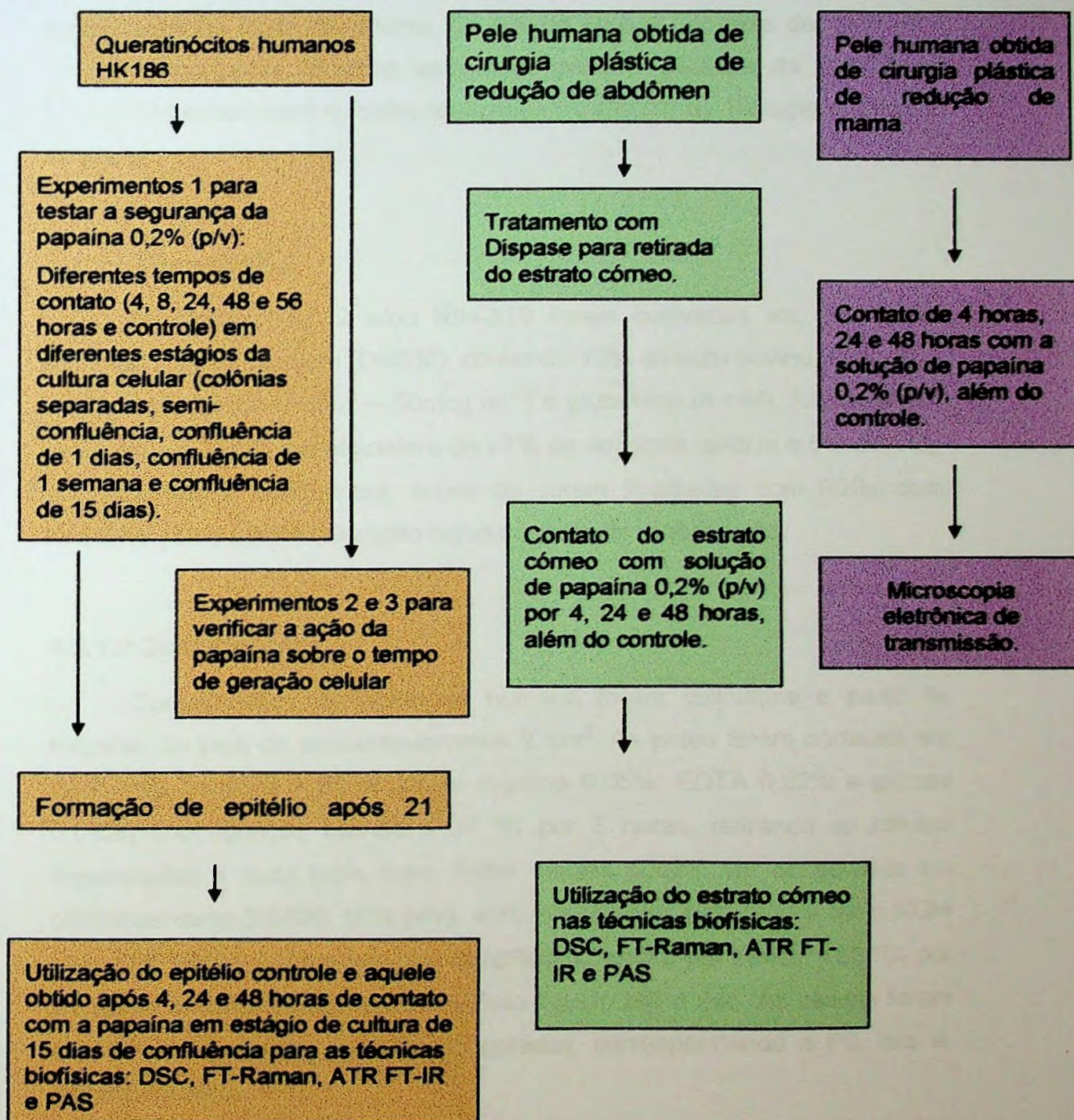
#### **4.1 Material**

- 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.
- Pele humana obtida de cirurgia plástica de redução de mama e de abdômen do Banco de Tecidos do HCFM-USP.
- Queratinócitos humanos HK186 obtido de biópsia de menino de 12 anos do Banco de Tecidos do HCFM-USP

As células e pele foram obtidas do Banco de Tecidos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em 18 de Fevereiro de 2002.

## 4.2 Métodos

### Fluxograma dos experimentos



### **4.2.1 Avaliação da eficácia e da segurança da papaína**

Os ensaios foram realizados sob condições assépticas em ambiente controlado de fluxo laminar biológico, utilizando materiais e reagentes esterilizados, por filtração esterilizante, calor seco ou úmido, radiação esterilizante ou óxido de etileno, de acordo com a natureza de cada um. Foram empregadas técnicas assépticas para a garantia da viabilidade celular. Os experimentos foram realizados no Centro de Biologia Molecular no IPEN.

#### **4.2.1.1 Fibroblastos**

As células 3T3-J2 e/ou NIH-3T3 foram cultivadas em Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), contendo 10% de soro bovino, penicilina-estreptomicina ( $50 \text{ UI mL}^{-1}$  –  $50 \text{ mcg mL}^{-1}$ ) e glutamina (4 mM). Ambas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera de 97% de umidade relativa e 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem a confluência, antes de serem irradiadas com 60Gy com radiação gama para a utilização como camada de sustentação.

#### **4.2.1.2 Queratinócitos**

Queratinócitos de epiderme humana foram cultivados a partir de biópsias de pele de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>. As peles foram cortadas em pequenos pedaços e tripsinizadas (tripsina 0,05%; EDTA 0,02% e glicose 0,01%) sob agitação branda a 37 °C por 3 horas, retirando as células tripsinizadas a cada meia hora. Estas células podem ser congeladas em criopreservante [DMSO 10% (v/v), soro fetal bovino 30% (v/v) e meio KGM sem EGF 60% (v/v)] em álcool isopropílico ou então, em freezer –80 °C, por 24 horas e armazenadas em nitrogênio líquido até o uso. As células foram colocadas em cultura e então congeladas, correspondendo a P0, isto é, passagem zero.

As células descongeladas em suspensão foram semeadas ( $2 \times 10^6$  células/25 cm<sup>2</sup>) em uma camada de sustentação ("feeder layer") de



fibroblastos 3T3-J2 ou NIH-3T3, irradiados a 60 Gy (6000 rads) e cultivados em KGM (Keratinocyte Growth Medium) a 37 °C em 97% de umidade do ar contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O KGM é constituído por Dulbecco's modified Eagle's Médium (DMEM) e Ham's F12 (na proporção de 2:1), contendo 10% de soro fetal bovino, glutamina (4 mM), penicilina-estreptomicina (50 UI mL<sup>-1</sup> – 50mcg mL<sup>-1</sup>), adenina (0,18 mM), insulina (5 µg mL<sup>-1</sup>), hidrocortisona (0,4 µg mL<sup>-1</sup>), toxina colérica (0,1 nM), triiodotironina (20 pM) e EGF (10 ng/mL, "epidermal growth factor"). Este é o meio de cultura rotineiramente utilizado na reconstituição *in vitro* de epiderme e mucosa. Esta passagem é chamada de P1.

Culturas primárias subconfluentes foram tripsinizadas e passadas em densidades variadas segundo as necessidades. Esta propagação pode ser efetuada por diversas vezes consecutivas, sendo denominadas de passagens ou repiques. Assim temos P2, P3, P4...

#### **4.2.1.3 Influência da papaína em diversos estágios da cultura celular de queratinócitos**

Os Queratinócitos HK186 na passagem P1 foram descongelados em uma garrafa de 25 cm<sup>2</sup>. Após atingirem a semi-confluência, foram tripsinizados, contados e semeados 25.000 células/poço em 5 placa "multiwell" de 12 poços com camada de sustentação formada por Fibroblastos NIH 3T3 ou 3T3-J2, previamente irradiados com 60 Gy. Após 2 dias de semeados, com as colônias ainda separadas, foi adicionado 1 mL de uma solução de papaína 0,2% (p/v) + cloridrato de cisteína 0,04% (p/v) em meio KGM sem EGF (K<sup>-</sup>), recém preparada e previamente esterilizado por filtração.

As amostras em duplicata foram mantidas em contato com esta solução de papaína por 4, 8, 24, 48 e 56 horas. Foi feito também um controle sem tratamento, onde foi adicionado apenas o meio de cultura K<sup>-</sup>.

Após estes períodos pré-estabelecidos de contato, trocou-se o meio de cultura por KGM e as amostras foram mantidas por 21 dias, quando estas

atingiram estado final de diferenciação, trocando o meio periodicamente para manutenção das células.

O mesmo foi feito quando as células atingiram a semi-confluência, a confluência de 1 dia, confluência de 1 semana e confluência de 15 dias (Tabela 4). Para cada experimento foi preparada uma nova solução de papaína.

**Tabela 4.** Esquema do experimento para verificar a influência da papaína 0,2% (p/v) como promotor de absorção em cultura celular de queratinócitos humanos HK186.

<b>Estágios da Cultura</b>	<b>Tempos de exposição</b>
Colônias Separadas  2 a 3 dias  Placa I	T0 (Controle)
	T 4 horas
	T 8 horas
	T 24 horas
	T 48 horas
	T 56 horas
Semi confluência  Placa II	T0 (Controle)
	T 4 horas
	T 8 horas
	T 24 horas
	T 48 horas
	T 56 horas
Confluente 1 dia  Placa III	T0 (Controle)
	T 4 horas
	T 8 horas
	T 24 horas
	T 48 horas
	T 56 horas
Confluente 1 semana  Placa IV	T0 (Controle)
	T 4 horas
	T 8 horas
	T 24 horas
	T 48 horas
	T 56 horas
Confluente 15 dias  Placa V	T0 (Controle)
	T 4 horas
	T 8 horas
	T 24 horas
	T 48 horas
	T 56 horas

\* As culturas, em cada uma das condições, foram mantidas até o 21º dia, após o início do primeiro experimento.

O desenvolvimento das culturas celulares foi registrado por fotografia desde o estágio inicial, após cada período de contato estipulado no decorrer dos 21 dias. Foi utilizada uma câmera Nikon N6006 AF acoplada ao Microscópio – Nikkon TMS – trinocular.

Ao final do período de 21 dias, cada poço teve seu meio de cultura aspirado e lavado com solução fisiológica. Foram adicionados 1,5 mL de solução de dispase  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  em meio de cultura sem soro. As placas foram incubadas por 45 minutos em estufa  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Depois do tempo estipulado, a dispase ("Neutral protease from *Bacillus polymyxa*" Grade II – Boehringer Mannheim) foi inativada com solução fisiológica e os epitélios formados foram armazenados em formaldeído 4% (p/v).

#### **4.2.1.4 Determinação do tempo de vida celular – "Life Span"**

A determinação do tempo de vida celular foi feita semeando-se  $5 \times 10^4$  queratinócitos em placas de  $9,6 \text{ cm}^2$ , contendo uma camada uniforme de 3T3 irradiados ( $2,3 \times 10^5$  células). Após dois dias de semeadura foram adicionados 2 mL de papaína 0,2% (p/v) + cisteína 0,04% (p/v) em meio KGM, previamente esterilizados por filtração. Esta solução ficou em contato com as células por 4, 24 e 48 horas, sempre acompanhado por um controle, ao qual foi adicionado apenas o meio KGM. No momento em que as células atingiram a sub-confluência (80% do preenchimento do poço) foram tripsinizadas (0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA). As células foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas novamente em diferentes poços de cultura, na mesma densidade da passagem anterior. Este procedimento foi repetido até a impossibilidade destas células se manterem em cultura.

Paralelamente foram semeadas 200 células para a determinação da EFC (descrito no próximo item).

A determinação do tempo de vida celular, realizado em duas réplicas, foi calculada usando a seguinte fórmula, que fornece o número de gerações celulares (MATHOR, 1994; ROCHAT, KOBAYASHI e BARRANDON, 1994):

$$X = 3,322 \log \frac{N}{N_0}$$

Onde:

X      número de gerações

N      número total de células obtidas após cada tripsinização

N<sub>0</sub>    número de células semeadas multiplicadas pela EFC correspondente

### ***Teste de eficiência celular***

A EFC (eficiência de formação de colônia) é derivada de culturas obtidas a partir de 200 queratinócitos semeados em placas de 9,6 cm<sup>2</sup>, contendo uma camada uniforme de "feeder layer" irradiados (2,3 x 10<sup>5</sup> células). Estas culturas foram mantidas, com troca de meio KGM a cada 2 dias, por 12 dias (enquanto as colônias ainda são discretas), sendo então coradas com corante não vital (Rodamina B) e contadas. Cada colônia origina-se de uma célula semeada que aderiu a placa e multiplicou-se posteriormente. A EFC é calculada pela razão entre o número de colônias obtidas e o número de células semeadas (MATHOR, 1994).

A Rodamina B (C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>C<sub>1</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) é um corante não vital que é incorporado tanto nas células vivas quanto nas mortas. As placas de EFC foram coradas com 1-2 mL de uma solução de 2% (p/v) em formaldeído 4% (v/v) por 5 a 10 minutos, sendo posteriormente lavadas com água corrente até a eliminação total do excesso de corante. A quantificação é efetuada mediante contagem visual das colônias (MATHOR, 1994).

## **4.2.2 Preparação das membranas para as análises por métodos biofísicos**

### **4.2.2.1 Preparação da epiderme *in vitro***

Para os experimentos nos métodos biofísicos foram utilizados os epitélios formados na placa V, ou seja, aquela onde a solução de papaína 0,2% (p/v) foi colocada em contato com colônias de 15 dias de confluência.

Estes foram lavados em água destilada, secos em papel de filtro quantitativo e prensados em um sanduíche de lâminas de vidro. Procedeu-se a armazenagem em dessecador a temperatura ambiente até o momento do uso.

Estas amostras foram utilizadas para os experimentos com espectroscopia fotoacústica (PAS), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR FT-IR), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman).

### **4.2.2.2 Preparação do Estrato Córneo**

A pele humana, obtida de cirurgia plástica de redução de abdômen (mulher, branca, 26 anos), foi limpa com auxílio de uma tesoura e solução fisiológica, de tal forma a retirar o máximo de camada adiposa e derme, a fim de facilitar a ação da dispase ("Neutral protease from *Bacillus polymyxa*" Grade II – Boehringer Mannheim).

A membrana foi armazenada em meio de cultura celular DMEM, em geladeira "overnight". Esta foi cortada em 14 pedaços de 2 x 2 cm (4 cm<sup>2</sup>) e colocada em duas placas "multiwell" de seis poços e duas placas de 60 mm de diâmetro sendo então adicionado uma solução de dispase 2,5 mg mL<sup>-1</sup> com 0,01% (p/v) penicilina + estreptomicina em cada poço, de forma a cobrir totalmente a amostra de pele. As placas foram incubadas em estufa 37 °C por 8 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente as amostras foram



colocadas em geladeira 4 °C “overnight” e novamente em estufa 37 °C por mais 8 horas. Após a retirada de toda a derme foi adicionado 1,0 mL de uma solução de papaína 0,2% (p/v)+ cisteína 0,04% (p/v) em Meio KGM sem EGF, previamente filtrada, no estrato córneo. Após os períodos pré-estabelecidos de 4 horas, 24 horas e 48 horas as amostras em duplicata, além do controle sem tratamento, foram retiradas, limpas em solução fisiológica e armazenadas em solução de formol 4% (p/v).

As amostras foram lavadas em água destilada, secas com papel de filtro quantitativo, prensadas entre duas lâminas de vidro e armazenadas em dessecador, a temperatura ambiente, até o momento do uso.

Estas amostras foram utilizadas para os experimentos com espectroscopia fotoacústica (PAS), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR FT-IR), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman).

### **4.2.3. Técnicas Biofísicas**

#### **4.2.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Os experimentos foram realizados no laboratório de Caracterização de Polímeros do Instituto de Química da USP. Na técnica do DSC, a amostra de estrato córneo de aproximadamente 2 mg de massa seca foi selada em um compartimento denominado “célula de amostra” ou cadinho semi-hermético. As amostras foram submetidas as condições descritas a seguir utilizando-se o equipamento DSC 10 – Differential Scanning Calorimeter – TA Instruments.

Condições do experimento da calorimetria exploratória diferencial (DSC):

- Temperatura inicial: 25,00 °C
- Rampa de resfriamento: 20,00 °C min<sup>-1</sup> a 0 °C

- Isoterma: 5 min
- Rampa de aquecimento: 10,00 °C min<sup>-1</sup> a 150 °C
- Rampa de resfriamento: 20,00 °C min<sup>-1</sup> a 0 °C
- Isoterma: 5 min
- Rampa de reaquecimento: 10,00 °C min<sup>-1</sup> a 160°C
- Temperatura final: 25,00 °C

As temperaturas de transição foram determinadas considerando-se os valores máximos endotérmicos dos picos observados nas curvas de aquecimento. As curvas de aquecimento foram construídas plotando-se os valores de fluxos de calor, que foram normalizados usando-se a massa da amostra (W/g) por temperatura.

#### ***4.2.3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR FT-IR)***

Na determinação pelo ATR FT-IR, as amostras de estrato córneo e epiderme cultivada foram mantidas em dessecador a temperatura ambiente. A amostra foi colocada sobre um suporte apropriado para ATR. Durante o período de coleta de dados, 20 espectros foram medidos com resolução de 8 cm<sup>-1</sup>. Espectrômetro FT-IR Nicoletti 5ZDX. Os experimentos foram realizados no laboratório de Química Supramolecular do Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da USP.

#### ***4.2.3.3 Espectroscopia fotoacústica no infravermelho (PAS)***

Na técnica de espectroscopia fotoacústica a amostra, cortada de forma a preencher todo o fundo da célula, foi colocada na célula fotoacústica (Modelo MTEC 200). Em cima da amostra colocou-se uma tela de metal, de forma a evitar que esta se desloque durante a purga com gás hélio. Passa-

se um fluxo de hélio durante 2 minutos na câmara para que sejam arrastadas as moléculas de vapor de água e de CO<sub>2</sub>. Após selar a célula fotoacústica, faz-se vácuo no espectrofotômetro e as varreduras, as quais foram controladas pelo programa BOMEM PCDA.

Como referência, foi utilizado um composto de borracha com negro de fumo, a fim de obter espectros de referencia e as condições sob as quais o experimento foi realizado estão descritas a seguir:

- Amplificador: Ganho 4
- Resolução: 4 cm<sup>-1</sup>
- Número de varreduras: 64
- Apodização: Hamming
- Faixa espectral: 400-4000 cm<sup>-1</sup>
- Abertura: 10 mm
- Velocidade do espelho móvel: 0,05 cm s<sup>-1</sup>

Os experimentos foram realizados no laboratório de Caracterização de Polímeros do Instituto de Química da USP.

#### **4.2.3.4 Espectroscopia Raman com transformada de Fourier - FT-Raman**

As amostras destinadas à análise com espectroscopia Raman foram colocadas no compartimento de amostra. Foram obtidos 4000 varreduras correspondentes aos espectros das amostras, utilizando o FT Raman - BRUKER RFS 100/S, software OPUS.

As condições do experimento foram as seguintes:

- Potência do laser: ~ 300 mW
- Resolução: 4 cm<sup>-1</sup>

- Ganho: 4
- Abertura: 7 mm
- Os dados foram salvos entre 3500 a  $-1000\text{ cm}^{-1}$

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

#### **4.2.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão**

A pele humana obtida de cirurgia plástica de redução de mama, (paciente branca, 32 anos) foi limpa e cortada em pedaços de  $2\text{ cm}^2$  e colocadas em placas de 6 poços (60mm) imersas em meio de cultura celular (KGM). A área de contato da pele que foi submetida ao tratamento com papaína 0,2% (p/v) e cisteína 0,04% (p/v), foi delimitada com o auxílio de anéis de aço inoxidável com bisel com  $1,96\text{ cm}^2$  de diâmetro, previamente esterilizados. As amostras foram expostas por 4, 24 e 48 horas a papaína. Ao final de cada período, a solução de papaína foi aspirada, o anel retirado e a pele recortada, deixando apenas a área de contato, que foi lavada em água Milli Q e armazenada em 5 mL de fixador Karnovsky.

Em paralelo foi feito o controle, onde ao invés da solução de papaína foi adicionado apenas o meio de cultura celular.

A fim de verificar se ocorria a recuperação das estruturas da pele após a exposição a papaína, o procedimento acima foi utilizado para amostras de pele nos tempos de exposição de 4 e 24 horas, porém após este período, a solução de papaína foi aspirada e sobre a área delimitada foi adicionado meio de cultura celular, permanecendo este até o término do experimento, isto é, ao final das 48 horas.

A preparação das amostras para a microscopia eletrônica de transmissão seguiu o protocolo do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB III).

As amostras, após o período de exposição a papaína, foram lavadas e imersas em 5,0 mL de fixador Karnovsky, por 16-18h, sendo mantidas a temperatura ambiente. Após a fixação, o material foi lavado em tampão 0,1M, pH 7,4 por 3 vezes, já que o fixador se combina e reduz o OsO<sub>4</sub> (tetroxido de ósmio) produzindo um precipitado ao nível do tecido. O segundo fixador usado foi o OsO<sub>4</sub>, a 2%, ficando as amostras imersas por 2 horas.

Foi realizada lavagem com solução salina por 3 vezes, seguida do uso de um terceiro fixador, o acetato de uranila 0,5% por 36 horas. A lavagem prévia do material com solução salina é necessária, pois o tampão precipita a solução de uranila.

Após este período e uma nova lavagem do material com solução salina por 3 vezes, iniciou-se a desidratação, passando o material por uma série crescente de etanol.

- etanol 70%	15 minutos
- etanol 80%	15 minutos
- etanol 90%	15 minutos
- etanol 95%	15 minutos
- etanol 100%	15 minutos (4 vezes)
- óxido de propileno	15 minutos (2 vezes)

Depois do último banho de óxido de propileno, iniciou-se a infiltração de resina, sendo a proporção de 1:1 de óxido de propileno e resina. Colocou-se no misturador rotatório, "overnight". Essa mistura foi trocada por resina pura e deixada no misturador por 4 horas. Ao final deste período, a resina foi novamente trocada por resina pura e as amostras foram incubadas em estufa a 37 °C, por 1 hora. Ao término deste período foi feita a inclusão, onde o material foi incubado em estufa a 60 °C por 5 dias, para a polimerização da resina.

A resina utilizada foi a "Spurr", uma resina de baixa viscosidade o que facilita sua penetração em diversos tecidos. A composição desta é: VCD (dióxido de vinilciclohexano) 10 g; DER (resina epóxi) 6 g; NSA (anidrido nonenil succínico modificado) 26 g; DMAE (dimetilaminoetanol) 0,4 g. A resina é o VCD, o DER é utilizado como flexibilizante, o NSA como agente de dureza e o DMAE como acelerador que governa a velocidade da reação.

Após a polimerização, os blocos foram trimados, isto é foi retirado o excesso de resina, o que possibilita melhores cortes. Foram feitos cortes semi-finos, com o ultramicrotomo (Leica Instruments, Leica ultracut UCT), com faca de vidro. Os cortes foram fixados com clorofórmio, o qual foi evaporado em chapa quente e em seguida, estes foram corados com azul de toluidina.

Estes cortes semi-finos foram observados em microscópio óptico, fotografados e analisados, com o intuito de separar o material para a realização dos cortes ultra-finos. Estes cortes foram feitos com a lâmina de diamante, os mesmos foram colocados sobre grades de 200 mesh, contrastados com uma solução alcoólica de acetato de uranila 4%, por 30 a 40 minutos, foram lavados com etanol e água e em seguida com citrato de chumbo por 3 minutos, sendo então realizada uma última lavagem com água.

Os cortes ultrafinos foram observados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010, fotografados em filme Kodak Electron Microscope – Estar thick base 4489, 100, 8,3 x 10,2 cm e gravados em computador, no laboratório de Microscopia Eletrônica do ICB I.

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Anatomia do ICB /USP Biomédicas III.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Recentemente, o conhecimento sobre a bioquímica e a fisiologia do estrato córneo vem sendo amplamente pesquisado. Tanto sua função barreira, quanto o processo de descamação, necessário para a manutenção da mesma, têm sido elucidados. Todos os esforços são dirigidos de forma a tornar o processo de permeação cutânea de substâncias ativas, mais eficiente e controlado.

Esta via de aplicação, de medicamentos ou cosméticos, é cada vez mais importante. Os efeitos adversos são menores, no caso de medicamentos e, para cosméticos, é a via de escolha. Estes últimos exigem atualmente comprovação de sua inocuidade e eficiência, sendo esta muito dependente da penetração nas camadas mais profundas da pele ou retenção na superfície do estrato córneo.

RHEINWALD & GREEN (1975a, 1975b, 1977) desenvolveram protocolo próprio de cultura de queratinócitos a partir de células isoladas introduzindo modificações importantes nos sistemas de culturas propostos até então, entre os quais o cultivo dos queratinócitos humanos sobre camada de fibroblastos 3T3 murinos irradiados, que se comportavam como camada de sustentação ("feeder layer"), e a adição do Fator de Crescimento Epidérmico ("epidermal growth factor" ou EGF) ao meio de cultura. A combinação dessas propostas permitiu estabelecer método onde queratinócitos isolados com potencial clonogênico multiplicavam-se e podiam ser utilizados em culturas secundárias, terciárias, etc.

Cultura celular implica que o tecido ou o crescimento de um explante primário foi disperso mecanicamente ou enzimaticamente em uma suspensão de células, que então serão cultivadas em monocamada aderente ou em um substrato sólido, ou como uma suspensão em meio de cultura.

Ao analisarmos a composição do meio de cultura utilizado no cultivo de queratinócitos (**Material e Métodos 4.2.1.2**), verificamos a presença de vários compostos. A hidrocortisona é essencial para manutenção do crescimento, da morfologia da colônia e da diferenciação quando os queratinócitos estão em subculturas e pode também prevenir a deterioração



da camada de sustentação de 3T3. A toxina colérica, através do aumento dos níveis de AMP cíclicos, parece controlar a tendência dos queratinócitos em aumentar o tamanho celular assim retardando a diferenciação terminal. O fator de crescimento epidermal (EGF – epidermal growth factor) é muito mais potente em culturas derivadas de doadores recém-nascidos e parece antagonizar os efeitos de multiplicação nos centros das colônias de queratinócitos através da estimulação da migração dos queratinócitos em crescimento para a borda das colônias. O EGF parece se opor a diferenciação terminal e aumentar o tamanho da população clonogênica em divisão através de um mecanismo diferente da toxina colérica e os efeitos destes dois agentes juntos é superior ao de cada um sozinho (FRESHNEY, 1992).

Juntos a hidrocortisona, toxina colérica e EGF aumentam a fração clonogênica, a velocidade de crescimento da cultura e o tempo de vida das colônias de forma que, um grande número de colônias pode ser obtidos rapidamente, partindo-se de um pequeno pedaço de pele biopsiada. A insulina e a triiodotironina reduzem a necessidade de soro de 20% para 10% de forma que lotes de soro pobres em nutrientes podem aumentar a velocidade de crescimento (FRESHNEY, 1992).

Após a primeira sub-cultura, ou passagem, a cultura primária pode ser propagada e sub-cultivada várias vezes. A cada passagem os componentes da população com maior capacidade de proliferação irão predominar e gradualmente, aquelas células mais lenta ou não proliferativas irão ser eliminadas. A sub-cultura mantém as células sempre em baixa densidade de crescimento, preservando seu fenótipo normal (FRESHNEY, 2000).

A cada repique da sub-cultura esta será idêntica, e as características da linhagem podem ser perpetuadas através de várias gerações. Já que as replicatas são virtualmente idênticas, a necessidade de análise de variância estatística é reduzida (FRESHNEY, 2000).

Confluência é definida quando toda a área disponível para crescimento é ocupada e as células estabelecem um contato próximo umas das outras. Se as células cultivadas forem sensíveis a limitação de

densidade, ocorre parada de crescimento, porém células transformadas continuam a se proliferar (FRESHNEY, 2000).

Os resultados da "Life span" demonstraram que as células que permaneceram 24 horas em contato com a papaína apresentavam redução da duplicação celular, enquanto aquelas que estiveram 48 horas em contato com a papaína, fizeram algumas passagens a mais, inclusive quando comparadas ao controle.

A sub-cultura de células progride seguindo um crescimento característico: após atravessar a fase de latência (fase Lag), as células crescem de forma exponencial, sendo esta fase chamada de fase logarítmica (fase Log) e por fim chegam a uma fase estacionária ou fase platô. A fase log e a platô fornecem informações vitais sobre a linhagem celular, o tempo de duplicação da população (TDP) durante o crescimento celular e a densidade celular máxima alcançada na fase platô (densidade de saturação). A medida de TDP é útil para quantificar a resposta das células a diferentes inibidores ou estimulantes das culturas, tais como as variações de concentrações de nutrientes, efeitos hormonais ou substâncias tóxicas. É também um ótimo monitor da cultura durante as passagens seriais e permite o cálculo do total de células e o fator de diluição requerido para a subcultura (FRESHNEY, 2000).

Ao analisarmos os gráficos da cultura celular de queratinócitos, cultivada com papaína em diversos tempos de contato (**Figuras 32 e 37**), verificamos que a papaína quando em contato por 24 horas com os queratinócitos, apresenta um tempo de vida reduzido, isto é, ocorre menor número de duplicação. Porém ao observarmos o tempo de geração do experimento onde a papaína ficou 48 horas em contato com os queratinócitos, constatamos que o tempo de geração destas células foi maior, inclusive em relação ao controle. Isto significa que as células tratadas por 48 horas, fizeram mais duplicações que as células sem tratamento.

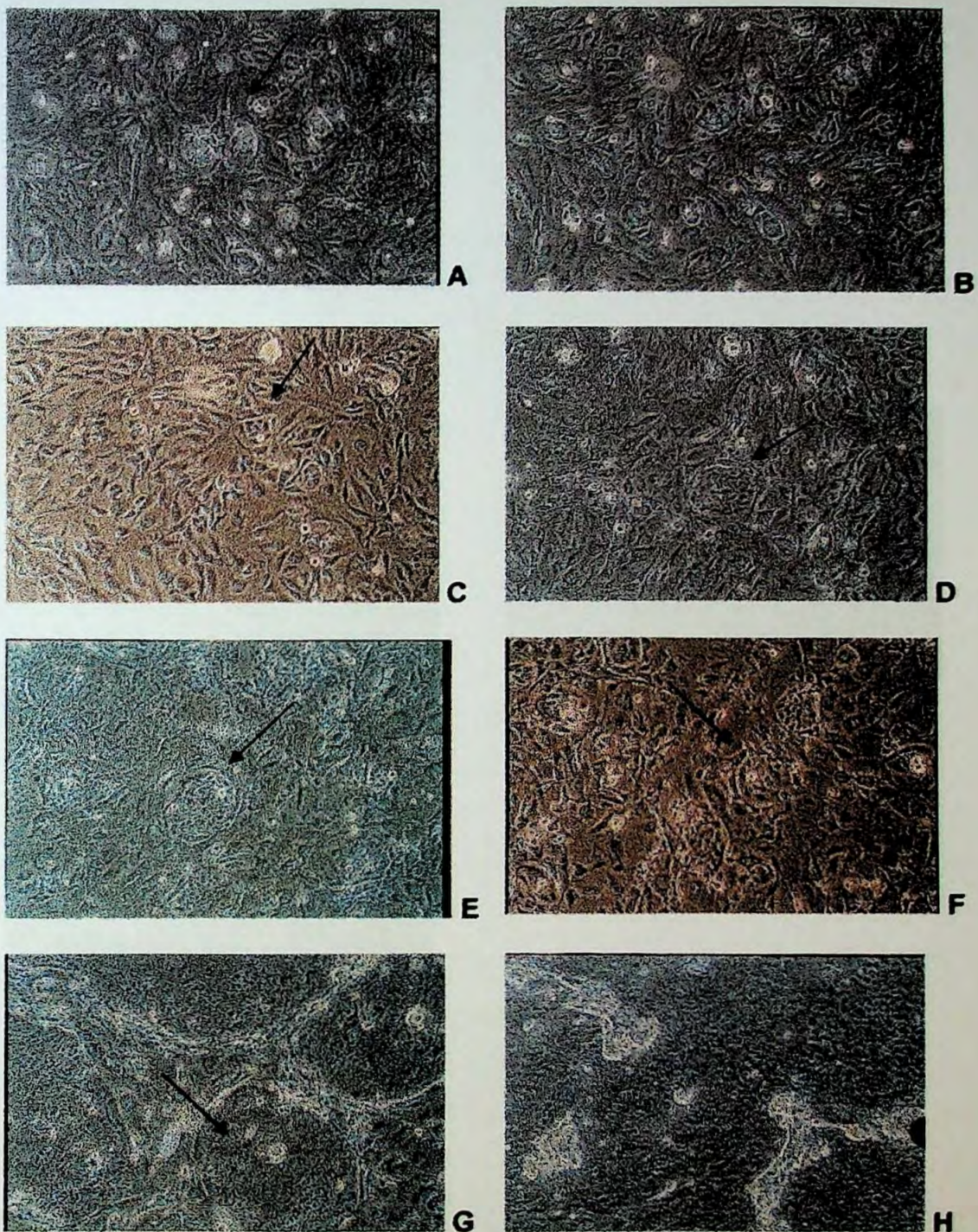
### **5.1 Influência da papaína em diversos estágios da cultura celular de queratinócitos**

Para verificar como a papaína, conhecido agente debridante de tecidos necrosados, age na pele sã, foi realizado um experimento onde esta substância foi mantida em contato com queratinócitos humanos em diferentes estágios de colônias. As expectativas eram se esta iria promover o crescimento ou matar as células.

Na **figura 8** acompanhamos o desenvolvimento dos queratinócitos sem nenhum tratamento, isto é, grupo controle, durante todo o experimento onde foi colocada a papaína em contato com as células quando estas estavam formando colônias ainda separadas, por 4, 8, 24, 48 e 56 horas, sendo **foto A** o início do experimento 1. A **foto B** nos mostra as células após 4 horas. Na **foto C (figura 8)**, após 8 horas, as colônias do controle estão pequenas, com 16 células ou mais, arredondadas, indicando que as células estão se replicando de forma normal e esperada. Não observamos diferenças marcantes entre 24 horas e 48 horas, **foto D (figura 8)** e **foto E**, respectivamente. Em ambas podemos observar várias colônias uniformes, com células pequenas, basais, indicado pela seta. Já a **foto F** nos mostra as células controle após 56 horas.

Passados 5 dias, **foto G**, podemos visualizar as células no início do segundo experimento, isto é, quando as colônias atingiram a semi-confluência, enquanto na **foto H**, observamos as mesmas colônias após 7 dias, ou seja no início do terceiro experimento, quando as colônias estavam em confluência de 1 dia. Desta forma podemos acompanhar a sequência de desenvolvimento dos queratinócitos até a não visualização de colônias separadas.



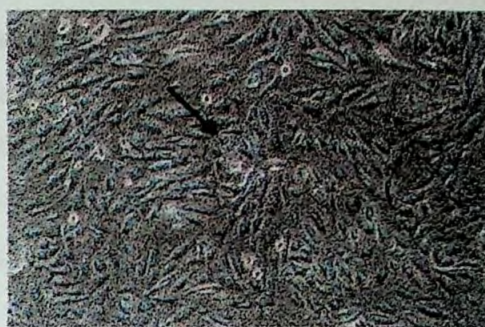


**Figura 8.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados do controle do experimento 1, **estágio de colônias separadas**. A = início; B = após 4 horas; C = após 8 horas; D = após 24 horas; E = após 48 horas; F = após 56 horas; G = após 5 dias; H = após 7 dias (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).





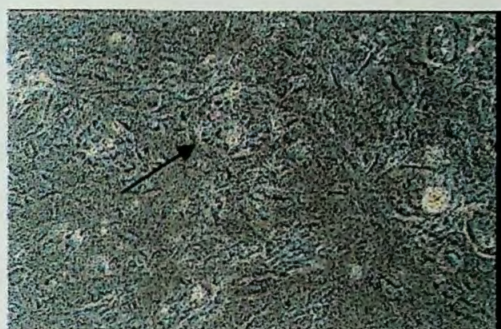
**A**



**B**



**C**



**D**



**E**

**Figura 9.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre "feeder layer" de fibroblastos 3T3 irradiados após 4 horas de tratamento com papaína 0,2% (p/v) do experimento 1, estágio de colônias separadas. A = após 4 horas; B = após 8 horas; C = após 24 horas; D = após 48 horas; E = após 7 dias (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).

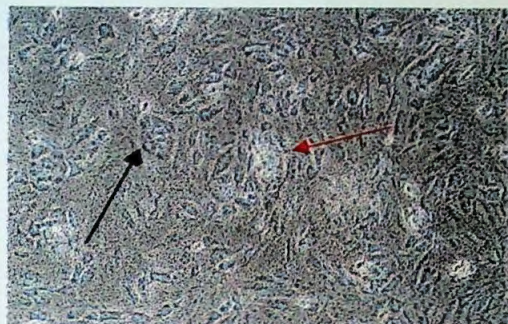
O desenvolvimento dos queratinócitos após 4 horas de contato com a solução de papaína 0,2%(p/v), é apresentado na **Figura 9**. Observamos na **foto A** as colônias após as 4 horas de contato dos queratinócitos com a substância estudada. Na **foto B**, observamos os queratinócitos após 8 horas, verificando que as colônias estavam mais separadas, com células mais diferenciadas e maiores. Algumas colônias continham 16 células e outras 8.

Na mesma figura, a **foto C**, observa-se menor número de colônias disformes, com células maiores e parcialmente diferenciadas, quando comparadas aos respectivos tempos na **figura 8**. Verificamos também que as células continuam se dividindo. Na **foto D** notamos a recuperação da duplicação celular, além de algumas células mais diferenciadas. A **foto E** retrata as colônias tratadas por 4 horas após 7 dias.

Na **figura 10** observamos as colônias separadas após 8 horas de contato com a papaína (**Foto A**). A seta vermelha mostra células mal formadas, enquanto a seta preta indica colônias bem formadas. As primeiras colônias apresentam-se aparentemente destruídas, isto é, com células disformes e maiores. Já na **foto B**, observamos estas mesmas células após 24 horas e constatamos as mesmas células maiores, já diferenciadas, dispostas em colônias disformes e em menor número, porém essas células continuam se dividindo. Notamos número elevado de colônias com 2 e 4 células, o que não acontece com o controle (**figura 8, foto D**).

A **foto C** apresenta comportamento semelhante aquele descrito para as colônias tratadas por 4 horas com papaína após 48 horas (**figura 9, foto D**), isto é, as células demonstram sinais de recuperação. Após 5 dias de experimento, estas células apresentaram colônias ainda não totalmente na semi-confluência, como podemos verificar na **foto D** desta figura.





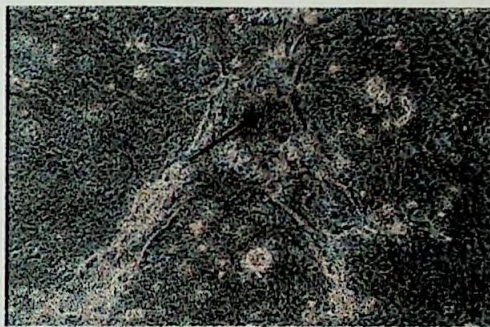
A



B



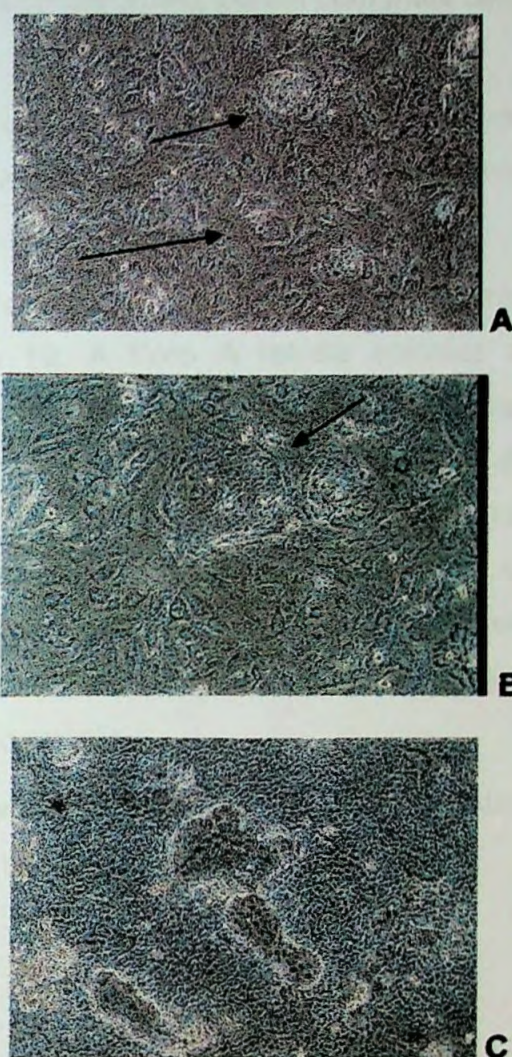
C



D

**Figura 10.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre "feeder layer" de fibroblastos 3T3 irradiados após 8 horas de tratamento com papaína 0,2% (p/v) do experimento 1, estágio de colônias separadas. A = T8 após 8 horas (colônias boas seta preta, colônias com células disformes seta vermelha); B = após 24 horas; C = após 48 horas; D = após 5 dias (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).





**Figura 11.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após 24 horas de tratamento com papaína 0,2% (p/v) do experimento 1, **estágio de colônias separadas**. A = T24 após 24 horas; B = após 48 horas; C = após 7 dias (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).

A **Figura 11** retrata as colônias separadas após 24 horas de contato com a papaína. **Foto A**, colônias disformes, algumas com 8/16 células ou 2/4 células. As células apresentam-se maiores, disformes, formando colônias grandes, porém com o mesmo número de células que no tratamento por 8 horas. Na **Foto B** verificamos que após 48 horas as

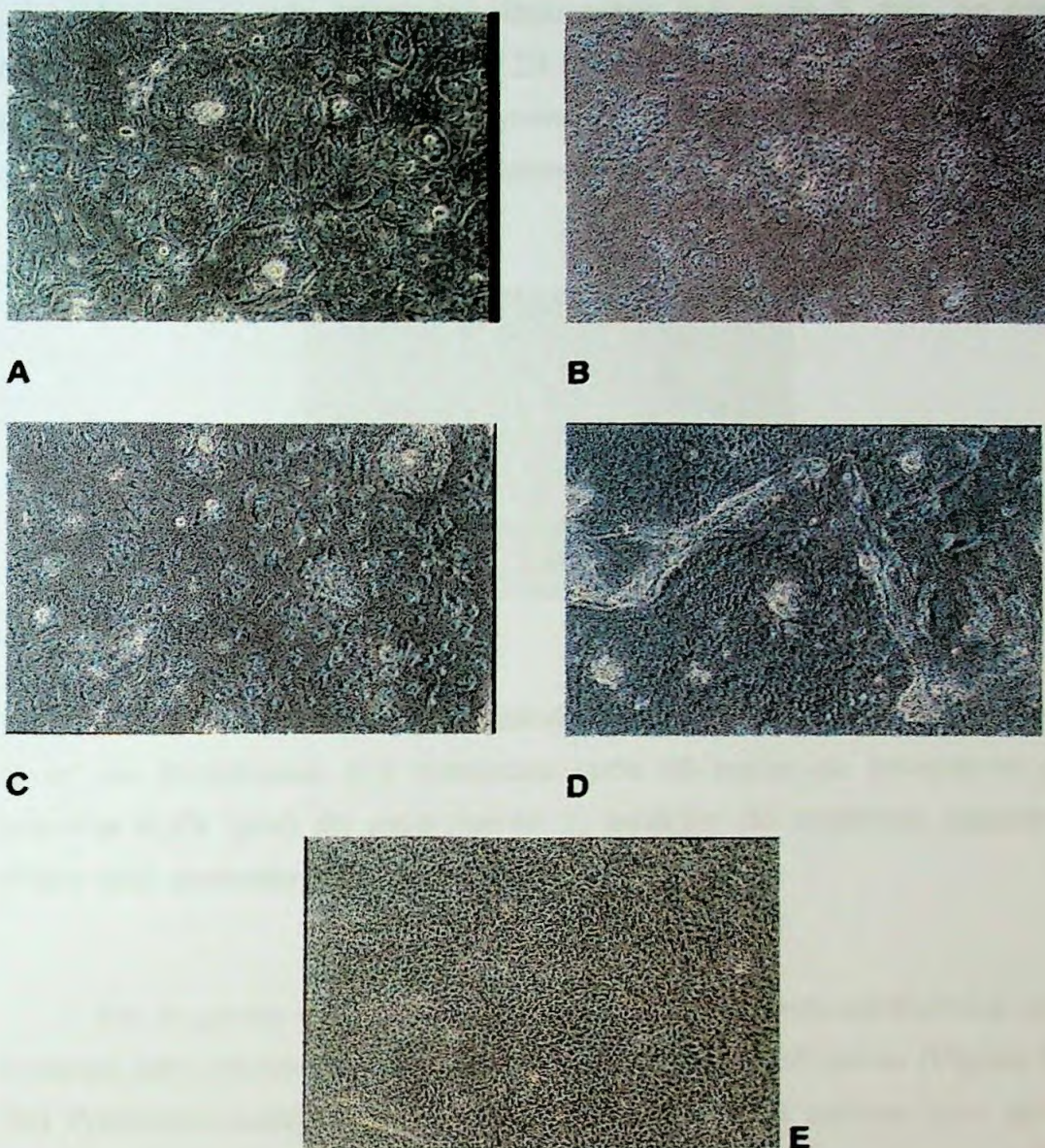


colônias estão um pouco disformes, porém com mais células que o controle (**figura 8, foto D**).

Após 7 dias de experimento, as células tratadas por 24 horas, apresentam-se confluentes, com várias formações de novas colônias (**foto C**).

O tratamento com papaína por 48 horas em colônias separadas pode ser visto na **Figura 12**. A **Foto A** retrata colônias em bem melhores condições que o controle (**figura 8, foto E**). Na **Foto B** verificamos as mesmas colônias em péssimo estado, após 56 horas de experimento. Na **foto C** não conseguimos observar colônias em semi-confluência, ou seja após 5 dias de experimento, sendo que as mesmas apresentam-se com poucas células, no máximo 16/32 células. Surpreendentemente a **foto D** nos mostra que após 15 dias, ocorreu total recuperação das colônias, inclusive com formação final do epitélio.

Após 7 dias, verificamos áreas de maior densidade celular (**foto E**), porém ainda a placa continua em semi confluência.

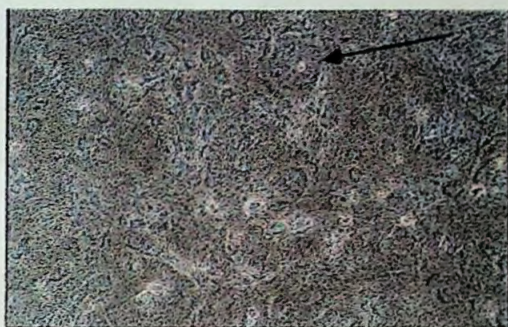


**Figura 12.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após 48 horas de tratamento com papaína 0,2% (p/v) do experimento 1, **estágio de colônias separadas**. A = T48 após 48 horas; B = após 56 horas; C = após 5 dias; D = após 7 dias; E = após 15 dias (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).

A **Figura 13** retrata o tratamento por 56 horas, onde podemos visualizar colônias maiores, um pouco disforme, porém com boa aparência.



Apesar de não retratado, observamos que após 5 dias, os poços correspondentes ao tratamento por 24 e 56 horas, apresentavam quase em semi-confluência, com células mortas em suspensão, porém nada comparado a **figura C, foto 12** do tratamento por 48 horas.



**Figura 13.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após 56 horas de tratamento com papaína 0,2% (p/v) do experimento 1, **estágio de colônias separadas** (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100)

No segundo estágio, os queratinócitos em semi-confluência foram tratados com solução de papaína por 4, 8, 24, 48 e 56 horas (**Figura 14 e 15**) Podemos visualizar na **Foto A** da **figura 14** as células logo após a colocação da papaína, na **Foto B**, as células tratadas com papaína 0,2% (p/v) após 4 horas de contato, onde podemos perceber aceleração da diferenciação no centro das colônias. Na **foto C**, as células controle após 8 horas de experimento e na **foto D**, as células tratadas após 8 horas. Na **foto E** podemos visualizar células controle após 24 horas e na **foto F**, as células tratadas por 24 horas com a papaína. As **fotos D e F** apresentam comportamento semelhante ao descrito para a **foto B**, marcado pelo aparecimento de células maiores que as do controle e mais diferenciadas e espalhadas, assim como de um maior número de células em suspensão.

Quando comparadas com as células tratadas, o controle apresentou menor número de colônias se diferenciando para 2º camada.





**A**



**B**



**C**



**D**



**E**



**F**

**Figura 14.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre "feeder layer" de fibroblastos 3T3 irradiados relativas ao experimento 1, estágio de colônias em semi-confluência. A = início; B = após 4 horas de tratamento; C = controle após 8 horas; D = após 8 horas de tratamento; E = controle após 24 horas; F = após 24 horas de tratamento (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).



Na **Figura 15** observamos os queratinócitos, o **experimento em estágio de semi-confluência**, após 48 e 56 horas de contato com a solução de papaína, e os respectivos controles. As **Foto A e C** retratam os queratinócitos controle após 48 horas e 56 horas, respectivamente.

O tratamento por 48 horas é retratado na **Foto B**, e o por 56 horas na **Foto D**. Nota-se que as colônias já estão se diferenciando, apresentando células maiores.



**A**



**B**



**C**



**D**

**Figura 15.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre "feeder layer" de fibroblastos 3T3 irradiados, experimento 1, **estágio de colônias em semi-confluência**. A = controle após 48 horas; B = T48 após 48 horas; C = controle após 56 horas; D = T56 após 56 horas (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).

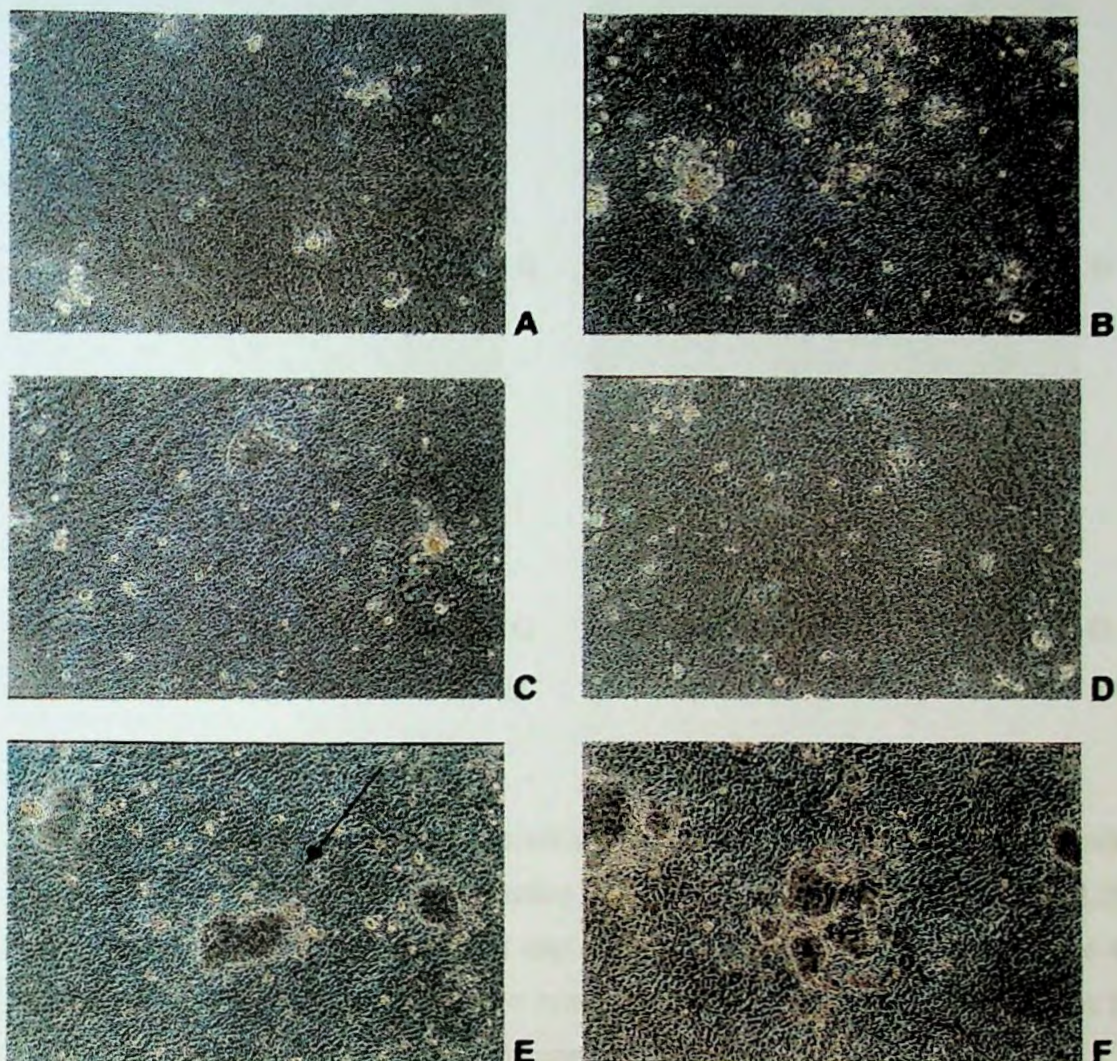
Como dito anteriormente, eram feitas trocas do meio de cultura em período de dois em dois dias. No momento da troca do meio das células controle, foi possível notar que as mesmas apresentavam formação de novas colônias, comportamento este semelhante as células tratadas por 4, 8 e 24 horas com papaína. As células correspondentes aos tratamentos por 4 e 8 horas pareciam estar em maior quantidade, principalmente aquelas tratadas por 8 horas. Aquelas tratadas por 24 horas apresentavam-se maiores e mais disformes. Interessante notar que neste momento, as células tratadas por 48 horas pareciam estar formando colônias muito semelhantes as iniciais.

No estágio do experimento onde a papaína ficou em contato com os queratinócitos em **confluência de um dia (Figura 16)** visualizamos na **Foto A** o início do experimento, onde as células encontram-se em confluência. Na **Foto B** vemos as células que estiveram em contato com a papaína por 4 horas. Estas células apresentavam-se maiores e já diferenciadas. Ao observarmos a **foto F**, estas mesmas células, após 24 horas, verificamos que estas se apresentavam em maior número. Estas células se recuperaram muito bem, com um pouco mais de células mortas em suspensão que as células sem tratamento.

Na **foto C**, observamos as células do controle após 8 horas de experimento e na **foto D** os queratinócitos que estiveram em contato com a papaína por 8 horas. Estas células não apresentam diferenças significativas com relação ao controle e ao tratamento por 4 horas.

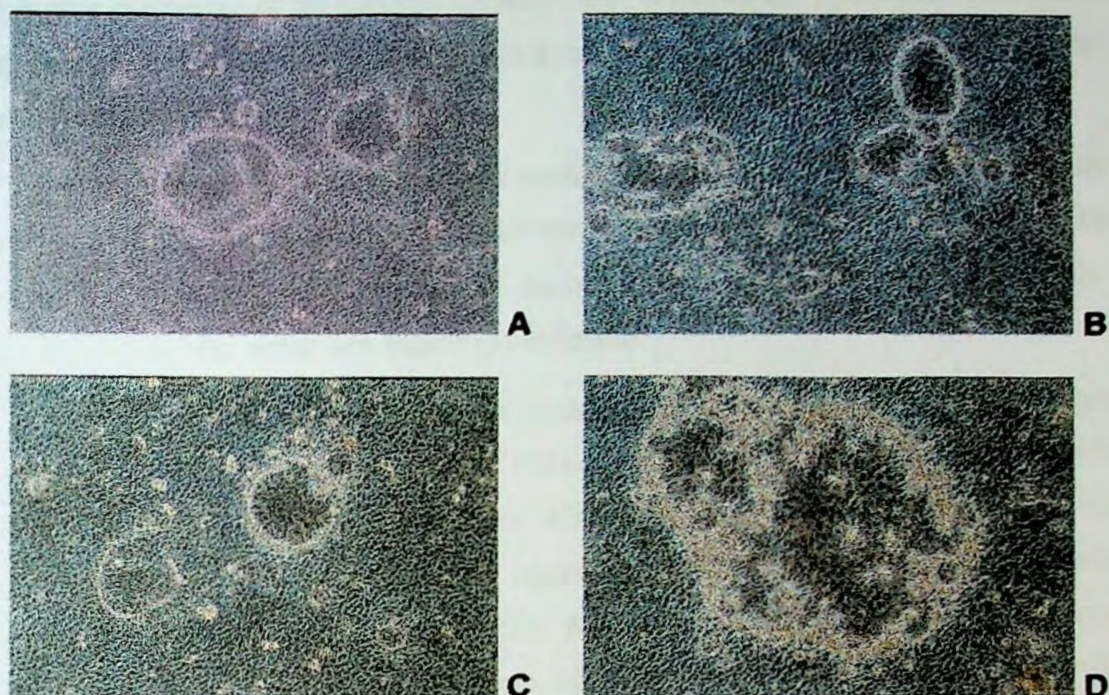
Na **foto E** observa-se que após 24 horas de experimento nas células sem tratamento iniciou-se a formação de uma nova camada.





**Figura 16.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre "feeder layer" de fibroblastos 3T3 irradiados relativas ao experimento 1, estágio de **confluência de 1 dia**. A = início do experimento; B = após tratamento com papaína por 4 horas; C = controle após 8 horas; D = 8 horas de tratamento; E = após 24 horas; F = T4 após 24 horas (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).





**Figura 17.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após tratamento com papaína 0,2% (p/v), experimento 1, estágio de **1 dia de confluência**. A = controle após 48 horas; B = T48 após 48 horas; C = controle após 56 horas; D = T56 após 56 horas de tratamento (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).

A **Figura 17** mostra as células em **estágio de confluência de 1 dia** após tratamento por 48 e 56 horas. Na **Foto A**, observamos as células sem tratamento após 48 horas de experimento e na **foto C**, após 56 horas do início do experimento. Na **foto B** da **figura 17**, observamos o tratamento por 48 horas, enquanto na **foto D**, podemos visualizar as células tratadas por 56 horas.

Observamos que ao trocar o meio de cultura após 24 horas do início do experimento, iniciou-se a formação de novas colônias e novas camadas nas placas relativas ao controle (**foto E, figura 16**). Comportamento semelhante também foi visualizado nas células tratadas por 4 horas, porém



em maior número. Já as células tratadas por 8 horas apresentavam-se mais disformes, enquanto aquelas tratadas por 24 horas estavam muito semelhantes ao controle.

Concomitantemente os poços onde seriam feitos os teste em colônias **confluentes 1 semana**, apresentavam várias colônias novas entre as células confluentes, colônias estas semelhantes em tamanho ao controle, porém parecendo estar em maior quantidade.

Já nos poços onde foram realizados os testes com células em estágio de colônias separadas, o controle, tratamento por 4, 8 e 24 horas estavam em confluência. No tratamento por 48 horas, tal comportamento não foi observado, sendo que as células apresentavam-se mais disformes, ainda com resto de camada de sustentação. No tratamento por 56 horas o mesmo acontecia. No controle havia menos células se diferenciando em segunda camada, enquanto os tratamento por 4 e 8 horas permaneciam idênticos e as células tratadas por 24 horas estavam se diferenciando mais (**figuras 8 a 13**).

Neste momento poderia estar acontecendo a seleção de paraclones, células com tempo de geração mais curto, já que apresentam-se mais diferenciadas. Este fato corrobora com os resultados obtidos nos experimentos 2 e 3, onde foi verificado a ação da papaína sobre o tempo de geração celular.

Já no experimento que utilizou queratinócitos em **estágio de semi-confluência (figuras 14 e 15)**, as colônias do controle já estavam se diferenciando, porém aquelas tratadas por 4 e 8 horas, apresentavam maior número de colônias maiores. Nos poços tratados por 48 horas, existiam mais células que naqueles tratados por 24 horas, enquanto os poços tratados por 56 horas apresentavam-se entre estes dois comportamentos, porém as células ao invés de estarem mais juntas, formando uma única camada, encontravam-se distribuídas em várias colônias agregadas.

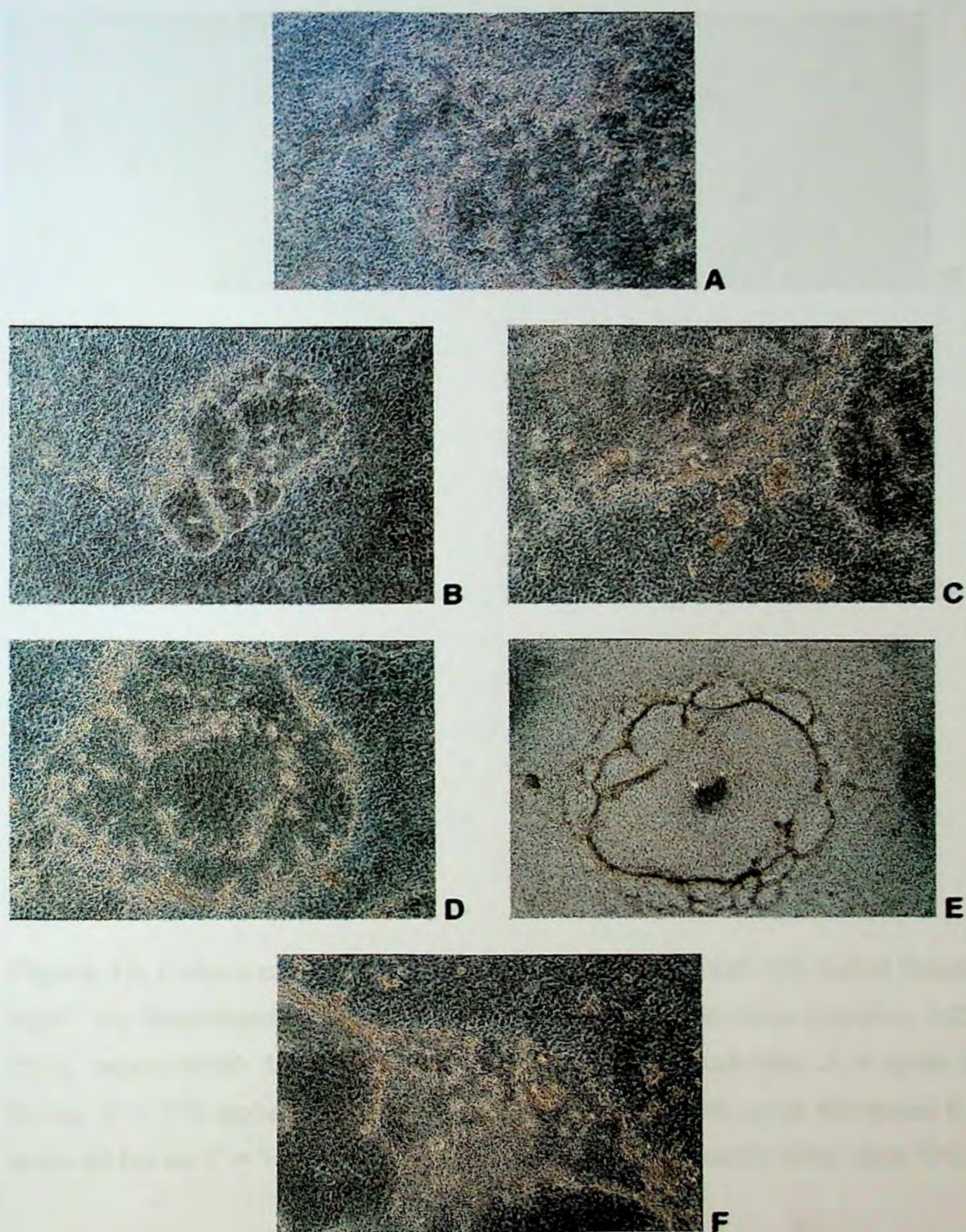
As células do experimento em **estágio de um dia confluência (figuras 16 e 17)** apresentavam controle com colônias já diferenciando em segunda camada, com células menores e mais esféricas, enquanto nos

tratamentos por 4 e 8 horas encontravam-se muito mais colônias se diferenciando, sendo que aquelas tratadas por 4 horas apresentavam maior número que as tratadas por 8 horas. Estas últimas colônias apresentavam-se com tamanhos variados, sendo a maioria colônias grandes e disformes. As células tratadas por 24 horas, encontravam-se com aspecto intermediário entre o controle e tratamento por 4 horas, comportamento semelhante apresentado pelas tratadas por 48 horas. Já o tratamento por 56 horas neste estágio encontrava-se com células maiores e disformes.

No experimento em que se utilizou cultura celular de queratinócitos em estágio de **confluência por 1 semana (Figuras 18 e 19)**, os poços onde estavam as células controle (**foto A – figura 18**) apresentavam-se como colônias já diferenciadas e grandes, inclusive já formando a segunda camada, o que é evidenciado pela aparência de bolhas. Na **foto B** observamos as células do controle após 4 horas, as quais se apresentam com bordas não descoladas e colônias menores. Na **foto C** visualizamos as células tratadas por 4 horas, onde as bordas já começavam a se soltar, apresentando células mais refringentes. Existe uma sutil diferença entre estas células e aquelas do controle, sendo que as tratadas se apresentavam maiores.

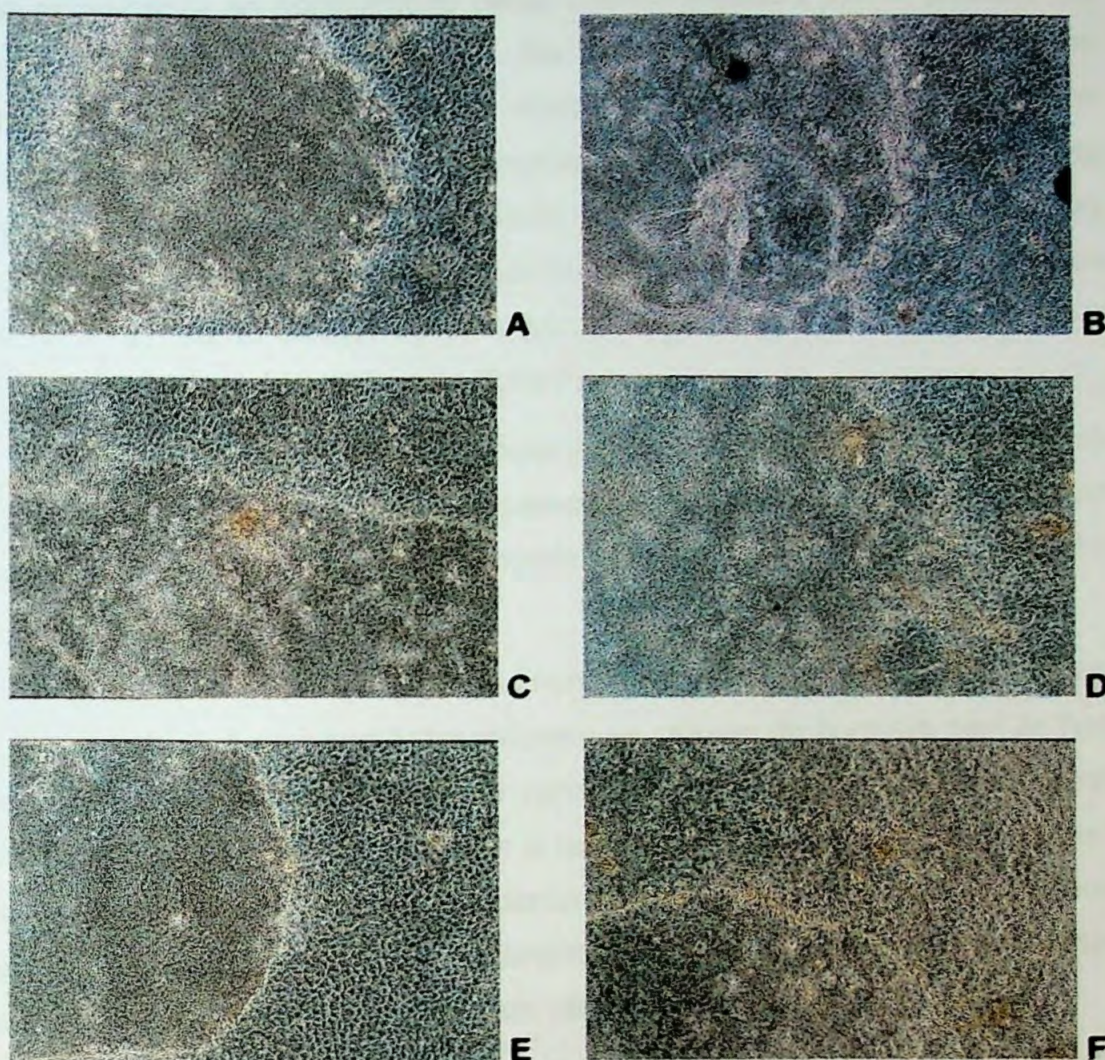
Na **foto D** visualizamos as células controle após 8 horas de experimento, com meio de cultura, enquanto a **foto E**, nos mostra a mesma região sem o meio de cultura. Na **foto F**, aparecem as células tratadas por 8 horas com papaína, e as mesmas parecem estar se soltando da camada mais superficial.





**Figura 18.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados relativos ao experimento 1, estágio de 1 semana de confluência. A = início; B = após 4 horas; C = T4 após 4 horas de tratamento; D = após 8 horas (com meio de cultura); E = após 8 horas (sem meio de cultura); F = T8 após 8 horas de tratamento (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).





**Figura 19.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados após tratamento com papaína 0,2% (p/v), experimento 1 estágio de **1 semana de confluência**. A = após 24 horas; B = T24 após 24 horas; C = após 48h; D = T48 após 48 horas; E = após 56 horas; F = T56 após 56 horas (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).

Na **figura 19** observamos na **foto A**, as células controle após 24 horas de experimento. Estas se apresentavam com bolhas menores, sendo que as células que não formaram bolhas estavam menores e mais coesas que nos demais tratamentos com papaína. Já as células tratadas por 24 horas (**foto B**) não pareciam estar muito diferentes do controle. Esperava-se que as bolhas estourassem, formando uma única camada, comportamento



este semelhante ao apresentado pelas células tratadas por 8 horas, onde existia uma bolha maior no centro. Na **foto C**, após 48 horas as bolhas continuavam menores nas placas controle. A **foto D** retrata as células tratadas por 48 horas, onde as mesmas apresentam-se formando bolhas maiores, porém em menor quantidade. Na **foto E**, após 56 horas, estas células controles encontravam-se distribuídas em poucas colônias, menores e bem feitas. Já as células tratadas por 56 horas, mostravam bolhas ainda pequenas, porém mais disformes (**foto F**).

Neste período nos outros experimentos (colônias separadas, semi-confluência e confluência de 1 dia) parecia que as células já estavam em um período de diferenciação mais avançado, mais colônias, porém menores em todos os tempos.

No início do último experimento os poços com **colônias em confluência de 1 semana** apresentavam as células do controle sem bolhas, provavelmente já com a segunda camada completa, enquanto os outros poços apresentam algumas bolhas e outros não. Os tratamentos por 4 e 8 horas apresentam bolhas, enquanto aqueles tratados por 24 horas encontravam-se diferentes. Os tratamento por 48 e 56 horas se encontravam semelhantes ao controle, porém com células mais feias.

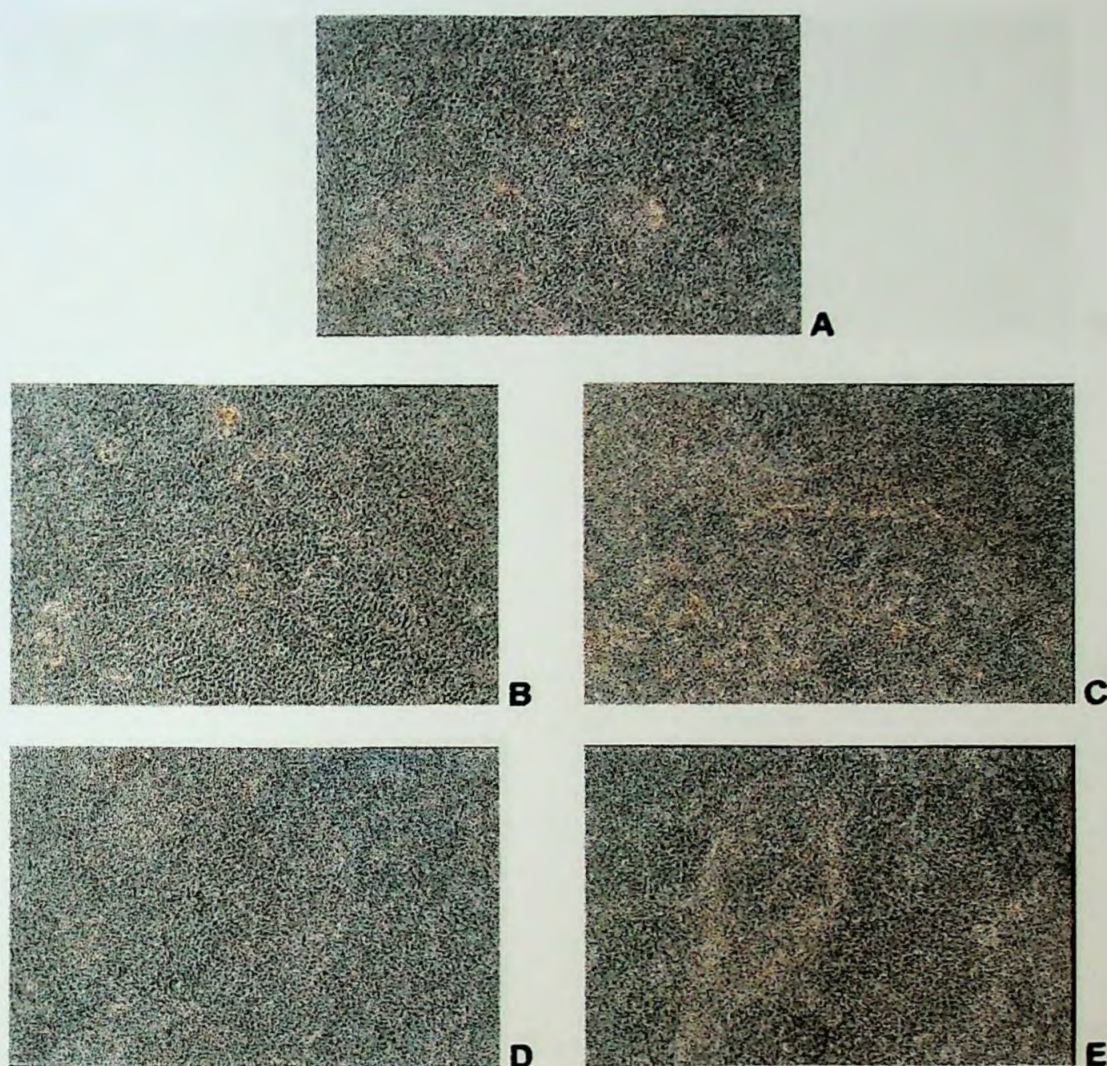
O experimento com colônias em **estágio de um dia de confluência**, o controle se apresentava sem bolhas com células mais densas. Os tratamento por 4 e 8 horas de contato, encontravam-se diferentes, com bolhas ainda. O tratamento por 24 horas estava mais próximo do controle, semelhante aos tratamentos por 48 e 56 horas, porém com células mais disformes.

Nos poços onde os queratinócitos encontravam-se em **estágio de semi-confluência** quando testados com a papaína, as células controle apresentavam-se sem bolhas, enquanto os demais tratamentos não apresentavam diferenças entre si.

Já o primeiro experimento, que utilizou células em **estágio de colônias separadas**, apresentou as células controle atrasadas em relação aos demais controles, sendo a única placa em que parecia que os

tratamento por 4, 8 e 24 horas estavam melhores. Apenas o tratamento por 48 horas, que apresentou problemas iniciais, parecia estar semelhante ao controle.

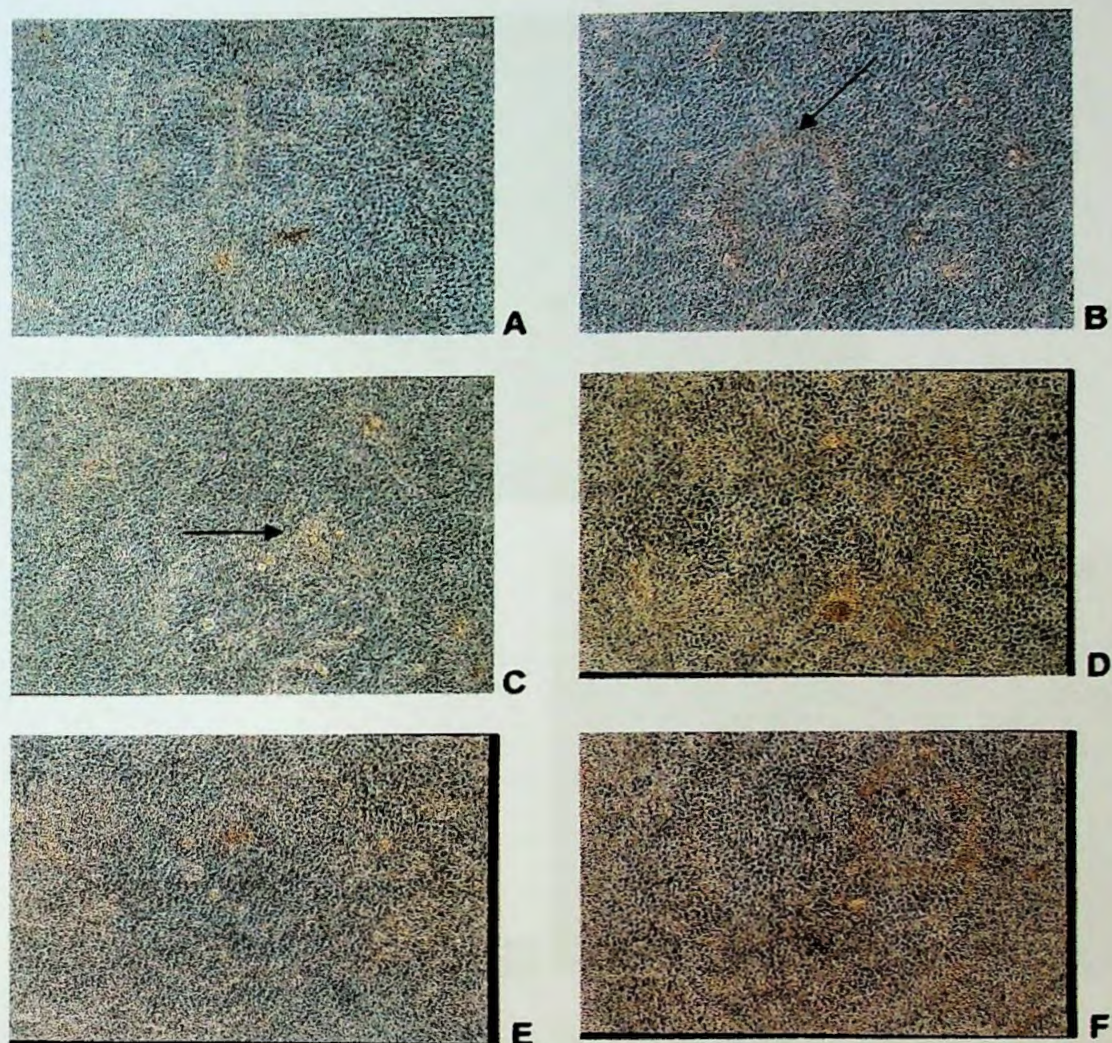
No último experimento, onde foram utilizadas colônias de queratinócitos humanos em **estágio de confluência de 15 dias (figura 20, fotos A, B e D)**, observamos que as células tratadas por 4 horas apresentavam-se com uma maior descamação de células (**foto C**), assim como aquelas tratadas por 8, 24, 48 e 56 horas. Na **foto E** foram observadas algumas estruturas diferentes, nas células tratadas por 8 horas.



**Figura 20.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre “feeder layer” de fibroblastos 3T3 irradiados relativas ao experimento 1, estágio de **15 dias de confluência**. A = controle no início; B = controle após 4 horas; C = T4 após 4 horas; D = controle após 8 horas; E = T8 após 8 horas (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).

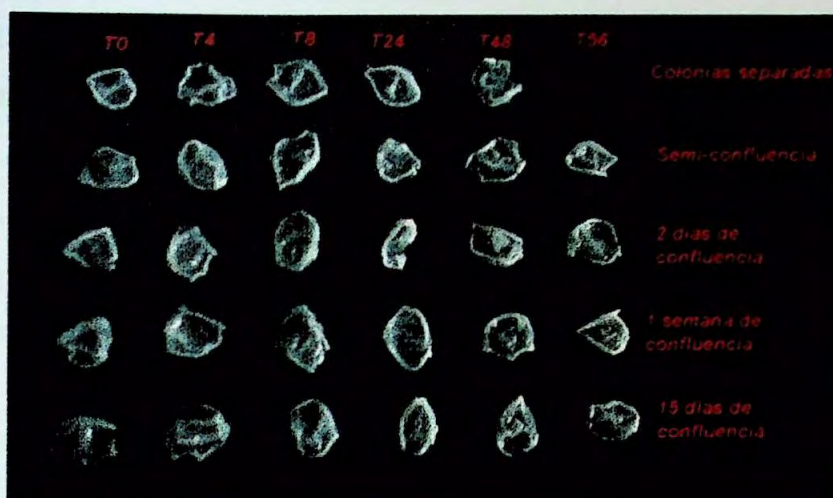
Nos poços onde foram feitos os tratamentos por 24 (**foto B**), 48 (**foto D**) e 56 horas (**foto F**), existem mais células em suspensão, além de estruturas mais diferenciadas, quando comparadas com as células controle nos intervalos de tempo correspondentes (**fotos A, C e F**), da **figura 21**.





**Figura 21.** Cultura celular de queratinócitos humanos HK 186 sobre "feeder layer" de fibroblastos 3T3 irradiados relativas ao experimento 1, estágio de **15 dias de confluência**. A = controle após 24 horas; B = T24 após 24 horas; C = controle após 48 horas; D = T48 após 48 horas; E = controle após 56 horas; F = T56 após 56 horas (Filtro azul, aumento 100x, Asa 100).





**A**



**B**

**Figura 22.** Epitélios formados após 21 dias de experimento após tratamento em diferentes tempos com papaína 0,2% (p/v) em diversos estágios da cultura celular de queratinócitos. A = todos os epitélios formados; B = Detalhe de um epitélio.

Ao final de 21 dias de experimento não foram feitas fotografias, já que os poços não apresentavam nenhuma diferença. Depois de 2 dias do término do último experimento, as membranas (figura 37, foto B), foram retiradas com dispase e armazenadas em formol 4% (v/v) (foto A).

É interessante notar que embora 24 horas de contato pareçam destruir as células, estas conseguem se recuperar, se deixadas por mais tempo em contato com a papaína. Houve formação do epitélio, após 21 dias em todos os tempos de contato, e em todos os estágios de desenvolvimento da cultura.

A fim de quantificar este tipo de alteração percebida com os resultados descrito anteriormente, foram realizados experimentos de “life span” ou de tempo de geração celular. Nesses experimentos, identificados como 2 e 3, procurou-se verificar se as transformações observadas no experimento 1 poderiam ter afetado a vida útil destas células, mensurando estas modificações.

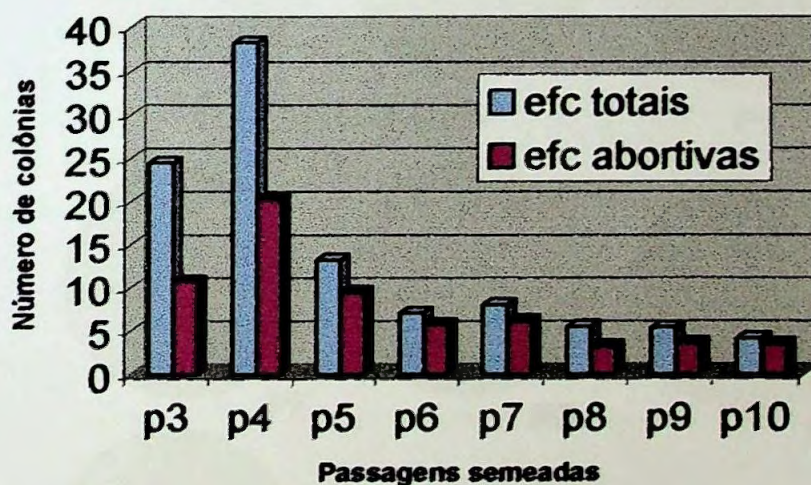


## 5.2 Determinação do tempo de vida celular – “Life Span”

**Tabela 5.** Dados relativos ao controle no experimento 1 da determinação do tempo de vida celular.

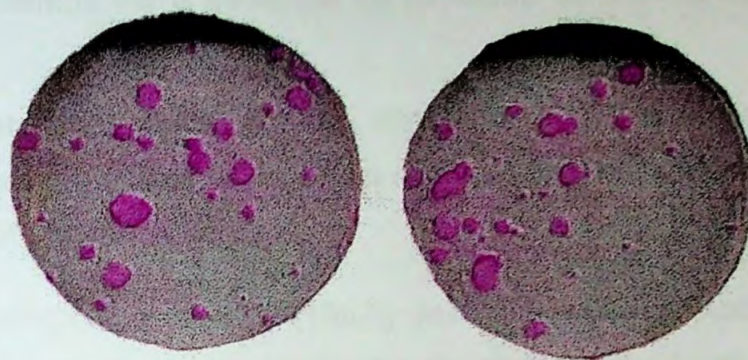
Passagem semeada (P)	Número de queratinócitos semeados por poço	Número de queratinócitos encontrados por poço	Número de queratinócitos semeados na EFC	EFC totais (%)	EFC abortivas (%)
P3	50000	955000	200	24,5	10,7
P4	49686	695000	200	38,2	20,2
P5	50000	400000	400	13,2	4,7
P6	150000	287500	600	7,0	5,7
P7	149500	375000	2875	8,0	1,2
P8	150000	387500	1170	5,5	1,6
P9	151125	312500	567	5,4	3,8
P10	150000	47500	600	4,1	3,5

\* EFC = Eficiência de formação de colônia

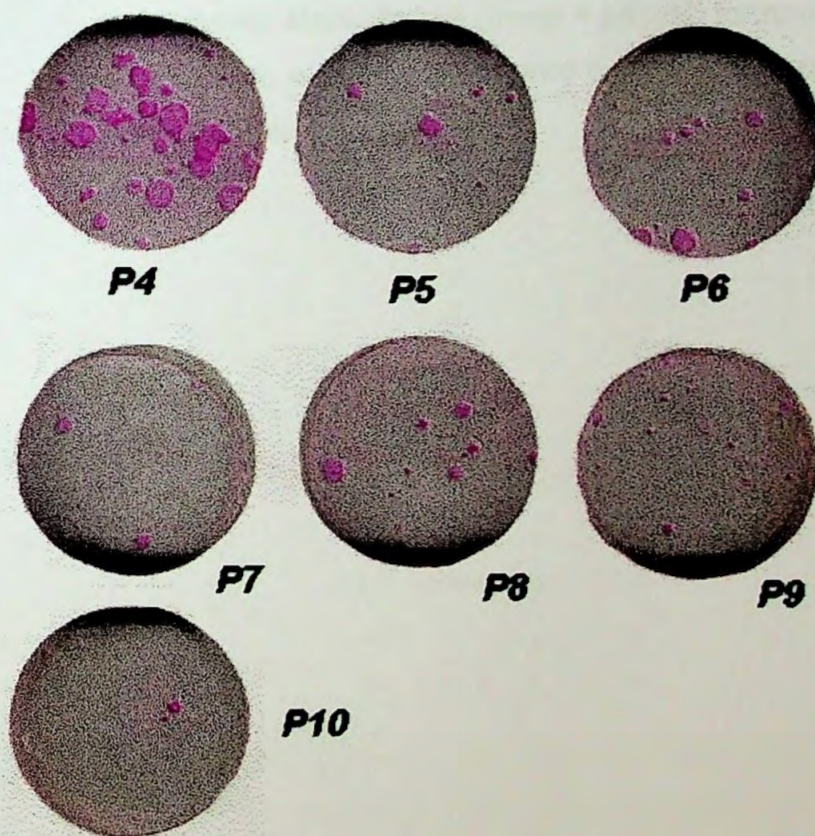


**Figura 23.** Histograma do número de colônias totais e abortivas do controle em relação as passagens semeadas no teste de EFC (Eficiência de Formação de Colônia) do experimento 2.





**Figura 24.** Colônias formadas por queratinócitos humanos HK 186 da passagem P3 do experimento 2 ("life span").



**Figura 25.** Colônias formadas por queratinócitos humanos HK 186 em diferentes passagens do controle do experimento 2 ("life span").

A figura 25 mostra a eficiência de formação de colônia (EFC), dado importante para a determinação do tempo de geração da cultura celular. Na

**figura 24** podemos ver a eficiência de formação de colônia da Passagem P3.

A **tabela 5** apresenta os dados referentes ao tempo de vida celular ou "life span" dos queratinócitos cultivados no experimento 2 sem o contato com a papaína 0,2% (p/v).

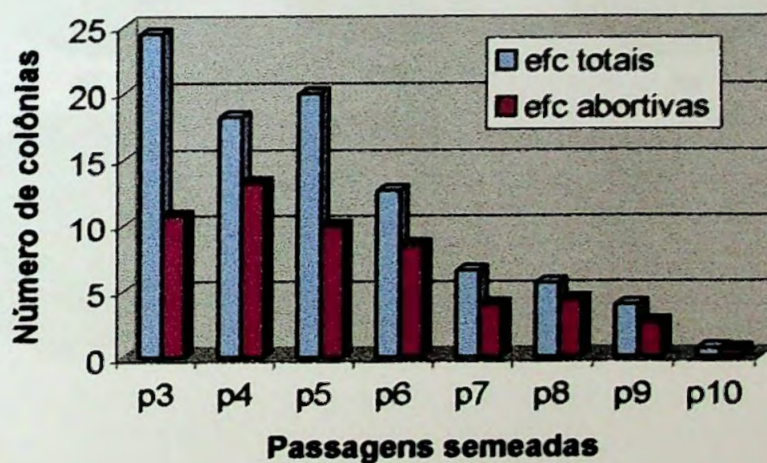
BARRANDON & GREEN (1987), descreveram um método de análise que revela o potencial de crescimento de clones individuais. Os autores demonstraram a existência de três tipos de clones de queratinócitos com diferentes capacidades de crescimento. **Holoclonos** (*holo* = inteiro) formam colônias que crescem rapidamente, sendo que menos que 5% das colônias são abortivas e diferenciadas. **Paraclones** (*para* = intermediária) são programadas para um crescimento limitado e conseqüentemente formam colônias terminais disformes. **Meroclones** (*mero* = parcial) formam dois tipos de colônias, em crescimento e terminal, portanto contém uma proporção de células que foram degradadas a paraclones.



**Tabela 6.** Dados relativos ao tratamento de 4 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 2 da determinação do tempo de vida celular.

Passagem semeada (P)	Número de queratinócitos semeados por poço	Número de queratinócitos encontrados por poço	Número de queratinócitos semeados na EFC	EFC totais (%)	EFC abortivas (%)
P3	50000	1065000	200	24,5	10,7
P4	49585	492500	200	18,2	13,2
P5	49742	640000	200	20	10
P6	153600	600000	600	12,6	8,5
P7	150000	502500	600	6,5	4
P8	150000	645000	1195	5,6	4,3
P9	150000	515000	645	3,9	2,6
P10	150000	25000	600	0,6	0,5
P11	22500	—	1200	0,3	0,3

\* EFC = Eficiência de Formação de Colônia

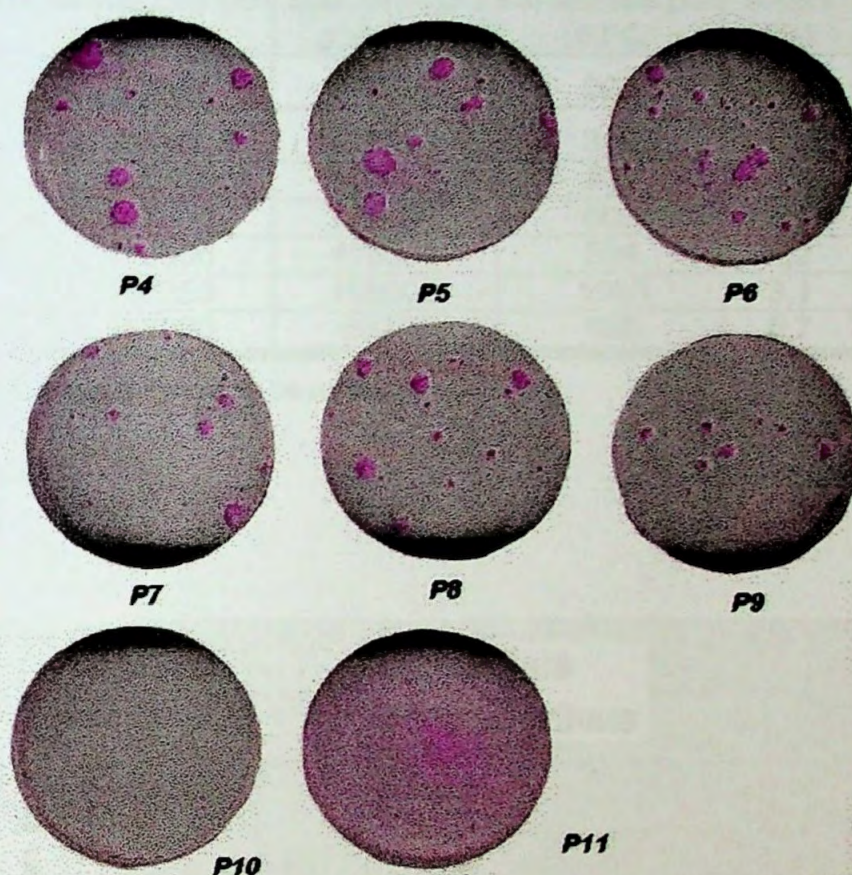


**Figura 26.** Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 4 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (Eficiência de Formação de Colônia) do experimento 2.

Podemos verificar que ocorreu uma grande diferença entre as colônias totais e abortivas na passagem 5 (figura 26). Se compararmos os dados da passagem 4 do experimento controle e o experimento em que a



papaína ficou 4 horas em contato com os queratinócitos, verificamos que esta última apresenta menor eficiência de formação de colônias, podendo indicar a ação da papaína acontece logo após o contato, porém um efeito de aumento da duplicação ocorre em resposta.



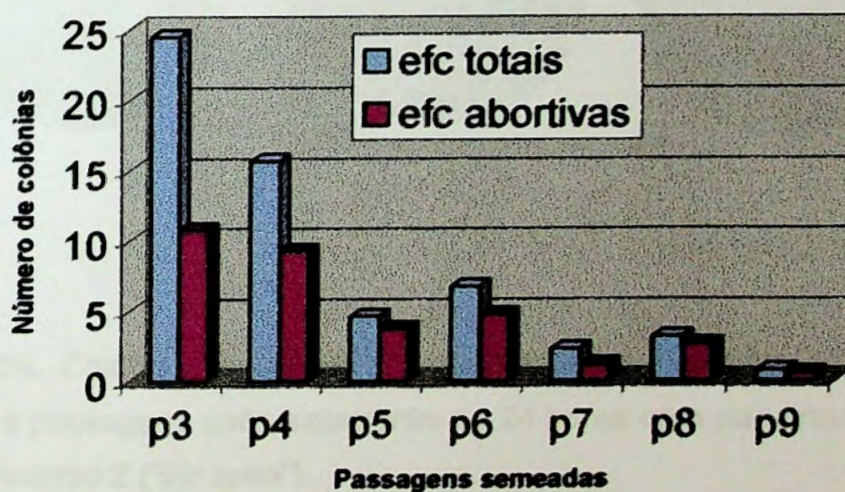
**Figura 27.** Colônias formadas por queratinócitos humanos HK 186 em diferentes passagens após tratamento de 4 horas com papaína 0,2% (p/v) do experimento 2 ("life span").



**Tabela 7.** Dados relativos ao tratamento de 24 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 2 da determinação do tempo de vida celular.

Passagem semeada (P)	Número de queratinócitos semeados por poço	Número de queratinócitos encontrados por poço	Número de queratinócitos semeados por EFC	EFC totais (%)	EFC abortivas (%)
P3	50000	623675	200	24,5	10,7
P4	49894	680000	399	15,6	9,2
P5	50000	590000	400	4,6	3,5
P6	147500	330000	600	6,7	4,7
P7	148500	478500	594	2,2	1,1
P8	146250	185000	1365	3,1	2,6
P9	148000	50000	600	0,7	0,5

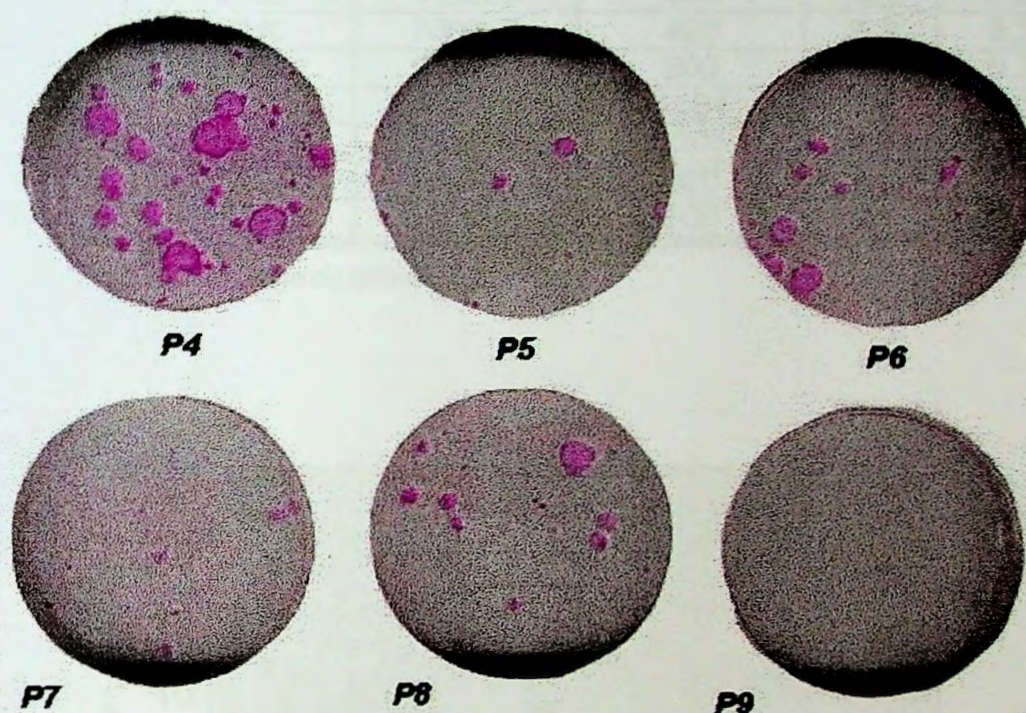
\* EFC = Eficiência de formação de colônia



**Figura 28.** Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (eficiência de formação de colônia) do experimento 2.



Quando analisamos a **figura 28**, verificamos que na passagem de P4 para P5, ocorre uma menor eficiência de formação de colônias, a mesma se mantendo baixa ao longo de todo o experimento.



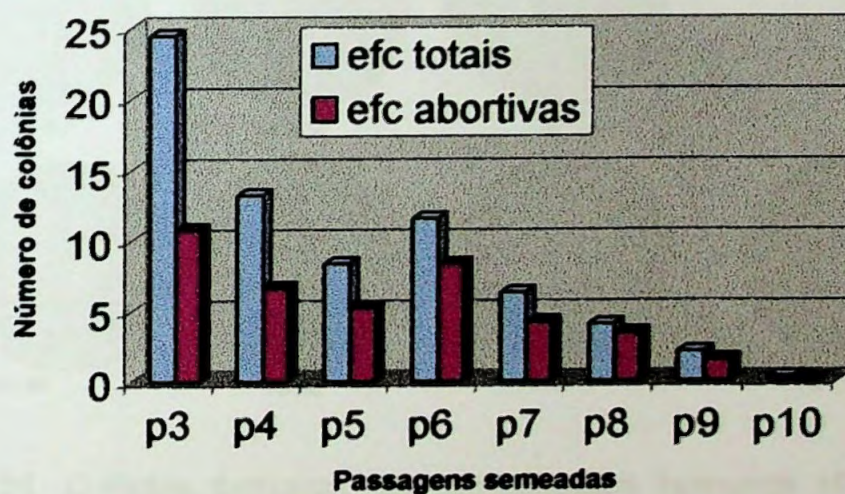
**Figura 29.** Colônias formadas por queratinócitos humanos HK 186 em diferentes passagens após tratamento de 24 horas com papaína 0,2% (p/v) do experimento 2 ("life span").



**Tabela 8.** Dados relativos ao tratamento de 48 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 2 da determinação do tempo de vida celular.

Passagem semeada (P)	Número de queratinócitos semeados por poço	Número de queratinócitos encontradas por poço	Número de queratinócitos semeados por EFC	EFC totais (%)	EFC abortivas (%)
P3	50000	775000	200	24,5	10,7
P4	50000	445000	400	13,2	6,6
P5	49840	700000	400	8,3	5,2
P6	149800	510000	600	11,5	8,3
P7	147900	702500	1194	6,3	4,2
P8	154550	295000	1205	4,0	3,4
P9	150000	262500	600	2,1	1,5
P10	150000	47500	600	0,3	0,1

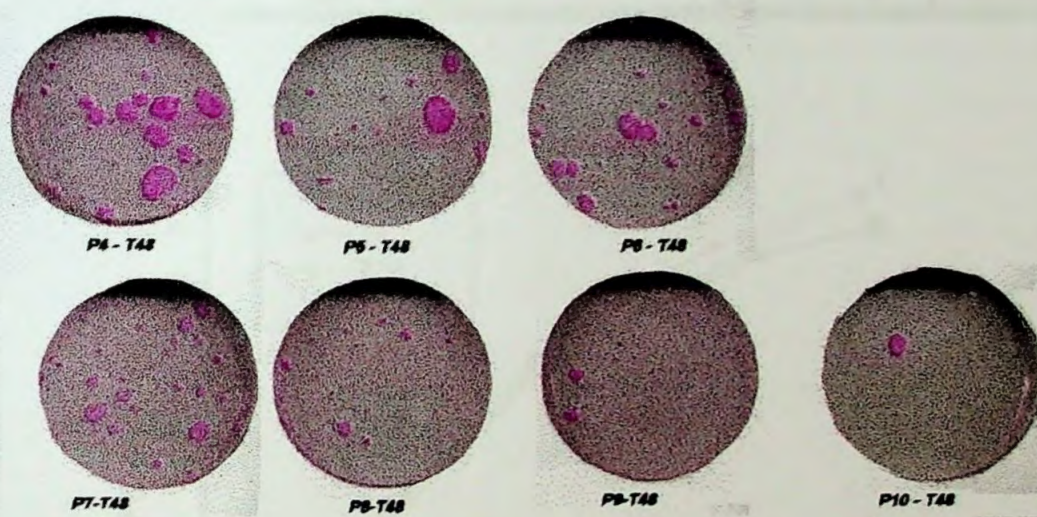
\* EFC = eficiência formação de colônia



**Figura 30.** Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (eficiência de formação de colônia) do experimento 2.



Já a **figura 30**, nos mostra a eficiência de formação de colônias no experimento em que a papaína ficou em contato com os queratinócitos humanos por 48 horas. Observamos que a relação entre colônias totais e abortivas neste experimento é maior, havendo maior número de colônias totais (**tabela 8**). Já no experimento anteriormente mencionado (**tabela 7, figura 28 e 29**), esta relação apresentava-se menos evidenciada, com maior número de colônias abortivas. Isto pode indicar que o tratamento por 48 horas com a papaína 0,2% (p/v), pode levar a seleção de holoclones, capazes de fazer maior número de replicações. O decaimento da proporção entre colônias totais e abortivas é regular e contínuo, fato este observado apenas neste tratamento.



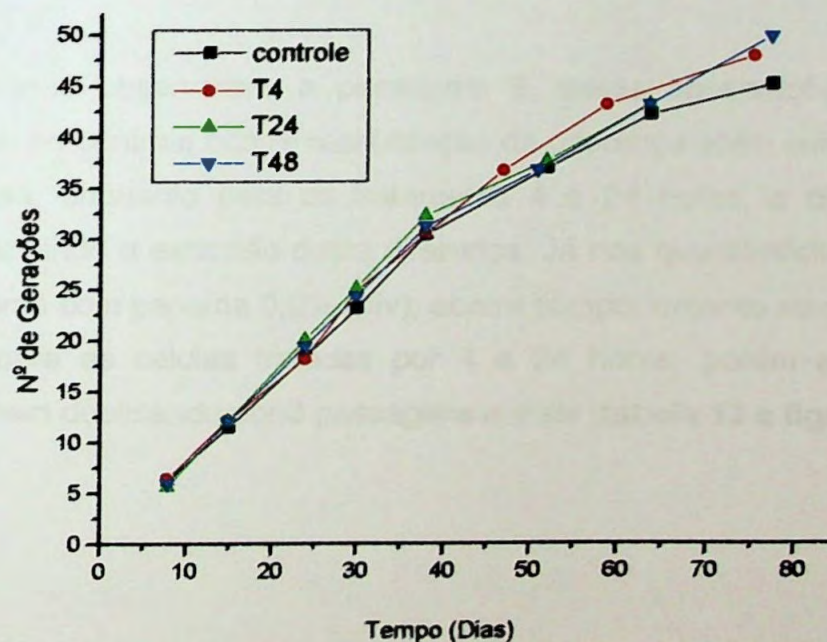
**Figura 31.** Colônias formadas por queratinócitos humanos HK 186 em diferentes passagens após tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v) do experimento 2 ("life span").

Utilizando-se a fórmula descrita no **item 4.2.1.4** de material e métodos, determinou-se o tempo de vida celular, calculando-se o número de gerações celulares para o controle e para os diferentes tempos de contato entre a papaína e a cultura celular de queratinócitos, no experimento 2 (**tabela 9**).



**Tabela 9.** Cálculo do número de gerações celulares para o controle, 4 horas, 24 horas e 48 horas de contato dos queratinócitos humanos HK 186, com a solução de papaína 0,2% (p/v) no experimento 2 da "life span".

Dias	Número de gerações do controle	Dias	Número de gerações do T4	Dias	Número de gerações do T24	Dias	Número de gerações do T48
8	6,28	8	6,44	8	5,67	8	5,98
15	11,47	15	12,20	15	12,11	15	12,05
24	18,39	24	18,21	24	20,10	24	19,44
30	23,15	30	24,78	30	25,15	30	24,32
38	30,36	38	30,45	38	32,30	38	31,18
52	36,88	47	36,71	52	37,63	51	36,74
64	42,05	59	43,15	64	43,12	64	43,13
78	44,98	76	47,79	—	—	78	49,70



**Figura 32.** Tempo de geração dos queratinócitos humanos HK 186 nos diferentes tempos de exposição a papaína 2% (p/v) e no controle. Experimento 2 da "life span".



Na **figura 32** podemos visualizar o tempo de geração dos queratinócitos humanos após diferentes tempos de contato com a papaína, comparando-os com o controle. O tempo de geração dos queratinócitos, que ficaram 48 horas em contato com a papaína, foi maior, enquanto aqueles que permaneceram por 24 horas em contato, demonstraram menor número de gerações. As células mantidas por 4 horas em contato com a papaína, apresentaram comportamento semelhante aquele descrito para as células controle, ou sem tratamento. Tal comportamento foi encontrado também no segundo experimento, representado pelas **tabela 14 e figura 37**.

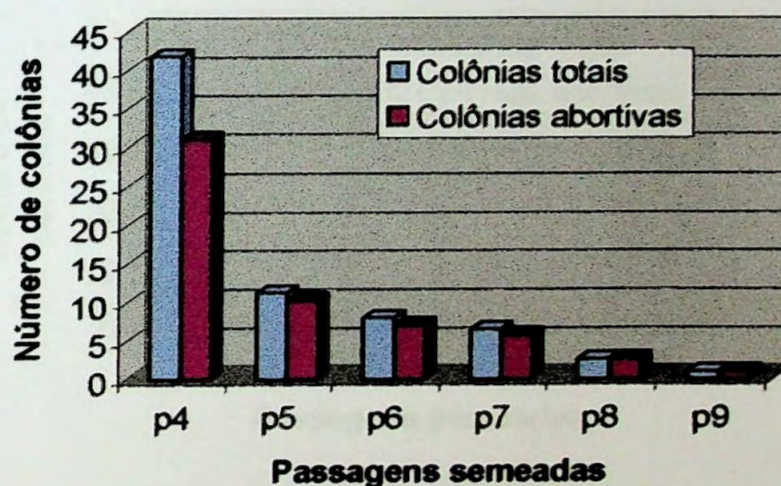
No segundo experimento podemos observar que a eficiência de formação de colônias da passagem 5 apresentou diferença constante entre colônias totais e abortivas do controle (**tabela 10, figura 33**). Já a eficiência relativa ao tratamento por 4 horas com papaína, apresentou mais colônias totais que abortivas (**tabela 11, figura 34**), enquanto nos tratamento por 24 e 48 horas, esta diferença se manteve (**tabela 12 e figura 35; tabela 13 e figura 36**).

Quando observamos a passagem 6, essas observações mudam, sendo que no controle ocorre manutenção da diferença entre colônias totais e abortivas, enquanto para os tratamento 4 e 24 horas, a diferença se estreita, levando a exclusão desta diferença. Já nos queratinócitos tratados por 48 horas com papaína 0,2% (p/v), ocorre comportamento semelhante ao descrito para as células tratadas por 4 e 24 horas, porém as mesmas permanecem duplicando por 3 passagens a mais (**tabela 13 e figura 36**).

**Tabela 10.** Dados relativos ao controle no experimento 3 da determinação do tempo de vida celular.

Passagem semeada (P)	Número de queratinócito s semeados por poço	Número de queratinócito s encontrados por poço	Número de queratinócito s semeados por EFC	EFC totais (%)	EFC abortivas (%)
P4	50000	1655000	200	41,7	31
P5	50000	340000	200	11,2	10,2
P6	50000	230000	200	8	7
P7	50600	317500	200	6,5	5,7
P8	158700	460000	1016	2,6	2,5
P9	151800	100000	2024	0,9	0,9

\* EFC = Eficiência de formação de colônia



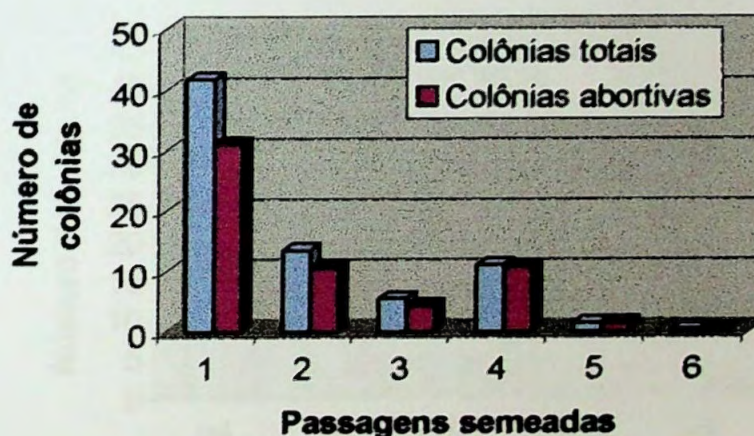
**Figura 33.** Histograma do número de colônias totais e abortivas do controle em relação as passagens semeadas no teste de EFC (Eficiência de formação de colônia) do experimento 3.



**Tabela 11.** Dados relativos ao tratamento de 4 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 3 da determinação do tempo de vida celular.

Passagem semeada (P)	Número de queratinócitos semeados por poço	Número de queratinócitos encontrados por poço	Número de queratinócitos semeados por EFC	EFC totais (%)	EFC abortivas (%)
P4	50000	982500	200	41,7	31
P5	50000	605000	200	13,5	10,5
P6	50000	442500	200	5,5	4,2
P7	50000	497500	200	11	10,7
P8	150000	217500	1000	1,4	1,4
P9	200000	97500	2000	0,3	0,3

\* EFC = Eficiência de formação de colônia



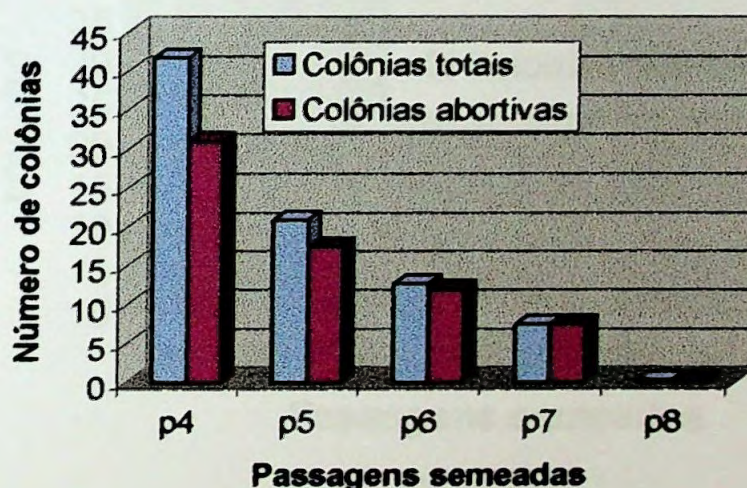
**Figura 34.** Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 4 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (Eficiência de formação de colônia) do experimento 3.



**Tabela 12.** Dados relativos ao tratamento de 24 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 3 da determinação do tempo de vida celular

Passagem semeada (P)	Número de queratinócitos semeados por poço	Número de queratinócitos encontrados por poço	Número de queratinócitos semeados por EFC	EFC totais (%)	EFC abortivas (%)
P4	50000	2060000	200	41,7	31
P5	50000	482500	200	21	17,5
P6	50000	367500	200	12,7	12
P7	50000	250000	200	7,5	7,5
P8	150000	125000	1000	0,35	0,3

\* EFC = Eficiência de formação de colônia



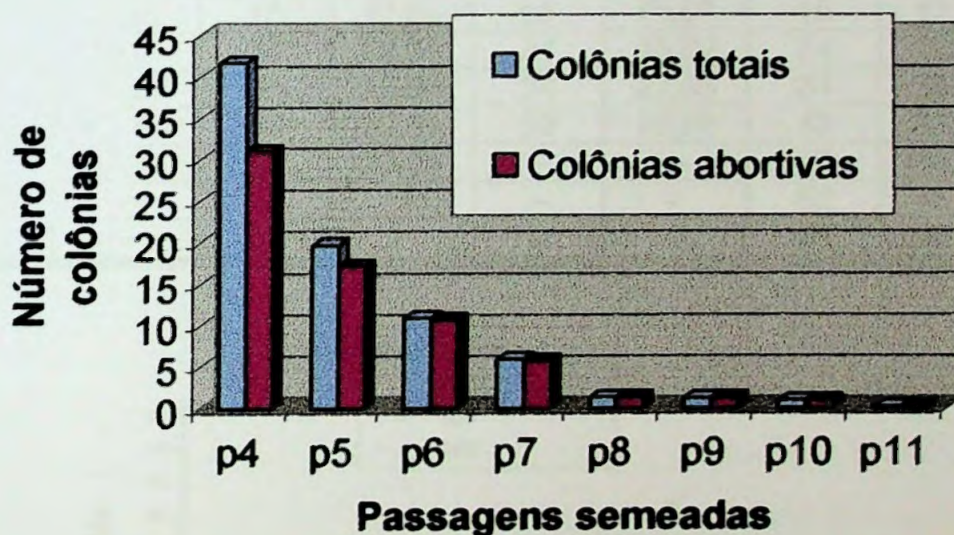
**Figura 35.** Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (eficiência de formação de colônia) do experimento 3.



**Tabela 13.** Dados relativos ao tratamento de 48 horas com papaína 0,2% (p/v) no experimento 3 da determinação do tempo de vida celular.

Passagem semeada (P)	Número de queratinócitos semeados por poço	Número de queratinócitos encontrados por poço	Número de queratinócitos semeados por EFC	EFC totais (%)	EFC abortivas (%)
P4	50000	1475000	200	41,7	31
P5	50000	747500	200	19,7	17,2
P6	50000	547500	200	11	10,7
P7	50000	347500	200	6	5,7
P8	150000	315000	1000	1,3	1,3
P9	200000	212500	2000	1,2	1,2
P10	170000	187500	3400	0,9	0,9
P11	170000	40000	5000	0,1	0,1

\* EFC = eficiência de formação de colônia



**Figura 36.** Histograma do número de colônias totais e abortivas do tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v), em relação as passagens semeadas no teste de EFC (eficiência de formação de colônia) do experimento 3.

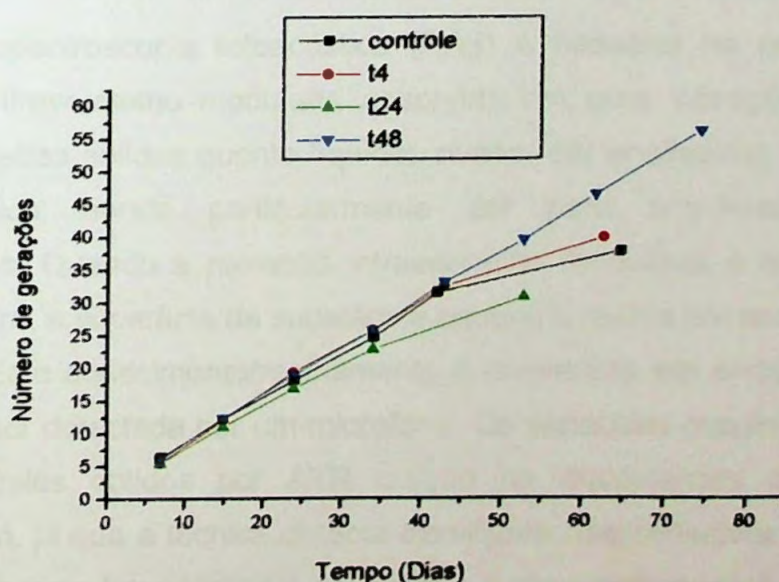
Utilizando-se a fórmula descrita no **item 4.2.1.4** de material e métodos, determinou-se o tempo de vida celular, calculando-se o número de



gerações celulares para o controle e para os diferentes tempos de contato entre a papaína e a cultura celular de queratinócitos, no experimento 3 (tabela 14).

**Tabela 14.** Cálculo do número de gerações celulares para o controle, 4 horas, 24 horas e 48 horas de contato dos queratinócitos humanos HK 186, com a solução de papaína 0,2% (p/v) no experimento 3 da "life span".

Dias	Número de gerações do Controle	Dias	Número de gerações do T4	Dias	Número de gerações do T24	Dias	Número de gerações do T48
7	6,30	7	5,55	7	5,55	7	6,14
15	12,22	15	12,04	15	11,07	15	12,38
24	18,07	24	19,37	24	16,92	24	19,02
34	24,66	34	25,87	34	22,98	34	25,87
42	31,46	43	32,51	53	30,88	43	33,16
65	37,61	63	39,86	--	--	53	39,59
--	--	--	--	--	--	62	46,49
--	--	--	--	--	--	75	56,08



**Figura 37.** Tempo de geração dos queratinócitos humanos HK 186 nos diferentes tempos de exposição a papaína 2% (p/v) e no controle. Experimento 3 da "life span".

### **5.3 Metodologias biofísicas**

As técnicas biofísicas ajudam a esclarecer os mecanismos pelos quais os promotores de absorção cutâneo promovem a penetração de substâncias ativas através do estrato córneo.

A espectroscopia ATR-FTIR utiliza o fenômeno da reflexão interna total atenuada. Um feixe de radiação infravermelha entrando em um cristal irá produzir uma reflexão interna total quando o ângulo de incidência na interface entre a amostra e o cristal é maior que o ângulo crítico. O ângulo crítico é uma função dos índices de refração do cristal em relação as duas superfícies da amostra. O feixe penetra uma fração de um comprimento de onda além da superfície refletora quando o material que absorve seletivamente a radiação está em contato próximo com a superfície refletora, então o feixe perde sua energia no comprimento de onda onde o material absorve. A radiação atenuada resultante é medida e plotada como uma função do comprimento de onda pelo espectrômetro fornecendo as características de absorção espectral da amostra (STUART, 1997).

A espectroscopia fotoacústica (PAS) é baseada na conversão de radiação infravermelho modulada absorvida em uma vibração mecânica. Tanto amostras sólidas quanto líquidas podem ser analisadas utilizando-se esta técnica, sendo particularmente útil para amostras altamente absorventes. Quando a radiação infravermelho modulada é absorvida por uma amostra, a superfície da substância aquece e resfria em resposta a esta radiação. Este aquecimento/resfriamento é convertido em onda de pressão que pode ser detectada por um microfone. Os espectros resultantes diferem tanto daqueles obtidos por ATR quanto os decorrentes do modo de transmissão, já que a técnica detecta transições não radiativas da amostra. A espectroscopia fotoacústica é útil porque o sinal detectado é proporcional a concentração da amostra e pode ser utilizado em amostras escuras ou altamente absorventes. Esta técnica detecta principalmente material na superfície ou uma profundidade de alguns micrometros abaixo desta

(STUART, 1997). Pode chegar até algumas camadas mais profundas do estrato córneo, dependendo da velocidade do espelho móvel.

A espectroscopia Raman, que mede o espalhamento inelástico da luz, é uma técnica útil, já que não sofre interferência da água, substância naturalmente presente em amostras biológicas e que absorve fortemente no infravermelho. Como no caso da espectroscopia infravermelho, os espectros Raman baseiam-se no fato de que o espectro vibracional de uma molécula é um indicador sensível das suas propriedades químicas. Este espectro vibracional reflete a disposição do núcleo atômico e das ligações químicas entre as moléculas e a interação entre as moléculas e seu ambiente imediato (CAREY, 1982).

A calorimetria exploratória diferencial tem sido largamente empregada para determinar a termodinâmica das transições de fase e as mudanças conformacionais em sistemas biológicos incluindo proteínas, seqüências de ácidos nucleicos e lipídeos. Os calorímetros monitoram a diferença de temperatura entre dois sensores, um contendo o cadinho da amostra biológica e o outro o da referência (normalmente um cadinho vazio) como uma função da temperatura em uma determinada condição (HINZ & SCHWARZ, 2001).

As análises do estrato córneo humano e da epiderme cultivada *in vitro* demonstraram que a papaína causa alterações, porém que estas podem ser reversíveis e/ou transitórias.

### **5.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC**

As técnicas de análises térmicas como a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a análise térmica diferencial (DTA) têm sido empregadas para estudar as transições térmicas do estrato córneo dos mamíferos. Tipicamente estas transições ocorrem em intervalos de temperatura de 35-42, 60-77, 70-90 e 95-120 °C e são identificadas como T1, T2, T3 e T4 respectivamente. T1, T2 e T3 são atribuídas a mudanças de fase nas



bicamadas lipídicas intercelulares e T4 é associada com a desnaturação protéica (AL SAIDAN *et al.*, 1998).

Em estratos córneos de pele humana, uma quinta transição no intervalo 51-55 °C foi relatada e atribuída a ligação covalente de lipídeos ao envelope cornificado (GAY *et al.*, 1994; CORNWELL *et al.*, 1996).

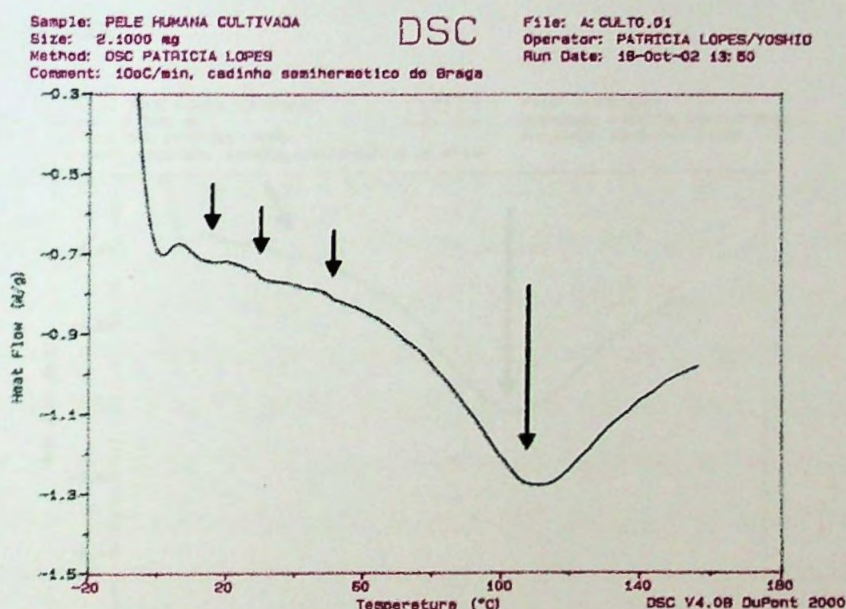
As alterações relatadas nos experimentos com espectroscopia vibracional foram confirmadas pelas curvas de DSC que informam modificações tanto em relação aos picos endotérmicos no estrato córneo tratado com papaína quanto na epiderme cultivada, sendo as alterações mais visíveis no tratamento por 24 horas (**figuras 42 e 50**).

As transições de lipídeos que ocorrem em/ou abaixo de temperaturas fisiologicamente são relevantes. GAY *et al.* (1994), verificaram com seus resultados experimentais, que pode existir erro na interpretação de experimentos com lipídeos isolados do estrato córneo. Os autores sugerem que é sempre indicado analisar uma amostra empregando-se diversas técnicas biofísicas e que a caracterização completa do comportamento dos lipídeos é necessária para a compreensão das estruturas e dos mecanismos de permeação no estrato córneo.

As transições no perfil térmico obtido com o DSC refletem a fusão dos domínios estruturais que resultam em mudanças na capacidade de calor e fornecem informações a nível macroscópico. A transição observada em torno de 40 °C é descrita como uma mudança da fase sólida/fluida para uma fração discreta de lipídeos. As transições térmicas encontradas (entre 65 e 75 °C) estão relacionadas a transformação das estruturas lamelares dos lipídeos para uma estrutura desordenada. A transição em 80 °C pode ocorrer devido a passagem dos lipídeos de um estado gelificado para um estado líquido cristalino. Estes lipídeos estão associados com proteínas, provavelmente formando um complexo lipoprotéico. Quando o estrato córneo contém certa quantidade de água, uma transição adicional aparece em torno de 100 °C. esta transição é descrita como relacionada a

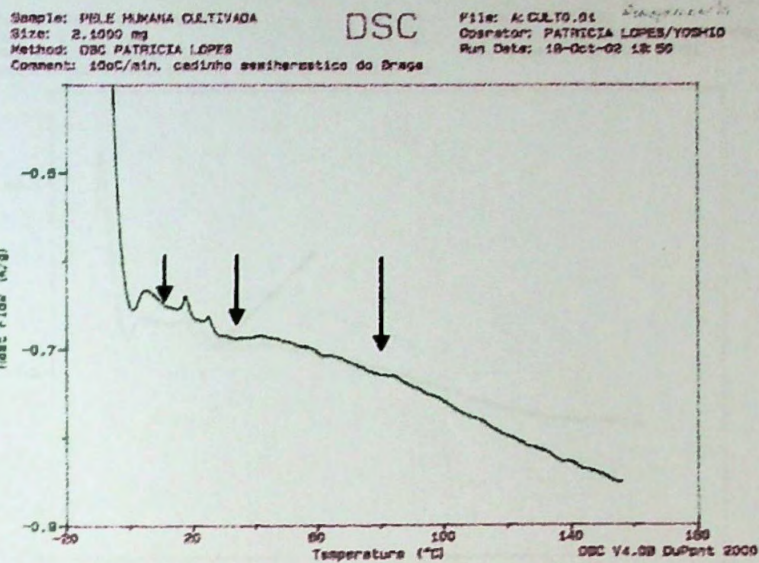
desnaturação das proteínas e pode ser observada somente em amostras com alto nível de hidratação (POULIOT *et al.*, 1999).

Analisando a **figura 38**, verificamos que os picos relacionados com as transições térmicas naturais do estrato córneo, não são detectados nas mesmas temperaturas reportadas previamente. Percebemos um primeiro pico endotérmico em torno de 16 °C, uma segunda transição em torno de 30 °C e por fim uma terceira em cerca de 50 °C, todas elas muito fracas. Na curva de DSC da segunda corrida desta amostra (**figura 39**) verificamos o deslocamento da transição que aparece em 30 °C, porém a transição em 16 °C permanece estática, enquanto a transição em 50 °C desaparece.

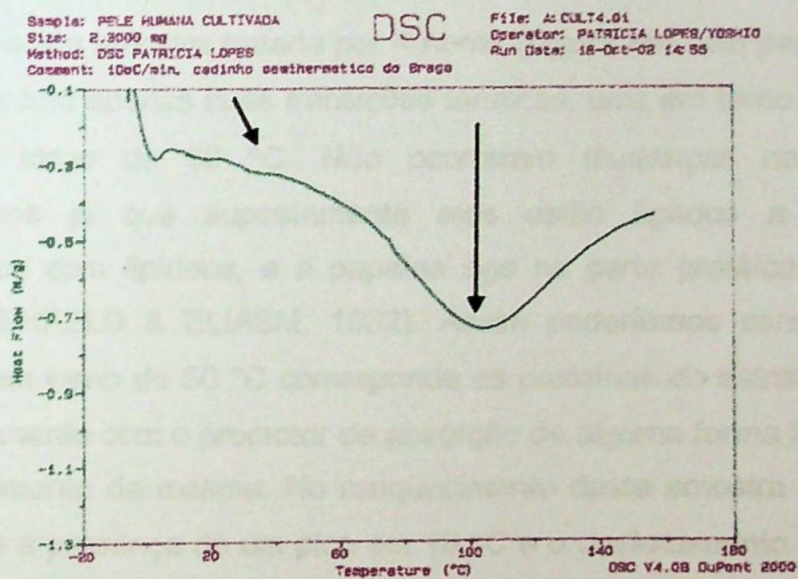


**Figura 38.** Curva de DSC da epiderme cultivada controle (sem tratamento), primeira corrida.





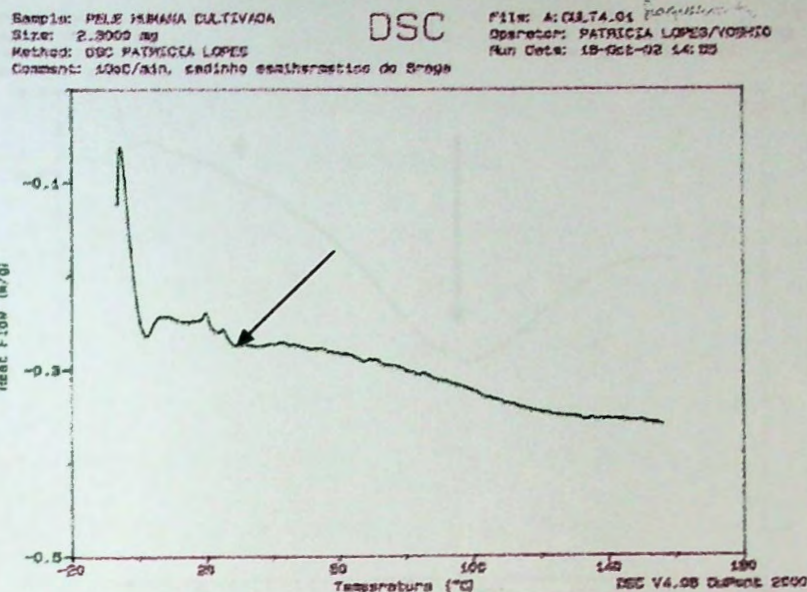
**Figura 39.** Curva de DSC da epiderme cultivada controle (sem tratamento), segunda corrida.



**Figura 40.** Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2% (p/v) por 4 horas, primeira corrida.

Nesta figura 40 observamos que a temperatura de perda de água é menor, indicando um menor conteúdo hídrico.

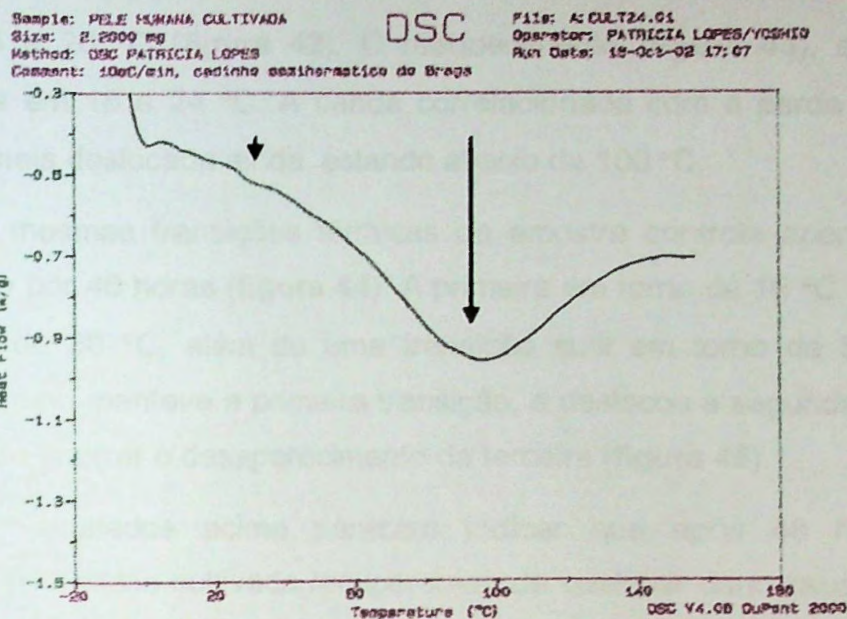




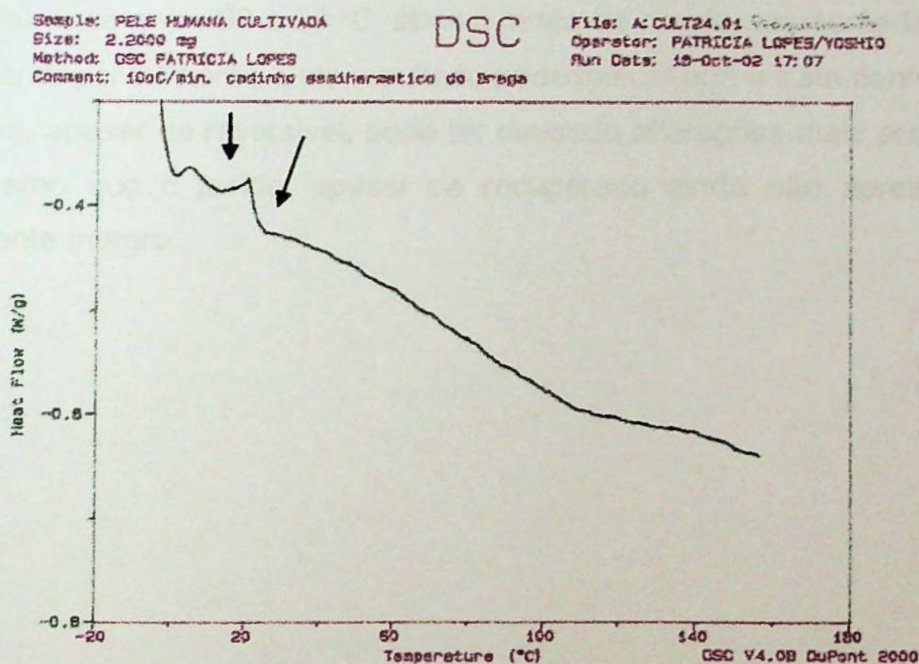
**Figura 41.** Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2% (p/v) por 4 horas, segunda corrida.

Já para a amostra tratada por 4 horas (**figura 40**) com papaína 0,2% (p/v), aparecem apenas duas transições térmicas, uma em torno de 16 °C e outra em torno de 30 °C. Não ocorreram mudanças nestes picos endotérmicos já que supostamente eles estão ligados a transições relacionados com lipídeos, e a papaína age na parte protéica do estrato córneo (REHFELD & ELIASM, 1982). Assim poderíamos concluir que a transição em torno de 50 °C corresponde as proteínas do estrato córneo e que o tratamento com o promotor de absorção de alguma forma interferiu no desaparecimento da mesma. No reaquecimento desta amostra (**figura 41**) verificamos a presença de um pico em 16 °C e o deslocamento do pico em torno de 30 °C.





**Figura 42.** Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2% (p/v) por 24 horas, primeira corrida.



**Figura 43.** Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2% (p/v) por 24 horas, segunda corrida.

Já na amostra tratada por 24 horas com papaína 0,2% (p/v) podemos verificar uma alteração mais intensa, já que as transições térmicas aparecem

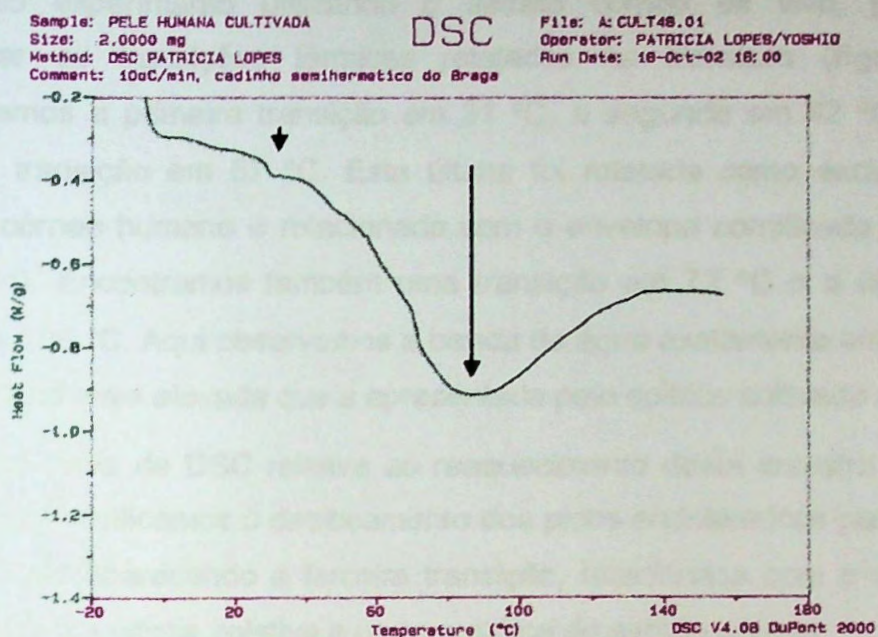
em 8, 16 e 28 °C (**figura 42**). O reaquecimento (**figura 43**), apresenta transições em 18 e 24 °C. A banda correlacionada com a perda de água aparece mais deslocada ainda, estando abaixo de 100 °C.

As mesmas transições térmicas da amostra controle aparecem no tratamento por 48 horas (**figura 44**). A primeira em torno de 16 °C e a outra em torno de 30 °C, além de uma transição sutil em torno de 50 °C. O reaquecimento manteve a primeira transição, e deslocou a segunda para 23 °C, além de ocorrer o desaparecimento da terceira (**figura 45**).

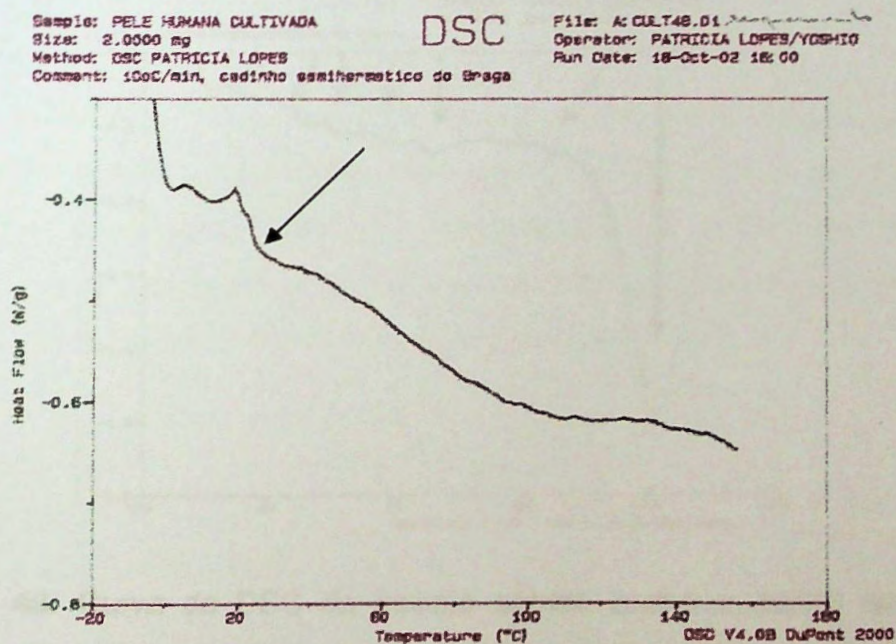
Os resultados acima parecem indicar que após 48 horas de tratamento o epitélio cultivado recuperou-se de qualquer dano causado pela papaína, e voltou a apresentar a transição térmica relacionada com a parte protéica do estrato córneo.

Porém, é interessante notar que a banda relacionada com a perda de água, aparece entre 80 e 90 °C, abaixo ainda da banda apresentada para o tratamento por 24 horas. Este resultado pode indicar que o tratamento com a papaína, apesar de reversível, pode ter causado alterações mais profundas, ou mesmo que o tecido, apesar de recuperado ainda não apresenta-se totalmente íntegro.





**Figura 44.** Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2% (p/v) por 48 horas, primeira corrida.

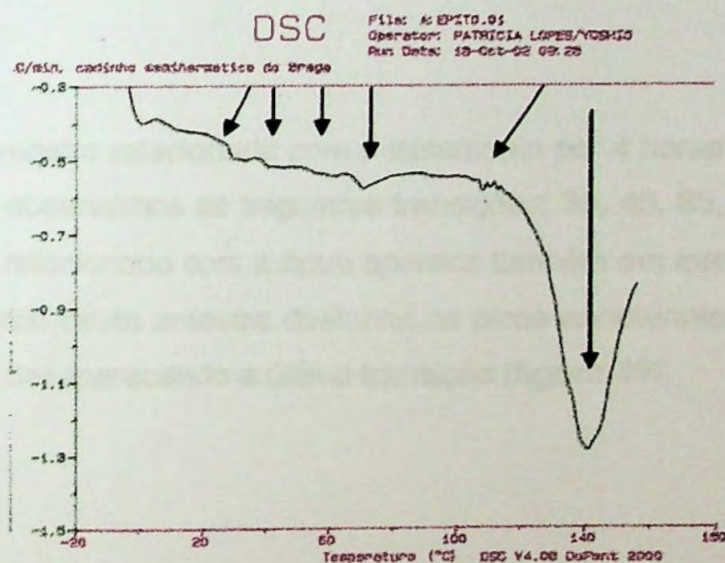


**Figura 45.** Curva de DSC da epiderme cultivada exposta a papaína 0,2%(p/v) por 48 horas, segunda corrida.



No experimento utilizando o estrato córneo *ex vivo*, podemos encontrar as transições térmicas relatadas na literatura (figura 46). Observamos a primeira transição em 31 °C, a segunda em 42 °C e uma terceira transição em 57 °C. Esta última foi relatada como exclusiva do estrato córneo humano e relacionada com o envelope cornificado (GAY *et al.*, 1994). Encontramos também uma transição em 72 °C e a última em torno de 108 °C. Aqui observamos a banda de água exatamente em 140 °C, temperatura mais elevada que a apresentada pelo epitélio cultivado *in vitro*.

Na curva de DSC relativa ao reaquecimento desta amostra controle (figura 47), verificamos o deslocamento dos picos endotérmicos para 25, 37 e 64 °C, desaparecendo a terceira transição, relacionada com o envelope cornificado e a última, relativa a parte protéica do estrato córneo.



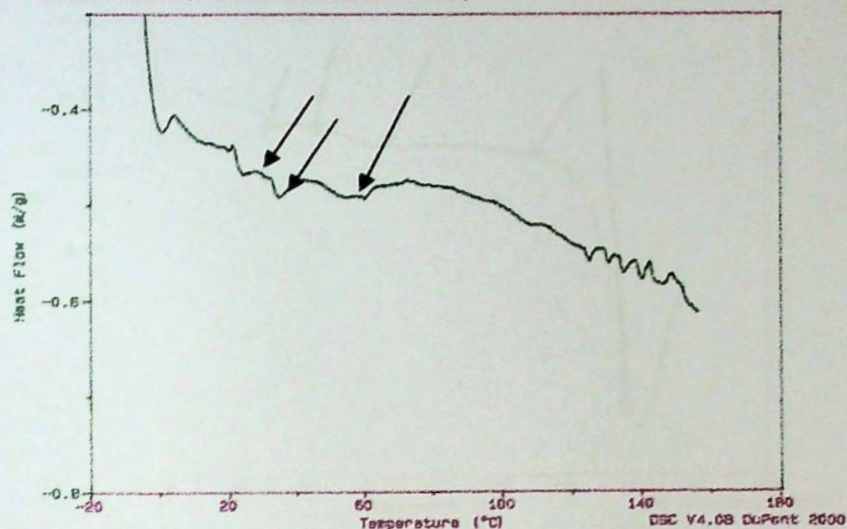
**Figura 46.** Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen controle (sem tratamento), primeira corrida.



Sample: PELE HUMANA NATURAL  
 Size: 2.0000 mg  
 Method: DSC PATRICIA LOPES  
 Comment: 100C/min, cadinho semihermético da Braga

DSC

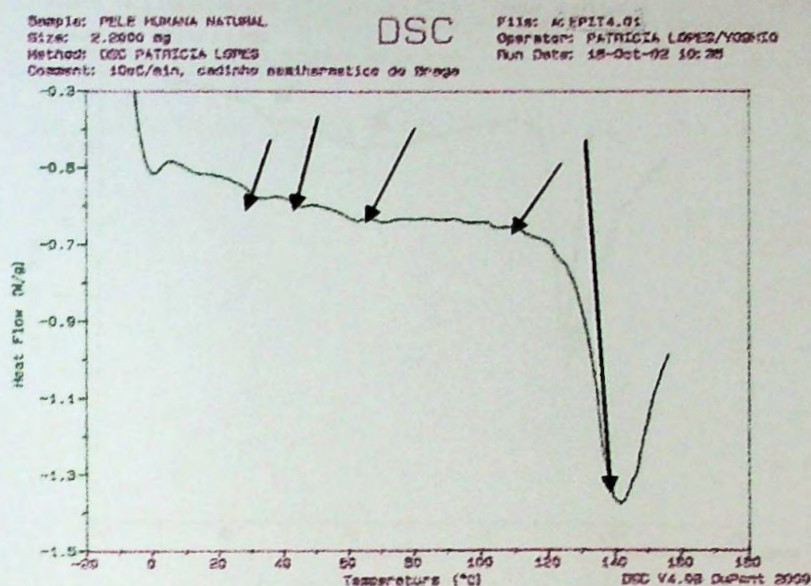
File: AC EPITO.01  
 Operator: PATRICIA LOPES/YOSHIO  
 Run Date: 19-Oct-02 02:28



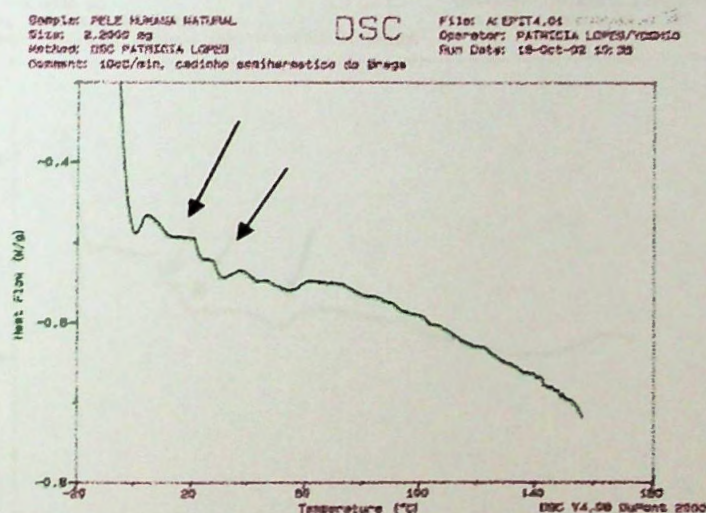
**Figura 47.** Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen controle (sem tratamento), segunda corrida.

Na amostra relacionada com o tratamento por 4 horas com a papaína 0,2% (p/v), observamos as seguintes transições: 33, 48, 65, 105 °C (**figura 48**). O pico relacionado com a água aparece também em torno de 140 °C. O reaquecimento desta amostra deslocou os picos endotérmicos para 26, 33, 44 e 56 °C, desaparecendo a última transição (**figura 49**).



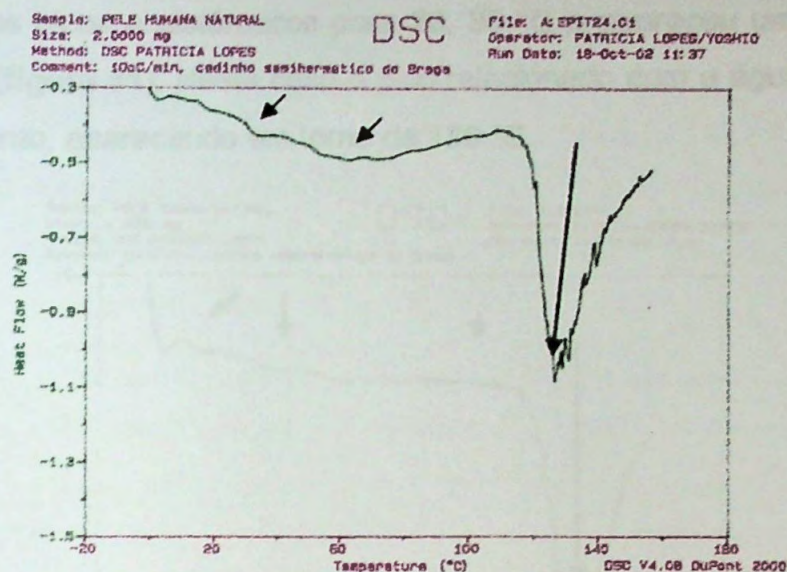


**Figura 48.** Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 4 horas, primeira corrida.

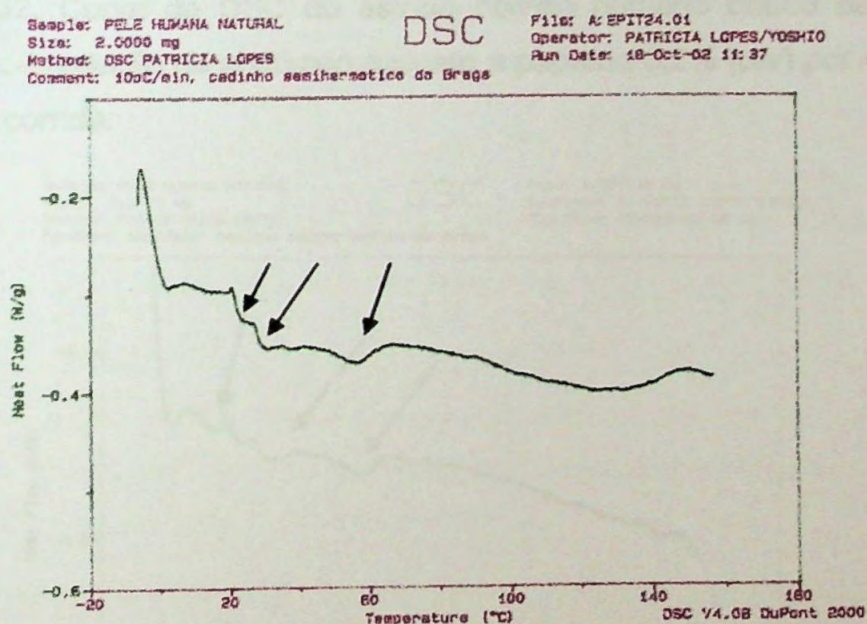


**Figura 49.** Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 4 horas, segunda corrida.





**Figura 50.** Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 24 horas, primeira corrida.

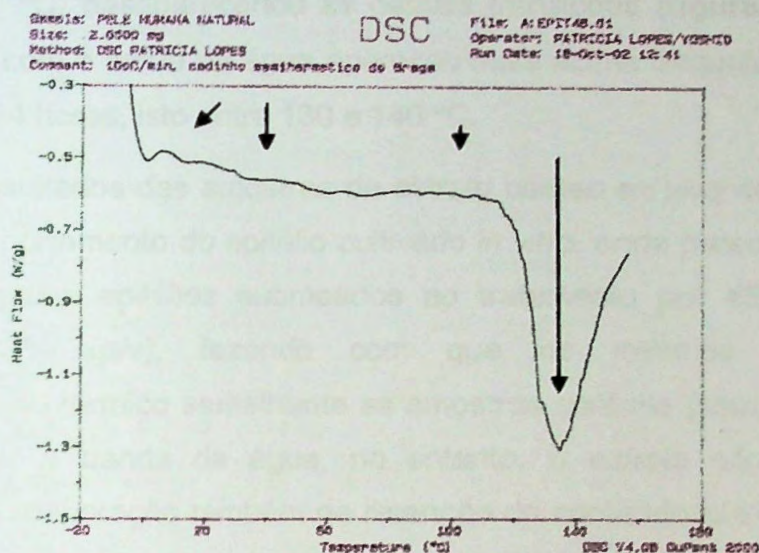


**Figura 51.** Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 24 horas, segunda corrida.

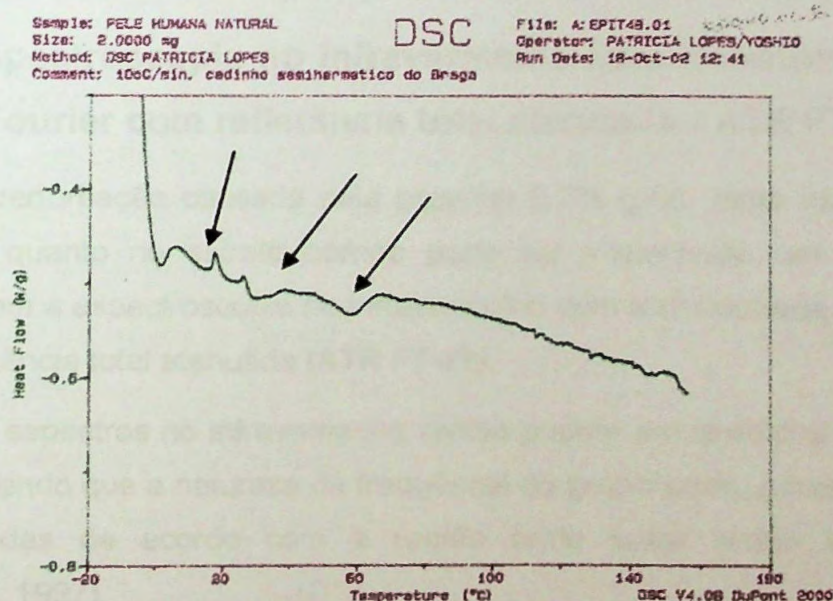
Quando tratamos o estrato córneo *ex vivo* por 24 horas apareceram transições térmicas apenas em 37 e 56 °C (figura 50). O reaquecimento



deslocou os picos endotérmicos para 26, 30 °C e apareceu uma transição em 57 °C (figura 51). Neste caso o pico relacionado com a água sofreu um deslocamento, aparecendo em torno de 130 °C.



**Figura 52.** Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 48 horas, primeira corrida.



**Figura 53.** Curva de DSC do estrato córneo humano obtido de cirurgia plástica de redução de abdômen exposto a papaína 0,2% (p/v) por 48 horas, segunda corrida.



Por fim a amostra tratada por 48 horas apresentou uma transição térmica em 37, 57, 71, 90 °C e uma última em 108 °C (**figura 52**). O reaquecimento desta amostra também deslocou os picos endotérmicos para 22, 30 e 57 °C, desaparecendo as demais transições (**figura 53**). O pico relacionado com a saída da água apareceu mais acima daquele da amostra tratada por 24 horas, isto entre 130 e 140 °C.

Os resultados das amostras de estrato córneo *ex vivo* demonstram o mesmo comportamento do epitélio cultivado *in vitro*, onde parece haver uma recuperação dos epitélios submetidos ao tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v), fazendo com que os mesmos apresentem comportamento térmico semelhante as amostras controle (sem tratamento). Com relação a banda de água, no entanto, o estrato córneo *ex vivo* apresentou recuperação também na retenção do conteúdo hídrico, fato este que pode ser explicado pela maior complexidade deste tecido, quando comparado ao epitélio cultivado, que não apresenta todos os tipos celulares presentes no estrato córneo humano.

### **5.3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada - ATR FT-IR**

A perturbação causada pela papaína 0,2% (p/v), tanto na epiderme cultivada quanto no estrato córneo pode ser visualizada nos espectros obtidos com a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR FT-IR).

Os espectros no infravermelho médio podem ser divididos em quatro regiões, sendo que a natureza da frequência do grupo pode, geralmente, ser determinadas de acordo com a região onde estas estão localizadas (STUART, 1997).

Todas as frequências fundamentais na região entre 4000 e 2500  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao estiramento X-H. Assim o estiramento O-H produz uma banda larga que ocorre na faixa de 3700-3600  $\text{cm}^{-1}$ . Em comparação, o

estiramento N-H é comumente observado entre 3400-3300  $\text{cm}^{-1}$ . Esta absorção é geralmente muito mais estreita do que o estiramento O-H e, portanto pode ser diferenciada. Compostos que contém o grupo  $\text{NH}_2$  normalmente apresentam bandas em duplete ("doublet structure"), enquanto que aminas secundárias mostram-se como uma única banda estreita (STUART, 1997).

As freqüências de estiramento C-H de compostos alifáticos ocorrem em uma faixa que vai de 3000 a 2850  $\text{cm}^{-1}$ . Elas são moderadamente largas e mostram uma intensidade média. É possível também verificar as freqüências de vibrações normais simétricas e assimétricas do estiramento C-H dos grupos  $\text{CH}_3$ , que normalmente aparecem em cerca de 2965 e 2880  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, enquanto as freqüências de vibrações normais correspondente ao grupo  $\text{CH}_2$  ocorrem em 2930 e 2860  $\text{cm}^{-1}$  (STUART, 1997).

Se a ligação C-H for adjacente a uma dupla ligação ou anel aromático, a freqüência do estiramento C-H aumenta e absorve entre 3100 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Este é um parâmetro útil para distinguir compostos alifáticos puros, mas deve ser utilizado com cuidado. Foi relatado que para vários compostos contendo um pequeno número de hidrogênios aromáticos, e muitas ligações C-H alifáticas, os picos abaixo de 3000  $\text{cm}^{-1}$  podem aparecer somente como ombros na forte absorção alifática podendo ser obscurecidos. No entanto evidências da presença de um anel aromático podem ser obtidas examinando-se outras regiões do espectro (STUART, 1997).

A freqüência do estiramento S-H é muito fraca, podendo mesmo não ser observada.

As freqüências de estiramento de triplas ligações recaem em 2500-2000  $\text{cm}^{-1}$ , devido a alta constante de força das ligações; as ligações  $\text{C}\equiv\text{C}$  absorvem entre 2300-2050  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto o grupo nitrila ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ) absorve entre 2300 e 2200  $\text{cm}^{-1}$ . Estes grupos podem ser facilmente distinguidos já que o estiramento  $\text{C}\equiv\text{C}$  é normalmente muito fraco, enquanto o  $\text{C}\equiv\text{N}$  apresenta intensidade média (STUART, 1997).

A região de 2000 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada com as frequências de estiramento de ligações duplas, sendo as principais bandas devidas ao estiramento C=C e C=O. O estiramento da carbonila é um dos mais facilmente reconhecidos em um espectro infravermelho, sendo geralmente a banda mais intensa, e dependendo do tipo de ligação C=O, ocorre nas regiões de 1830-1650  $\text{cm}^{-1}$ . Devemos lembrar, no entanto, que carbonilas metálicas absorvem abaixo de 2000  $\text{cm}^{-1}$ . A banda de estiramento C=C é muito mais fraca e ocorre em cerca de 1650  $\text{cm}^{-1}$ . Esta banda é freqüentemente ausente em vista da não variação do momento dipolar durante a vibração. A banda de estiramento C=N também ocorre nesta região e é mais forte (STUART, 1997).

Em frequências com valores acima de 1500  $\text{cm}^{-1}$ , é geralmente possível verificar cada banda de absorção em um espectro infravermelho. Este não é o caso para a maioria das absorções observadas abaixo desta faixa. Esta região é conhecida como região da "impressão digital", já que moléculas similares fornecem absorção diferente nesta faixa de frequência (STUART, 1997).

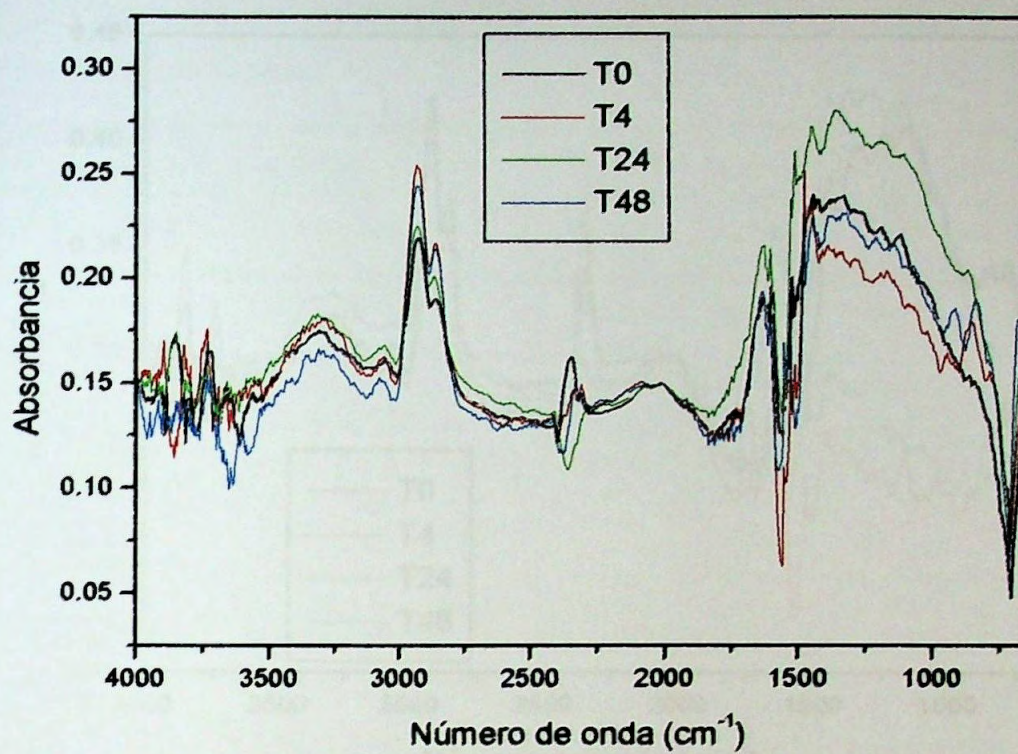
Presume-se que cada banda do espectro obtido no infravermelho pode ser assinalada como uma vibração normal particular da molécula, do movimento de grupos atômicos ou da deformação angular ou estiramento de uma ligação particular. Isto é verdadeiro para muitas bandas, particularmente para vibrações de estiramento de ligações múltiplas que tem comportamento normal. No entanto, algumas vibrações não se comportam dessa forma e podem variar em centenas de números de ondas, mesmo em moléculas similares. Para a maioria das vibrações de deformação angular do esqueleto, que absorvem na região de 1500-650  $\text{cm}^{-1}$ , onde pequenos efeitos eletrônicos ou estéricos da molécula levam a bandas largas. Um espectro de uma molécula pode ter centenas de bandas de absorção, podendo este ser visto como a impressão digital da molécula (STUART, 1997).

A literatura reporta estudos de espectros vibracionais por **FT-IR** do estrato córneo humano e animal, como por exemplo, as vibrações de

estiramento de C-H assimétrico e simétrico dos grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  na região de  $3100\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ . O estiramento  $\text{C=O}$  (amida I) apresentado em cerca de  $1650\text{ cm}^{-1}$  e a banda característica de amida II em cerca de  $1550\text{ cm}^{-1}$  estão relacionados com a deformação angular de N-H e estiramento C-N. Adicionalmente, movimentos de deformação angular C-H, para grupos CH,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , são descritos como bandas sobrepostas entre  $1500$  e  $1360\text{ cm}^{-1}$ . Sinais de outras bandas incluem o estiramento O-H relacionado com a cabeça polar de grupos lipídicos em cerca de  $3400\text{ cm}^{-1}$  ou com a água em  $3200\text{ cm}^{-1}$ , e um estiramento N-H em  $3300\text{ cm}^{-1}$  associado com proteínas queratinizadas. No entanto o estrato córneo, como uma biomembrana naturalmente hidratada, apresenta uma banda muito forte centrada em  $3287\text{ cm}^{-1}$ , o que mascara características menos intensas desta região (BARRY, EDWARDS e WILLIAMS, 1992).

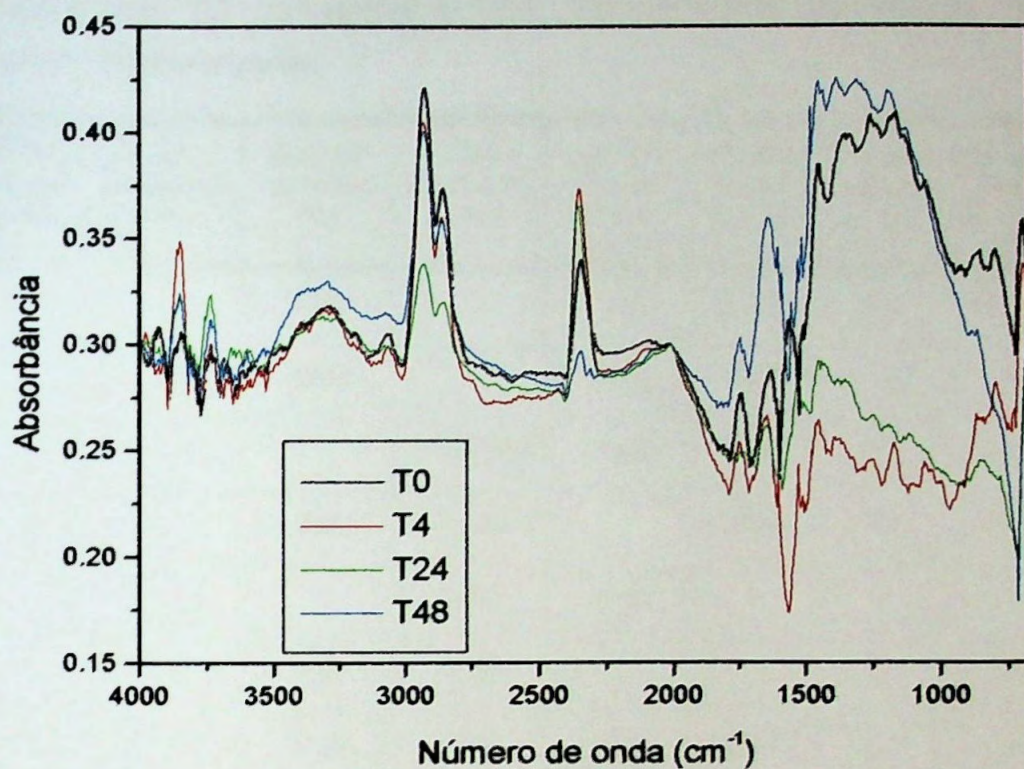
Pode haver uma possível correlação das bandas de DSC de água com estas bandas do ATR que exigirá um estudo mais criterioso frente a este aspecto.





**Figura 54.** Espectro obtido com ATR FT-IR da epiderme cultivada sem tratamento (controle) e exposta por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v).





**Figura 55.** Espectro obtido com ATR FT-IR do estrato córneo humano sem tratamento (controle) e exposto por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v).

**Tabela 15.** Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) encontrados nos espectros obtidos com espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier em refletância total atenuada.

Epitélio cultivado controle	Epitélio cultivado T4	Epitélio cultivado T24	Epitélio cultivado T48	Estrato córneo ex vivo controle	Estrato córneo ex vivo T4	Estrato córneo ex vivo T24	Estrato córneo ex vivo T48
		1269		1242	1238	1230	1292
	1377	1346		1330	1365	1338	1369
	1438		1434/1473	1438	1442	1438	1434
1523	1523	1508	1523		1519	1519	1519
			1546	1562			
1593	1593	1593	1596				1593
1616	1627	1620	1623	1627	1635	1639	1639
				1743	1739	1728	1739
2846	2862	2854	2846	2846	2846	2846	2854
2935	2931	2935	2920	2920	2920	2931	2920

O estrato córneo humano sem tratamento apresenta as bandas de absorção típicas, descritas em literatura (figura 55). Os estiramentos C-H<sub>2</sub> simétricos, que absorvem em  $2850 \text{ cm}^{-1}$  e C-H<sub>2</sub> assimétrico a  $2920 \text{ cm}^{-1}$ , estão relacionados com os lipídeos intercelulares. Qualquer modificação nestes componentes desloca os estiramentos indicando aumento da desordem causada pelo promotor de absorção cutâneo. Os picos de absorção em torno de  $2300 \text{ cm}^{-1}$  estão correlacionados com o CO<sub>2</sub> do ar (WILLIAMS *et al.*, 1993).

Podemos visualizar uma banda larga e forte na região de  $3287 \text{ cm}^{-1}$ , relacionada com a hidratação natural do estrato córneo e da epiderme

cultivada (BARRY, EDWARDS e WILLIAMS, 1992). Também notamos em todos os espectros (**figura 55**) o aparecimento de bandas em  $3070\text{ cm}^{-1}$ , relacionadas com o estiramento de C-H olefínico, indicado na literatura como derivado da queratina da amida II (ANIGBOGU *et al.*, 1995). A epiderme cultivada apresenta um deslocamento, estando as bandas presentes em torno de  $3050\text{ cm}^{-1}$  (**figura 54**).

Os estiramentos C-H simétricos e assimétricos, relacionados com cadeias alquil lipídicas e correspondentes a bicamada lipídica intercelular (**figura 55**), apresentaram-se sem alteração em  $2920\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  assimétrico) para os espectros do estrato córneo sem tratamento (controle), para o tratamento por 4 horas e aquele tratado por 48 horas com papaína 0,2% (p/v). O espectro relacionado com o tratamento por 24 horas apresentou ligeiro deslocamento, com a banda aparecendo em  $2931\text{ cm}^{-1}$ . A banda que aparece a  $2846\text{ cm}^{-1}$  está relacionada com o estiramento  $\text{CH}_2$  simétrico. Encontramos esta banda nos espectros das amostras controle, tratamento por 4 e 24 horas, porém no espectro relacionado ao tratamento por 48 horas, a mesma encontra-se deslocada, aparecendo em  $2854\text{ cm}^{-1}$ . Estas duas bandas são descritas na literatura como fortes e aparecendo em torno de  $2920\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , como podemos confirmar na **tabela 3**.

Ao analisarmos as bandas vibracionais que aparecem nos espectros da epiderme cultivada (**figura 54**), verificamos que o estiramento  $\text{CH}_2$  assimétrico está indicado em  $2935\text{ cm}^{-1}$  para o controle, e tratamento por 24 horas. Para o tratamento por 4 horas apresentou-se em  $2931\text{ cm}^{-1}$  e  $2920\text{ cm}^{-1}$  para o tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v). Para o estiramento  $\text{CH}_2$  simétrico apareceu em  $2846\text{ cm}^{-1}$  no controle, e no tratamento por 48 horas e em  $2854\text{ cm}^{-1}$  para o tratamento por 4 e 24 horas.

É interessante notar, que as bandas relacionadas com o estiramento C-H<sub>2</sub> na epiderme cultivada, são menos intensas que aquelas encontradas no estrato córneo. Este resultado corrobora com a literatura, onde PRASCH *et al.* (2000) descrevem tais bandas como não facilmente detectáveis devido ao ruído da linha de base do espectro. Entretanto em nosso trabalho foi possível detectá-las como podemos observar na **figura 54**.



Existem diferenças sutis no número de onda absoluto, das bandas relacionadas com os modos da amida, entre a epiderme cultivada e o estrato córneo *ex vivo*, como já havia observado PRASCH *et al.* (2000).

Uma característica presente no espectro FT-IR de estrato córneo humano é um modo de estiramento C=O, em  $1743\text{ cm}^{-1}$  que foi relacionado na literatura com lipídeos endógenos. Entretanto, segundo BARRY, EDWARDS e WILLIAMS (1992), esta banda está na verdade relacionada a materiais exógenos, como suor, sebo ou contaminação durante a preparação da amostra.

Em nossos resultados (figura 55), verificamos a presença desta banda apenas nos espectros relacionados com o estrato córneo *ex vivo*, tanto para o controle, quanto para os diferentes tratamentos com papaína 0,2% (p/v), o que corrobora com a afirmação dos pesquisadores. Nos espectros relacionados com a epiderme cultivada (figura 54), não houve aparecimento deste estiramento, levando a indicação de que tal modo vibracional pode estar mesmo ligado a produção de sebo, material exógeno não produzido em cultura celular.

O espectro infravermelho de proteínas exhibe bandas de absorção associadas com características do grupo amida, a unidade estrutural comum a todas as moléculas deste tipo. Um grupo amida planar isolado fornece cinco modos vibracionais no plano e um modo normal fora do plano. Os modos no plano são devidos ao estiramento C=O, C-N, N-H e a deformação angular O-C-N, enquanto o modo fora do plano está relacionado a torção C-N (STUART, 1997).

As bandas características do grupo amida das cadeias protéicas são similares a bandas de absorção exibidas por amidas secundárias em geral, e são chamadas de bandas amidas. Existem as bandas de amida A, de amida B e de amidas de I a VII, classificadas de acordo com a frequência decrescente. Algumas destas bandas são mais úteis que outras para estudar a conformação estrutural de proteínas, sendo as bandas de amida A, I e II as mais utilizadas (STUART, 1997).

O conhecimento das vibrações das ligações peptídicas é baseado principalmente nos cálculos de coordenadas normais utilizando o *N*-metilacetamida como composto modelo.

**Tabela 16.** Características das bandas no infravermelho das amidas protéicas (STUART, 1997).

Designação	Frequência aproximada (cm <sup>-1</sup> )	Natureza da vibração
A	3300	estiramento N-H, em ressonância de Fermi com a 1ª harmônica (2x amida II)
B	3110	
I	1653	80% estiramento C=O; 10% estiramento C-N; 10% deformação angular N-H
II	1567	60% deformação angular N-H, 40% estiramento C-N
III	1299	30% estiramento C-N; 30% deformação angular N-H; 10% estiramento C=O; 10% deformação angular O=C-N; 20% outras
IV	627	40% deformação angular O=C-N; 60% outras
V	725	Deformação angular N-H
VI	600	Deformação angular C=O
VII	200	Torção C-N

A banda no infravermelho mais útil para análise da estrutura secundária de proteínas em meio aquoso é a banda de amida I, que ocorre entre 1700 e 1600 cm<sup>-1</sup>. Esta banda representa 80 % da vibração de estiramento C=O do grupo amida, acoplados a deformação angular o N-H no plano e o estiramento C-N. A frequência exata destas vibrações dependem

da natureza das ligações de hidrogênio envolvendo os grupos C=O e N-H, isto é determinado pela estrutura secundária particular adotada pela proteína (STUART, 1997).

Proteínas geralmente possuem uma variedade de domínios contendo fragmentos de polipetídeos em diferentes conformações. Como consequência, a observação da banda de amida I é usualmente uma composição complexa, constituída por um número de bandas componentes sobrepostas representando hélices, estrutura  $\beta$  e estruturas envelopadas e randomizadas (STUART, 1997).

As bandas de amida II representam principalmente a deformação angular no plano N-H com 60% e estiramento C-N com 40%. Como na banda da amida I, é possível separar a banda de amida II em componentes que dependem da estrutura secundária das proteínas. Ambientes hidrofóbicos ou estruturas firmemente ordenadas, como as  $\alpha$ -hélices e estruturas  $\beta$ , reduzem a chance de troca do próton da amida N-H (STUART, 1997).

As contribuições vibracionais dos aminoácidos das cadeias laterais das proteínas também devem ser consideradas. Estes exibem modos vibracionais no infravermelho que são freqüentemente úteis na investigação do grupo local protéico. Também é necessário estar ciente da localização destes modos, já que os mesmos podem ser confundidos com as vibrações das amidas (STUART, 1997).

**Tabela 17.** Frequência características e tentativas de atribuição a diferentes aminoácidos (STUART, 1997).

<b>Aminoácido</b>	<b>Frequência (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vibração</b>
Alanina	1465	Deformação angular CH <sub>2</sub>
Valina	1450	Deformação angular assimétrica CH <sub>3</sub>
Leucina	1375	Deformação angular simétrica CH <sub>3</sub>
Serina	1350-1250	Deformação O-H
Ácido Aspártico	1720	Estiramento C=O
Ácido Glutâmico	1560	Estiramento assimétrico CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	1415	Estiramento simétrico CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Asparagina	1650	Estiramento C=O
Glutamina	1615	Deformação angular NH <sub>2</sub>
Lisina	1640-1610, 1550-1485, 1160, 1100	Deformação angular NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Rocking NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
Fenilalanina	1602, 1450, 760, 700	Vibrações do anel
Tirosina	1600, 1450	Vibrações do anel

Os estiramentos relacionados com as amidas I e II são encontrados a 1640 e 1565 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Promotores de absorção que agem sobre os queratinócitos, ou seja, a parte protéica do estrato córneo, deslocam estas bandas (WILLIAMS *et al.*, 1993).

Ainda na figura 55 podemos verificar que o modo vibracional C=O, relacionado a amida I, é encontrado em 1627 cm<sup>-1</sup> na amostra controle (sem tratamento). Para as amostras tratadas esta banda está deslocada, sendo visualizada em 1635 cm<sup>-1</sup> nos tratamentos por 4 horas com papaína 0,2%



(p/v), em  $1639\text{ cm}^{-1}$  naquelas tratadas por 24 e 48 horas. Já a amida II (estiramento C-N) apresenta-se no controle em  $1562\text{ cm}^{-1}$  e nos tratamentos por 4, 24 e 48 horas, em  $1519\text{ cm}^{-1}$ .

Os deslocamentos observados, em torno de  $8\text{ cm}^{-1}$  na amida I, e  $43\text{ cm}^{-1}$  na amida II, são indicativos de mudanças estruturais, podendo demonstrar alterações na estrutura protéica do estrato córneo.

Segundo OERTEL (1977) e ANIGBOGU *et al.* (1995), estes deslocamentos na frequência de amida II são indicativos de mudança conformacional da  $\alpha$ -hélice desta proteína para cadeias antiparalelas de  $\beta$ -folha pregueada. A proteína  $\beta$ -folha pregueada, formada normalmente em porções de  $\alpha$ -hélice de filamentos de queratina intercelular, pode ser convertida novamente a esta conformação inicial após re-hidratação dos sítios polares de ligação.

O arranjo mais simples que uma cadeia polipeptídica pode assumir, com suas ligações peptídicas rígidas (mas com as outras ligações simples girando livremente), é a estrutura em hélice, a qual é denominada de  $\alpha$ -hélice. Nesta estrutura o esqueleto polipeptídico está enrolado ao redor do eixo maior da molécula, enquanto os grupos R dos resíduos de aminoácidos projetam-se para fora da hélice formada pelo esqueleto covalente. Esta é uma conformação estável, preferida pela cadeia polipeptídica da  $\alpha$ -queratina. Permite a formação de pontes de hidrogênio entre cada átomo de hidrogênio ligado ao átomo eletronegativo de nitrogênio da ligação peptídica e o átomo de oxigênio eletronegativo da carbonila do quarto aminoácido da sequência em que aparecem na hélice. Todas as ligações peptídicas da cadeia participam destas pontes de hidrogênio, assim cada passo sucessivo da  $\alpha$ -hélice (**figura 3**) é unido ao passo adjacente por várias pontes de hidrogênio intracadeia, dando estabilidade a toda estrutura (LEHNINGER, 1988).

As  $\alpha$ -hélices são ricas em aminoácidos que permitem tal conformação, isto é que não apresentam grupos volumosos ou grupos R adjacentes carregados positivamente. As  $\alpha$ -queratinas são conhecidas

também pela sua insolubilidade em água a pH 7,0 e à temperatura corporal. Isto acontece em parte devido ao tipo de aminoácidos que predominam na cadeia, que contem geralmente grupos R hidrofóbicos, ou insolúveis em água (LEHNINGER, 1988).

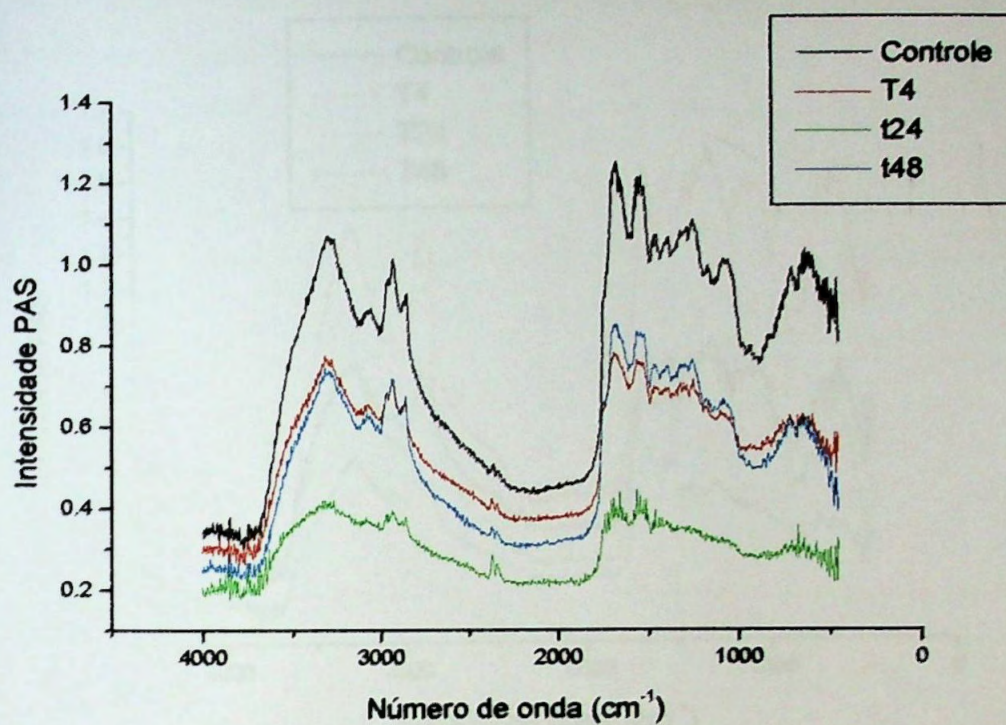
Já as  $\beta$ -queratinas (**figura 4**), também proteínas filamentosas e insolúveis, são flexíveis e facilmente dobráveis, ao contrário das  $\alpha$ -queratina, porém não se distendem. Na  $\beta$ -conformação o esqueleto da cadeia polipeptídica dispõe-se em ziguezague e não em forma helicoidal, formando uma estrutura semelhante a uma série de pregas, chamada de folha pregueada. Na conformação  $\beta$  não há pontes de hidrogênio intracadeias e sim intercadeias ligando cadeias polipeptídicas adjacentes. Todas as ligações peptídicas da  $\beta$ -queratina participam das pontes de hidrogênio, e os grupos R dos aminoácidos projetam-se para fora da estrutura em ziguezague. Não existem ligações de cistina entre as cadeias e essas cadeias de polipeptídios estão orientadas de forma antiparalela (LEHNINGER, 1988).

Ao assumirem a conformação  $\beta$ -folha pregueada, as queratinas do estrato córneo podem estar expondo aminoácidos mais hidrossolúveis, como glicina, que contêm grupos R polares não carregados. Isto poderia explicar em parte a ação da papaína como promotor de absorção, já que ao quebrar as ligações peptídicas do envelope cornificado, a papaína poderia estar modificando a estrutura secundária destas proteínas temporariamente, tornando o ambiente mais hidrossolúvel e permitindo a passagem de substancia hidrofílicas, como o diclofenaco sódico (LOPES, 1999).

### 5.3.3 Espectroscopia fotoacústica

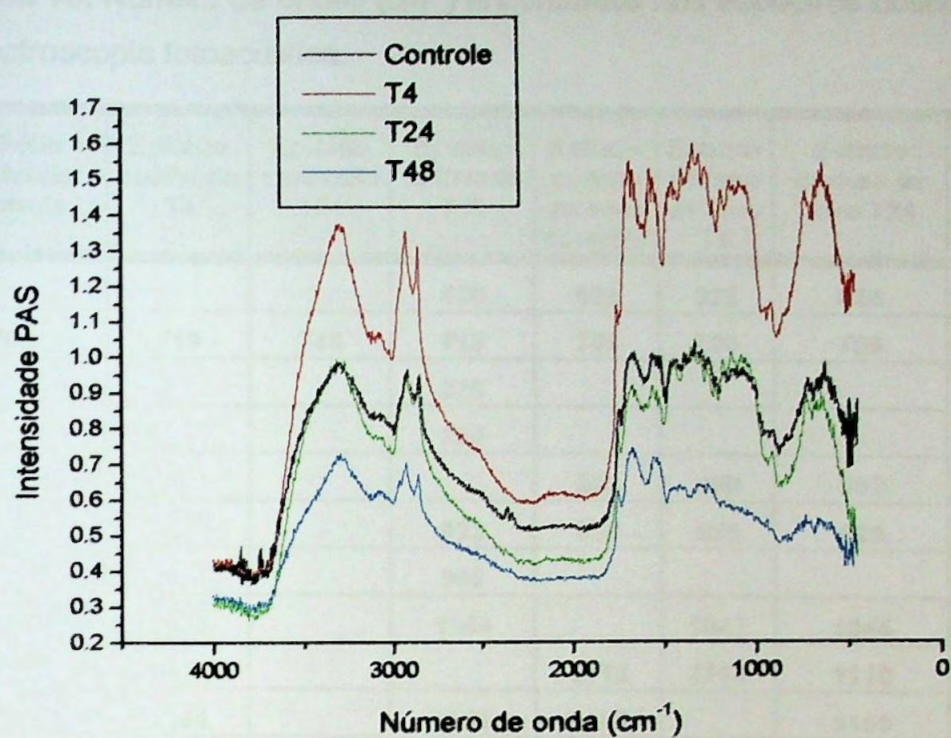
Como dito anteriormente, os espectros obtidos com FT-IR apresentam uma larga faixa de absorção relativa a água nesta faixa. Desta forma, ao analisarmos os espectros obtidos com PAS, comprovamos o aparecimento destas bandas, tanto no estrato córneo *ex vivo*, quanto na epiderme cultivada *in vitro* (figuras 56 e 57).

Estas modificações na estrutura secundária da amida II indicam que as mudanças espectrais não são devidas as ligações de hidrogênio, e sim a modificações no grupo NH da amida, nos estados de conformação nativo que é comprovada pela análise das amidas A em  $3287\text{ cm}^{-1}$ . As amidas A e B são os modos de estiramento NH encontrados em ressonância de Fermi na região de  $3300\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$  e, advindas do estiramento NH fundamental e a primeira harmônica do modo amida II. Estas bandas provavelmente são sensíveis a ligações de hidrogênios e, portanto a mudanças na estrutura da queratina  $\alpha$ -hélice ou  $\beta$ -folha (AKHTAR *et al.*, 1997).



**Figura 56.** Espectro fotoacústico da epiderme cultivada sem tratamento (controle) e exposta por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v).





**Figura 57.** Espectro fotoacústico do estrato córneo humano sem tratamento (controle) e exposto por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v).

**Tabela 18.** Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) encontrados nos espectros obtidos com espectroscopia fotoacústica.

Epitélio cultivado controle	Epitélio cultivado T4	Epitélio cultivado T24	Epitélio cultivado T48	Estrato córneo ex vivo controle	Estrato córneo ex vivo T4	Estrato córneo ex vivo T24	Estrato córneo ex vivo T48
			636	622	622	646	
705	713	748	713	709	709	709	
			829				
			856				
				906	900	902	
			933	933	935	929	929
			968				
1060	1076		1064		1047	1045	
				1112	1110	1110	
1161	1164		1168	1159		1159	1170
					1211	1205	
1244	1245		1247	1245	1245	1251	1253
1278			1296	1278	1276	1276	1294
	1309			1311	1311	1315	1326
1380	1382	1392	1380	1377	1371		1392
1446	1452	1456	1458	1425	1429	1436	1448
1535			1533				
1547	1544	1562		1540	1546	1548	1548
1665	1670	1656	1675	1664	1656	1656	1664
				1745	1737	1747	1747
		2357					
2847	2862	2850	2861	2858	2856	2846	2846
2926	2933	2927	2917	2914	2912	2921	2917
3072	3078	3097	3054	3058	3054	3093	3054
3296	3297	3294	3292	3288	3278	3294	3292

Para o estrato córneo ex vivo, a banda aparece em  $3288 \text{ cm}^{-1}$ , variando imperceptivelmente para os diferentes tratamento com a papaína. Já para a epiderme cultivada, a frequência de absorção é em torno de  $3296 \text{ cm}^{-1}$ , também com variações imperceptíveis.

Isto pode completar os resultados, se analisarmos os possíveis sítios de ação da papaína na epiderme humana. Segundo ROBINSON & ECKERT (1998), o envelope de involucrina está ligado as demais proteínas responsáveis pela coesão do envelope cornificados através de ligações peptídicas realizadas através de uma enzima específica, a transglutaminase, que liga especificamente aminoácidos residuais de glutamina e lisina, formando ligações cruzadas tanto com a parte protéica, quanto com a matriz bilipídica do estrato córneo.

Segundo ROBINSON *et al.*, 1997 a proteína S100A11 é ligada a outras proteínas de envelope através de resíduos de aminoácidos Lys, Lys e/ ou Gln no terminal amino e Gln e/ou Lys no terminal carboxila.

Na sequência, LAZO & DOWNING (1999), verificaram que a involucrina liga-se a matriz lipídica através do terminal amino, rico em glutamina. Desta forma, poderíamos justificar a não alteração dos picos relativos ao estiramento CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, relacionados com a presença da matriz bilipídica no estrato córneo humano, já que a papaína não tem preferência por este aminoácido especificamente.

Durante a última década, o ATR FT-IR tem sido usado para investigar a cinética de penetração no estrato córneo humano e elucidar o mecanismo de aumento da penetração percutânea *in vivo* e *in vitro*. No entanto existem algumas limitações quanto a sua aplicação já que a faixa típica de profundidade de amostras para o ATR FT-IR é de 0,7-2,1µm (HANH, 2001).

A espectroscopia fotoacústica pode ser utilizada para verificar perfis de penetração da substância ativa nas membranas estudadas, sem o auxílio de células de difusão.

É interessante notar que os espectros obtidos com a célula fotoacústica fornecem informações semelhantes aquelas obtidas com o ATR FT-IR, porém apresentam melhor resolução, além de apresentarem bandas relativas a transições não radiativas.

Verificamos no espectro fotoacústico da **figura 57** que ocorreram diferenças nos diversos tratamentos, sendo que o contato por 24 horas com

a solução de papaína 0,2% (p/v), deslocou ligeiramente as bandas de amidas, quando comparada com o controle e com os tratamentos por 4 e 48 horas.

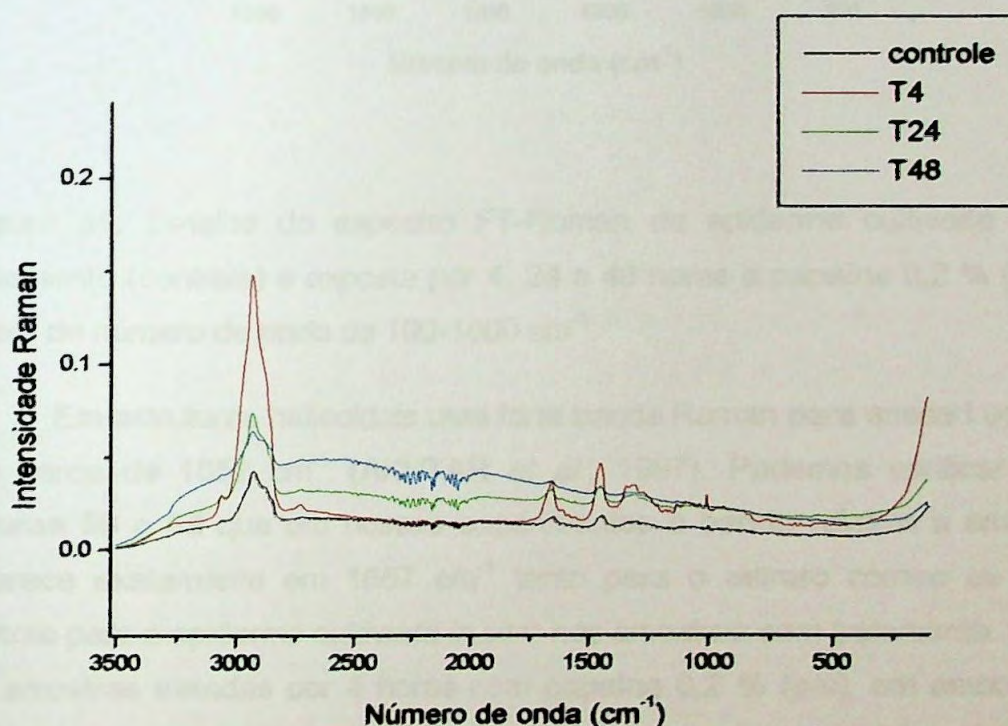
O espectro indicativo do tratamento por 48 horas apresenta diferenças nas bandas que ficam abaixo de  $1640\text{ cm}^{-1}$ , bandas estas relacionadas com desordens da amida III ( $1244\text{ cm}^{-1}$ ), alterações na  $\alpha$ -hélice da amida III ( $1274\text{ cm}^{-1}$ ) e anel aromático ( $1002\text{ cm}^{-1}$ ) (WILLIAMS & BARRY, 1994). Isto pode indicar que as alterações causadas por um tratamento mais prolongado com a papaína 0,2% (p/v) são mais intensas, ou de natureza permanente.

O espectro do tratamento com papaína por 4 horas é muito semelhante aquele do controle, demonstrando alterações mínimas causadas pelo promotor neste curto período de tempo.



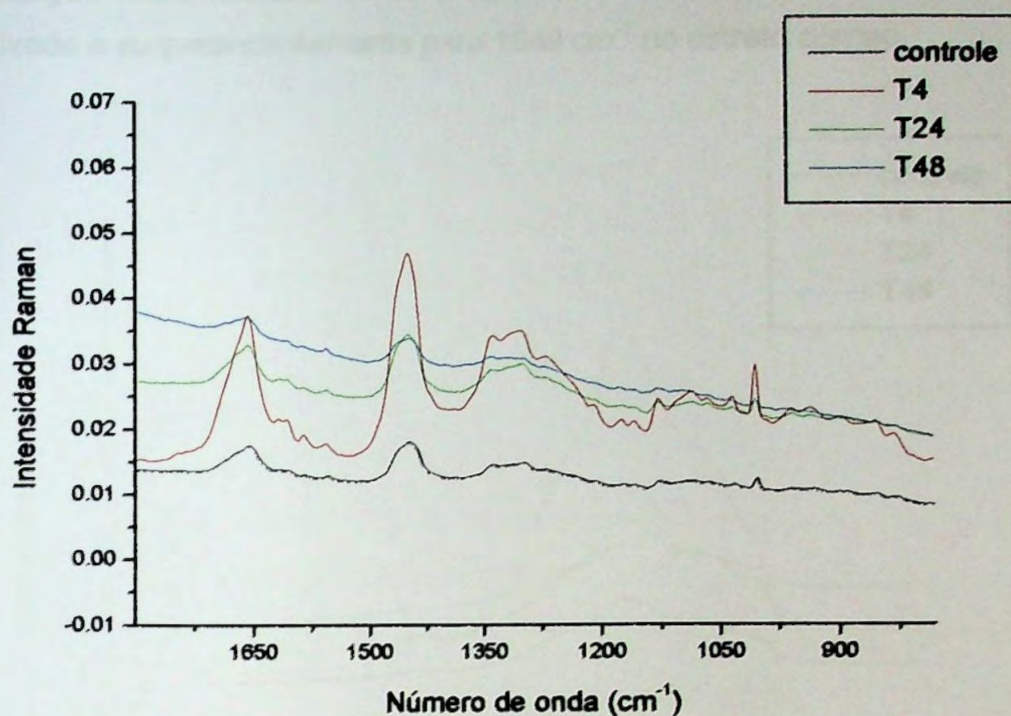
### 5.3.4 Espectroscopia FT- Raman

A espectroscopia FT-Raman forneceu informações adicionais sobre a estrutura e conformação das moléculas da pele. O número de ondas da epiderme cultivada difere ligeiramente daqueles do estrato córneo *ex vivo*. Informações sobre a matriz bilipídica são facilmente obtidos com os espectros Raman, mesmo no caso da epiderme cultivada. Em nossos experimentos a epiderme cultivada apresentou espectros de melhor definição, principalmente na região relativa a vibrações de estiramento C-H assimétrico e simétrico, como por exemplo, dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  que absorvem na região de  $3100\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$  e estão relacionados aos lipídeos (figura 58).



**Figura 58.** Espectro FT-Raman da epiderme cultivada sem tratamento (controle) e exposta por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). Faixa de número de onda de  $100\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ .





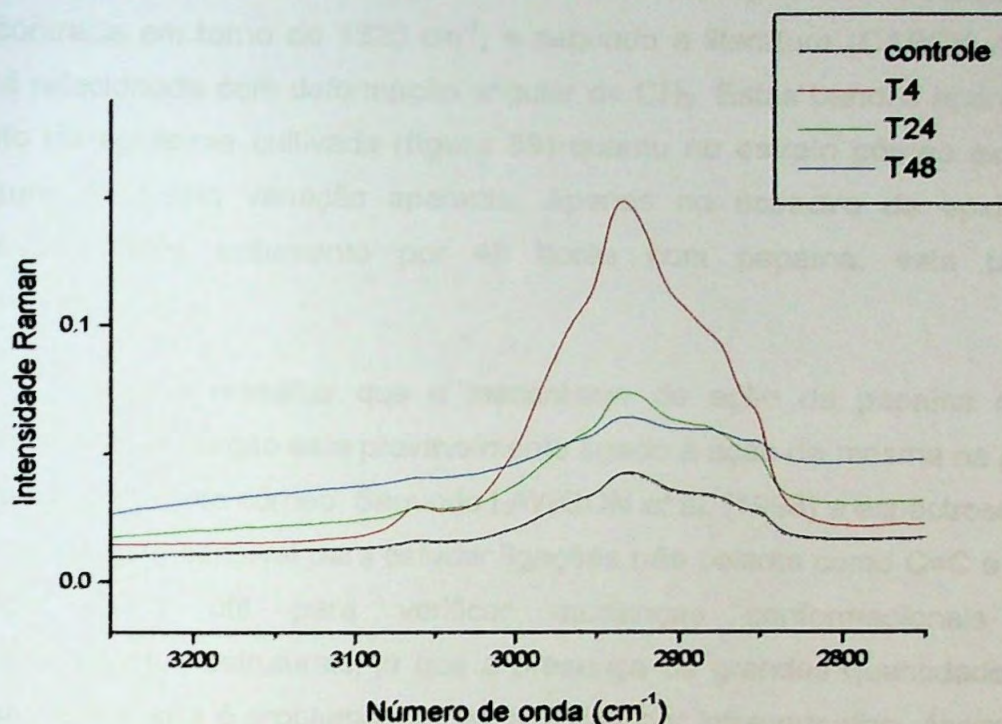
**Figura 59.** Detalhe do espectro FT-Raman da epiderme cultivada sem tratamento (controle) e exposta por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). Faixa de número de onda de 100-1800  $\text{cm}^{-1}$ .

Em estruturas helicoidais uma forte banda Raman para amida I ocorre em cerca de  $1652 \text{ cm}^{-1}$  (AKHTAR *et al.*, 1997). Podemos verificar nas **figuras 59 e 62** que em nossos experimentos a banda relativa a amida I aparece exatamente em  $1657 \text{ cm}^{-1}$  tanto para o estrato córneo *ex vivo* quanto para a epiderme cultivada *in vitro* nas amostras sem tratamento. Para as amostras tratadas por 4 horas com papaína 0,2 % (p/v), em ambos os casos houve pouca alteração, porém as amostras tratadas por 24 e 48 horas com o promotor de absorção, apresentaram deslocamento dos picos relativos a esta vibração espectral.

O tratamento por 24 horas levou a um deslocamento de  $1657 \text{ cm}^{-1}$  para  $1661 \text{ cm}^{-1}$  no caso da epiderme cultivada *in vitro* e de  $1657 \text{ cm}^{-1}$  para  $1665 \text{ cm}^{-1}$  no estrato córneo *ex vivo*. Já o tratamento por 48 horas provocou



mudanças mais radicais variando até  $1671\text{ cm}^{-1}$  no caso da epiderme cultivada e surpreendentemente para  $1649\text{ cm}^{-1}$  no estrato córneo.



**Figura 60.** Espectro FT-Raman da epiderme cultivada sem tratamento (controle) e exposta por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). Faixa de número de onda de  $2750\text{--}3250\text{ cm}^{-1}$ .

Uma outra banda evidente em espectros de estrato córneo humano e que são facilmente reconhecidos utilizando o FT-Raman, são as bandas que aparecem em torno de  $1438\text{ cm}^{-1}$  e estão relacionadas com a deformação angular do  $\text{CH}_2$ . Ao analisarmos a **figura 58**, verificamos a presença de bandas fortes na epiderme cultivada controle e naquela tratada com papaína 0,2% (p/v) por 4 horas. No estrato córneo *ex vivo* (**tabela 19**) estas bandas aparecem ligeiramente deslocadas em relação ao controle.

O modo de amida III descrito na **tabela 16** é uma banda imperceptível na espectroscopia infravermelho, porém é uma das mais importantes nos espectros Raman (AKHATAR *et al.*, 1997). Aparece normalmente entre

1400-1200  $\text{cm}^{-1}$ , porém é um componente significativo de vários modos, portanto, não sendo tão simples relacioná-la com conformações estruturais.

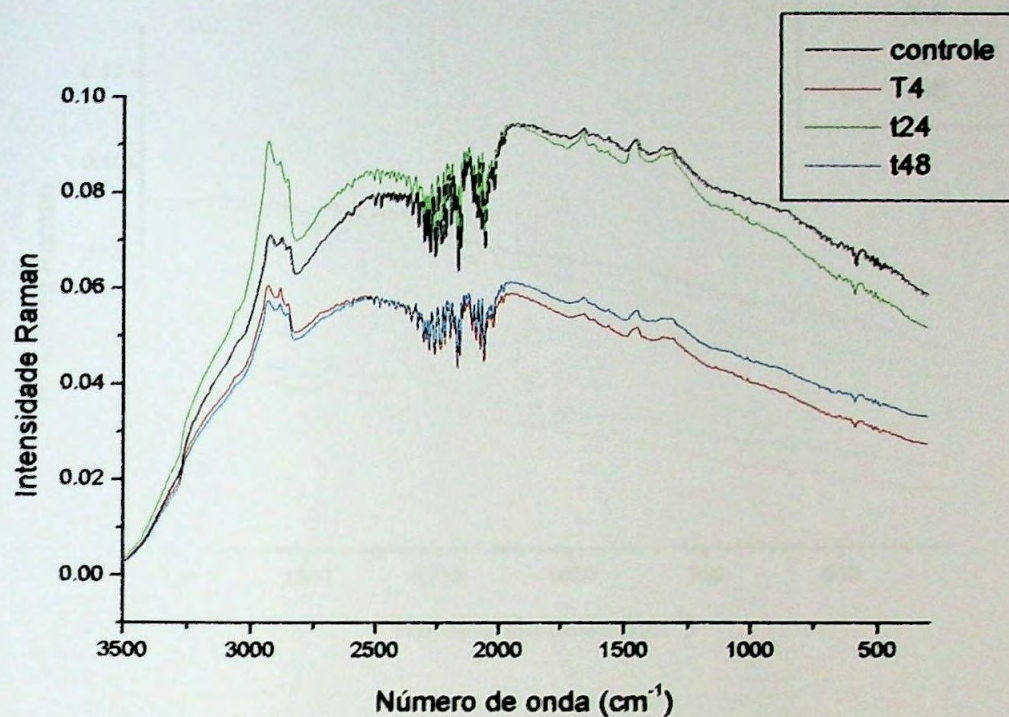
Uma outra banda característica em nossos espectros FT-Raman foi encontrada em torno de 1320  $\text{cm}^{-1}$ , e segundo a literatura (CAREY, 1982) está relacionada com deformação angular de  $\text{CH}_2$ . Estas bandas aparecem tanto na epiderme cultivada (**figura 59**) quanto no estrato córneo *ex vivo* (**figura 62**), sem variação aparente. Apenas no espectro de epiderme cultivada após tratamento por 48 horas com papaína, esta banda desaparece.

Devemos ressaltar que o mecanismo de ação da papaína como promotor de absorção esta provavelmente ligado a ação da mesma na parte protéica do estrato córneo. Segundo LAWSON *et al.* (1998) a espectroscopia Raman é mais sensível para estudar ligações não polares como C=C e S-S, sendo muito útil para verificar mudanças conformacionais em hidrocarbonetos estruturais, já que a presença de grandes quantidades de água na amostra é problemática nas análises por infravermelho. Assim não pudemos observar diferenças radicais em nossos espectros obtidos com FT-Raman.

Os efeitos da hidratação do tecido nos espectros FT-Raman são mínimos, e causam poucas mudanças na intensidade das bandas das moléculas ou na posição de número de onda das bandas espectrais (WILLIAMS *et al.*, 1993).

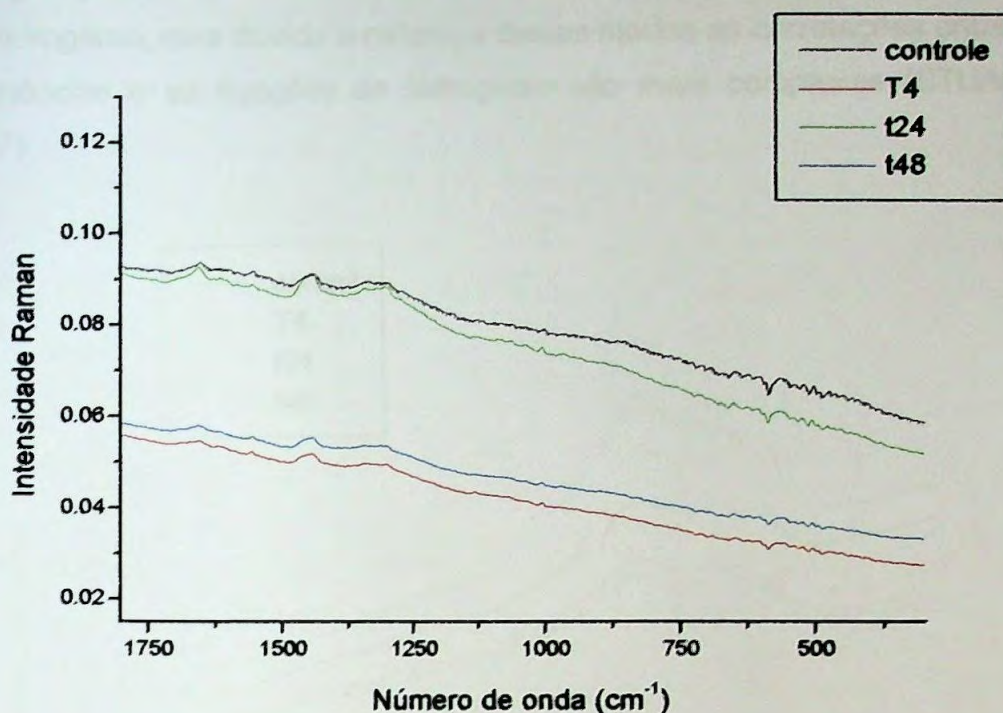
Segundo WILLIAMS *et al.* (1993), a variação dos espectros inter e intra amostras é mínima. A diferença entre a intensidade das bandas de diferentes doadores é esperada devido ao conteúdo lipídico do estrato córneo. Os mesmos autores reportam também diferenças entre o número de onda da vibração de estiramento C-H entre amostras *in vivo* e *in vitro*. Este fato também pode ser comprovado em nossos experimentos onde as amostras de estrato córneo *ex vivo* e epiderme cultivada *in vitro*, apresentaram deslocamento da faixa de bandas do supra citado estiramento.





**Figura 61.** Espectro FT-Raman do estrato córneo humano sem tratamento (controle) e exposto por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). Faixa de número de onda de 250-3500 cm<sup>-1</sup>.





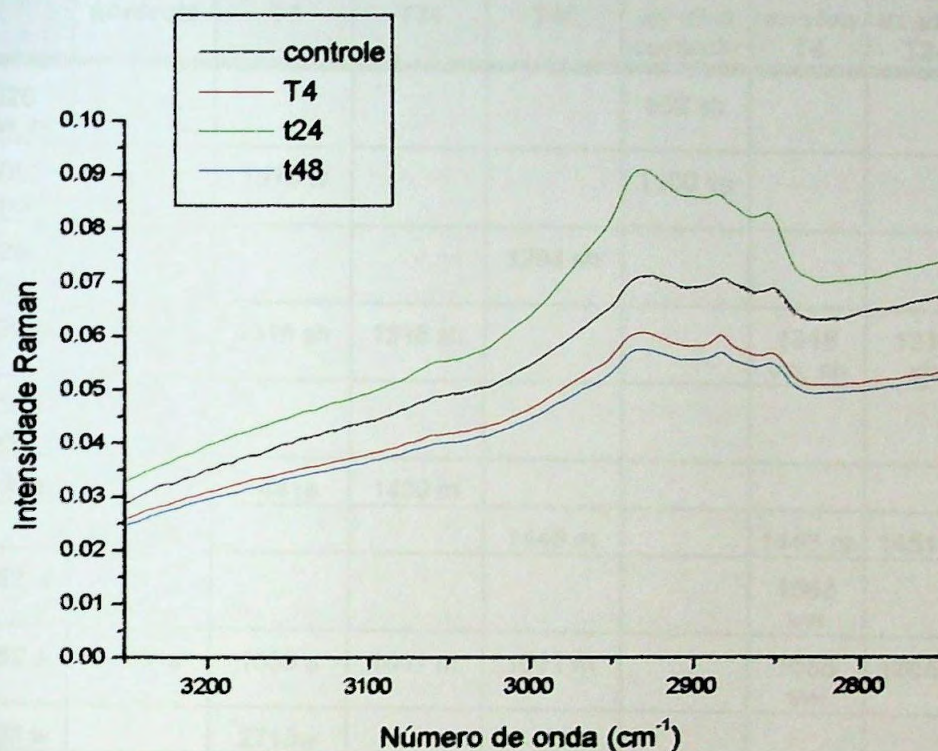
**Figura 62.** Detalhe do espectro FT-Raman do estrato córneo humano sem tratamento (controle) e exposto por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). Faixa de número de onda de 900-1800  $\text{cm}^{-1}$ .

Enquanto as bandas de amida II são muito fortes no espectro infravermelho, estas aparecem muito fracas no espectro Raman (AKHTAR *et al.*, 1997). Aqui, mais uma vez, nossos resultados corroboram com a literatura, já que não conseguimos visualizar de forma clara as bandas relativas a este modo vibracional (**figuras 59 e 62**).

Amidas secundárias na configuração *trans* exibem duas bandas características em 3300 e 3100  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto aquelas em configuração *cis*, apresentam duas bandas em 3200 e 3100  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em 3300-3200  $\text{cm}^{-1}$  é uma banda de amida A, relacionada ao modo de estiramento da ligação N-H, onde o hidrogênio está ligado. A banda de amida B ocorre em 3100  $\text{cm}^{-1}$  e está relacionada com a ressonância Fermi da vibração de estiramento N-H, com harmônica da vibração de amida II da configuração *trans*, combinada ao estiramento C-O e deformação angular N-H, no plano, para a



configuração *cis*. As bandas de amida A e B são muito sensíveis a ligação de hidrogênio, mas devido a natureza destes modos as correlações entre as frequências e as ligações de hidrogênio são mais complexas (STUART, 1997).



**Figura 63.** Detalhe do espectro FT-Raman do estrato córneo humano sem tratamento (controle) e exposto por 4, 24 e 48 horas a papaína 0,2 % (p/v). faixa de número de onda de 2750-3250  $\text{cm}^{-1}$ .



**Tabela 19.** Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) encontrados nos espectros obtidos com espectroscopia Raman com transformadas de Fourier.

Raman	Epitélio cultivado controle	Epitélio cultivado T4	Epitélio cultivado T24	Epitélio cultivado T48	Estrato córneo ex vivo controle	Estrato córneo ex vivo T4	Estrato córneo ex vivo T24	Estrato córneo ex vivo T48
526 mw, br					562 sh			
1082 mw	1092 w	1079 w			1100 vs			
1296 ms				1294 sh				
1336 m	1320 sh	1316 sh	1316 sh			1318 vw, sh	1316 sh	1314 sh
1385 vw								
1438 s		1441s	1439 m					
	1449 s			1445 m		1445 m	1451 m	1445 m
1552 w						1563 vw		
1652 s	1657 s	1653 s	1661 m	1671 m		1655 vw	1665 w	1649 w
2723 w		2718w						
2852 m								
2883 ms			2880 sh	2880 sh	2878 sh	2876 sh	2882 sh	2876 sh
2931 s	2934 vs sh	2926 vs,sh	2936 vs sh	2936 vs, sh	2922 sh	2930 m sh	2936 m sh	2924 m sh

V = muito (very); s = forte (strong); m= médio (medium); w = fraco (weak); sh = ombro (shoulder); br = largo (broad); v = estiramento (stretching);  $\delta$  = deformação (deformation);  $\rho$  = balanço (rock).

#### **5.4 Microscopia eletrônica de transmissão**

Os dados obtidos com a microscopia eletrônica reforçam ainda mais a idéia de que ocorrem alterações, sugeridas pelos demais métodos biofísicos. Ao analisarmos as **fotos A, B, C e D da figura 80** percebemos alterações no citoesqueleto do estrato córneo, inclusive com perda das regiões de coesão, função esta ligada aos corneossomos ou corneodesmossomos. É interessante notar que no tratamento por 48 horas com papaína (**figura 86**), a estrutura parece estar intacta, ou pelo menos recuperada.

A aparência ultraestrutural dos corneodesmossomos sugere que eles são modificados durante a transição entre a epiderme viável e a queratinizada. Parte desta modificação pode ser devida a incorporação de proteínas, as corneodesmossinas. Esta proteína possui peso molecular de 52 kDa (ou  $g\ mol^{-1}$ ) e é exclusivamente expressa no epitélio queratinizado. No estrato granuloso é encontrada intracelularmente em associação com corpos lamelares. Na zona de transição entre o estrato granuloso e o estrato córneo, coincidindo com a mudança da aparência ultraestrutural dos desmossomos, a corneodesmossina é transportada para a parte extracelular dos desmossomos, sendo continuamente degradada a componentes menores no estrato córneo (ELGERUD *et al.*, 1996).

As enzimas podem interferir na permeação cutânea, quer favorecendo ou impedindo a absorção de substâncias ativas, portanto podem ser utilizadas como promotores ou retardadores. É interessante notar que o processo natural de substituição da pele é controlado por meio de enzimas específicas que dissolvem os desmossomos, liberando as células mortas da superfície da pele. Essas enzimas são produzidas nos queratinócitos, sendo os grupos sulfidrilas os pontos ativos que rompem as ligações peptídicas, muito mais que o ácido triglicólico e a cisteína.

Uma bem regulada descamação é um pré-requisito para a função do estrato córneo e para a aparência de uma pele normal. Os estudos sobre a coesão celular no estrato córneo e o papel de enzimas proteolíticas na

descamação ainda não conseguiram esclarecer totalmente estes mecanismos. Esclarecer doenças de pele hereditárias e os distúrbios de formação do estrato córneo ou de seu "turnover" podem ajudar a entender este complexo sistema levando a compreender as propriedades de barreira do estrato córneo assim como a sua descamação (ELGERUD, 2000).

A primeira enzima descoberta, com reconhecida atividade sobre os corneodesmossomos, foi a SCCE (ELGERUD, 1996), seguida de outras, como a SCCL, SCTE e SCTP, demonstrando que este processo tão complexo não é realizado por apenas uma, mas várias enzimas, cujo exato papel neste processo não está completamente elucidado.

Recentemente, BERNARD *et al.* (2003), publicaram estudo onde descrevem uma proteinase tiol, expressa provavelmente como uma pró-enzima nas camadas mais internas da epiderme, parcialmente ativada por um mecanismo ainda não identificado nas camadas superiores, durante a diferenciação dos queratinócitos.

A involucrina foi a primeira proteína a ser identificada como um constituinte do envelope de células cornificadas insolúveis do epitélio estratificado descamativo. Pesquisadores com STEINERT & MAAREKOV (1997), assim como LAZO & DOWNING (1999), vêm estudando como esta proteína estabelece ligações entre os corneócitos e mesmo com os corneodesmossomos.

Existe uma abundância de ligações cruzadas entre a involucrina e a sequência terminal carboxílica das desmoplaquinas. Esta é a proteína estrutural em maior quantidade nos desmossomos. Enquanto parte dela está ancorada nas junções celulares, uma barra central projeta-se no citoplasma, acredita-se que uma série de domínios de peptídeos repetitivos no terminal carboxila interagem direta ou indiretamente com os filamentos intermediários do citoesqueleto (STEINERT & MAAREKOV, 1997).

Corroborando com os autores, foi possível visualizar através de imagens de microscopia eletrônica de transmissão que após o tratamento por 24 horas com papaína, o estrato córneo *ex vivo*, apresentou perda da integridade destas estruturas (**figura 80**), e que aparentemente, o tratamento



por 48 horas, apresentou estas estruturas intactas nas primeiras camadas do estrato córneo (**figura 86**).

Os autores STEINERT & MAAREKOV (1997) também propõe, a interessante possibilidade de que a ligação da involucrina nas proteínas desmossomais pode ser o primeiro passo para a formação do envelope cornificado.

Na **figura 64** podemos observar a presença das camadas que compõe a epiderme humana: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e o estrato córneo. No aumento de 100 x da figura descrita anteriormente, podemos notar a preservação do tecido (**figura 65**).

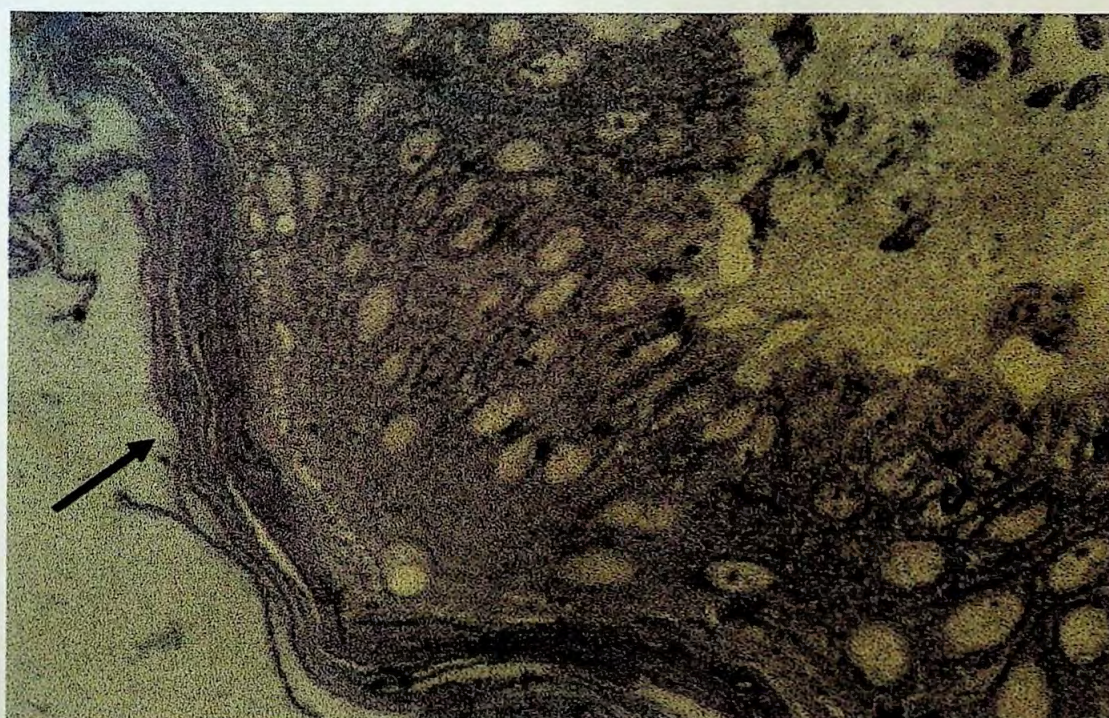
A morfologia característica da camada córnea em epiderme humana foi observada nas **figuras 66, 67 e 68**, onde os corneodesmossomos aparecem caracterizados por uma placa mais densa, entre os envelopes cornificados de querato-hialina.

Segundo BOZOLLA & RUSSELL (1992), os desmossomos ou *mácula aderente* formam estruturas como placas, que em cortes finos apresentam aparência similar a zonas aderentes, porém os desmossomos contêm uma linha densa intermediária e definida, que é encontrada no espaço intercelular, paralela a superfície. Filamentos intermediários, geralmente compostos de queratina (tonofilamentos) fazem voltas grampeadas, na junção mais densa. Junções de aderência, como o próprio nome indica, são importantes na adesão célula-célula. Elas conferem ao tecido, coesão, resistindo a forças que tendem a separar as células.



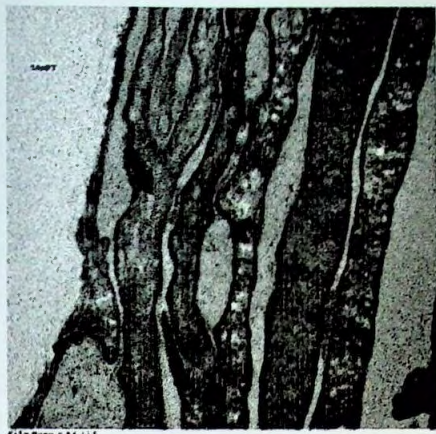


**Figura 64.** Fotografia da epiderme humana controle (sem tratamento).  
Microscopia óptica, aumento x 40.

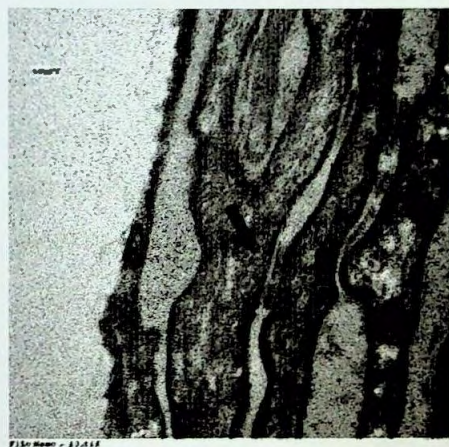


**Figura 65.** Fotografia da epiderme humana controle (sem tratamento).  
Microscopia óptica, aumento x 100.





**Figura 66.** Fotografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia eletrônico de transmissão x 30.000



**Figura 67.** Fotografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia eletrônica de transmissão x 50.000



**Figura 68.** Fotografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia eletrônica de transmissão x 50.000. Observar os comeodesmosomos, caracterizados por uma placa mais densa (seta).



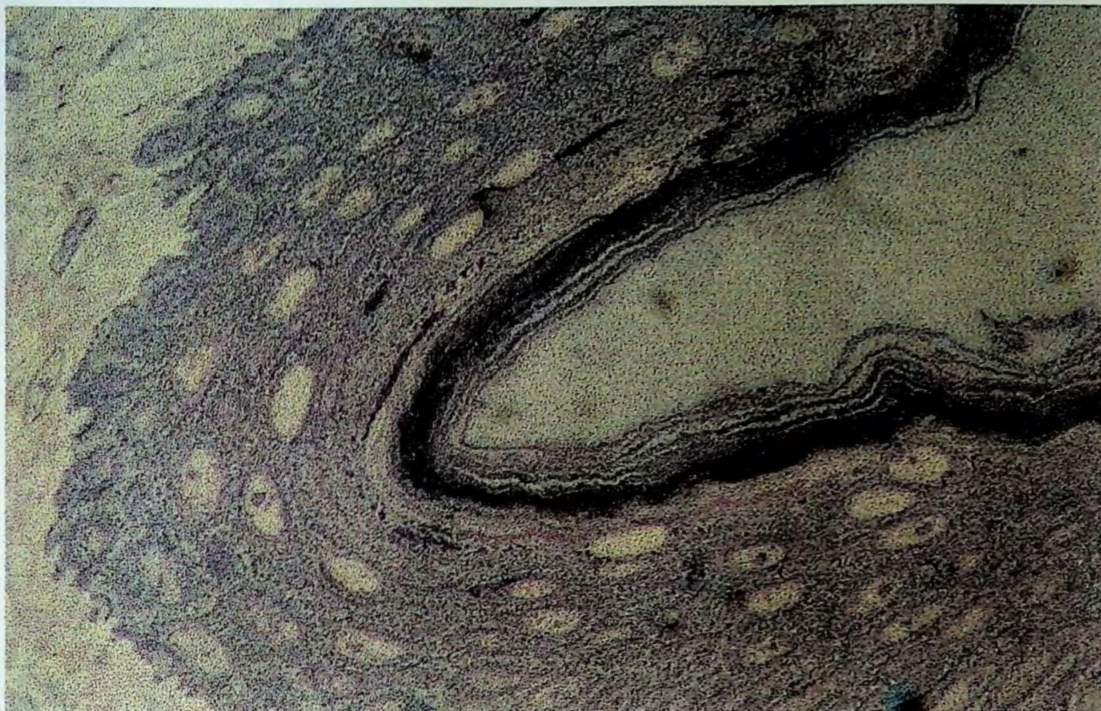


**Figura 69.** Fotografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia eletrônica de transmissão, aumento x 50.000. Observar os corneodesmosossomos ligando os corneócitos.



**Figura 70.** Fotografia da epiderme humana controle (sem tratamento). Microscopia eletrônica de transmissão, aumento x 75.000.

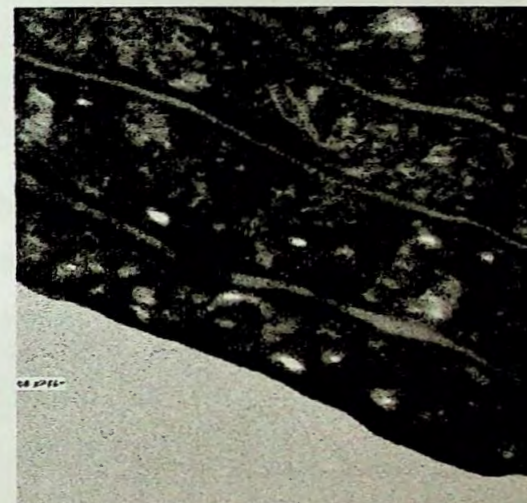
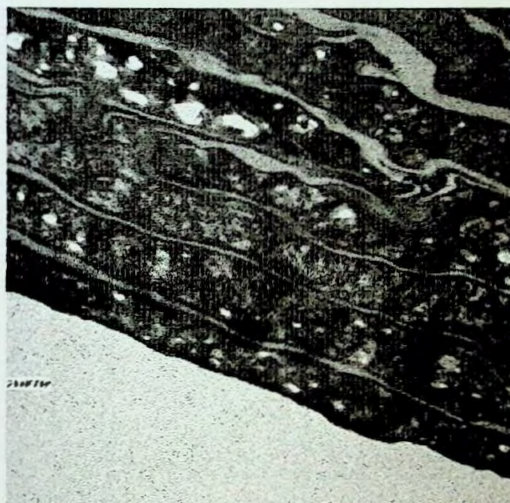
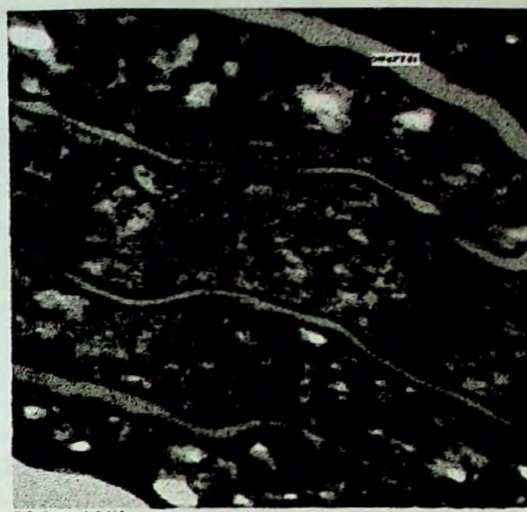
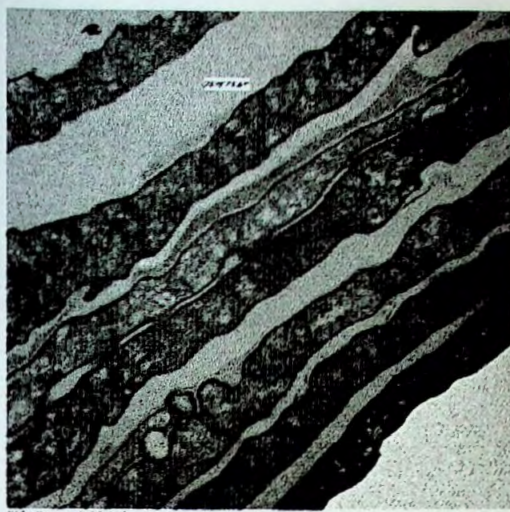




**Figura 71.** Fotografia da epiderme humana após tratamento por 4 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia óptica, aumento x 100.

Nas figuras 71 e 72 podemos visualizar a microscopia óptica e eletrônica de transmissão da epiderme humana tratada por 4 horas com papaína 0,2% (p/v), onde não se observam alterações conclusivas quando comparadas ao controle (figuras 67 a 70).



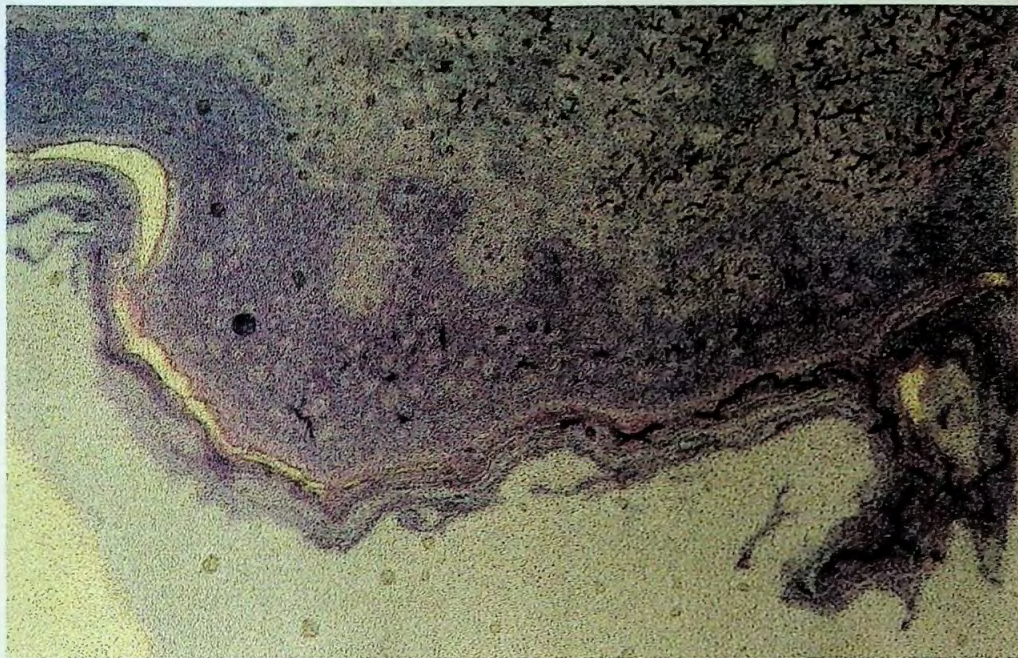


**Figura 72.** Fotografia da epiderme humana após tratamento por 4 horas com papaína 0,2% (p/v) e período de recuperação de 44 horas. Microscopia eletrônica de transmissão. A = aumento x 20000; B = aumento x 50000; C = aumento x 25000; D = aumento x 50000.

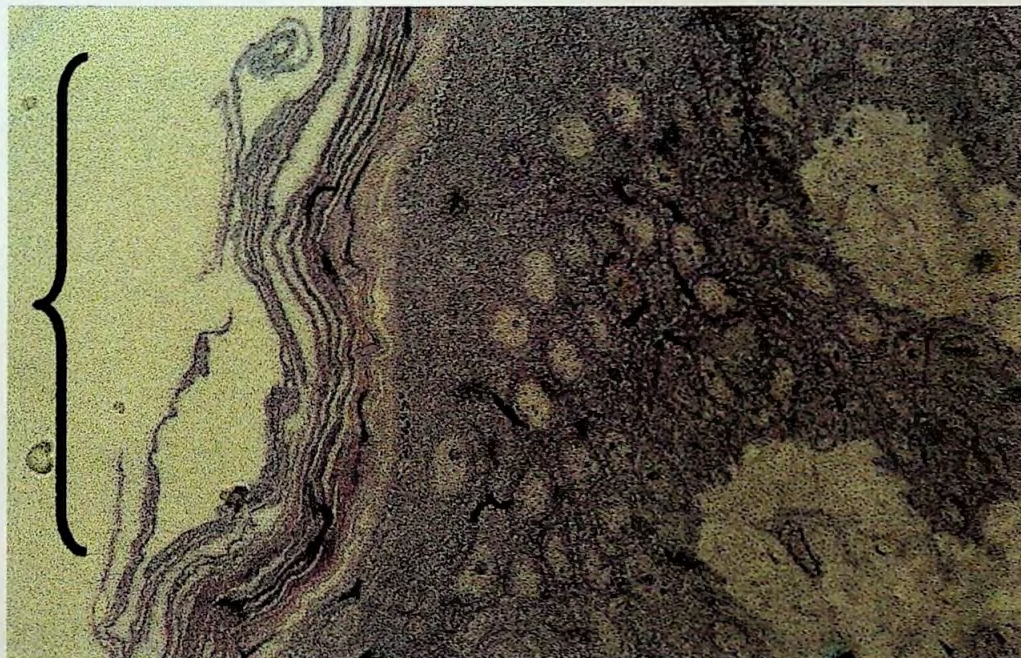
Quando analisamos as **figura 73 e 74**, referentes a microscopia óptica do estrato córneo tratado com papaína por 24 horas, observamos que as camadas celulares, características deste tecido, permanecem constantes. Porém é interessante notar que na microscopia óptica as camadas do



estrato córneo já aparentam estar se soltando mais facilmente que nos demais tratamentos.



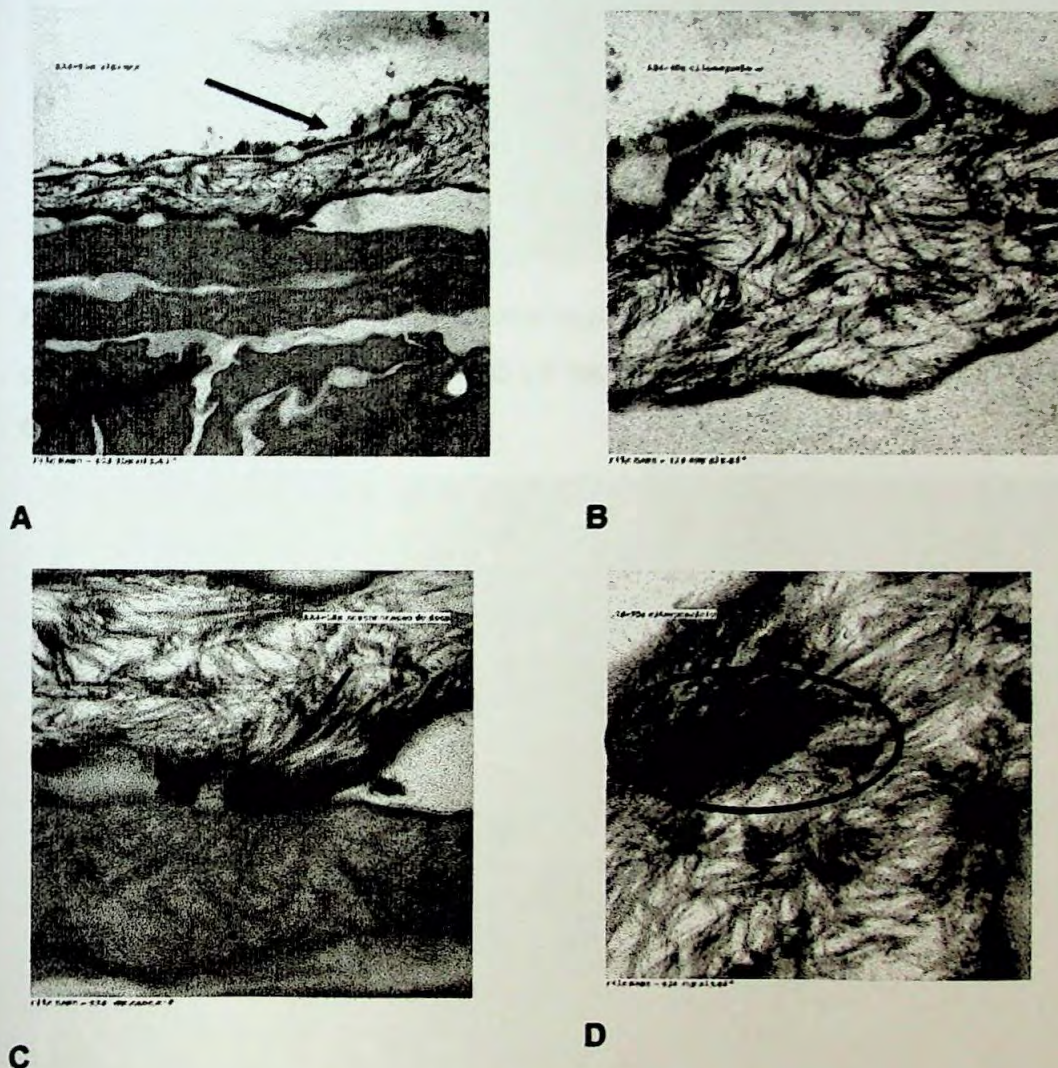
**Figura 73.** Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia óptica, aumento x 40.



**Figura 74.** Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia óptica, aumento x 100.

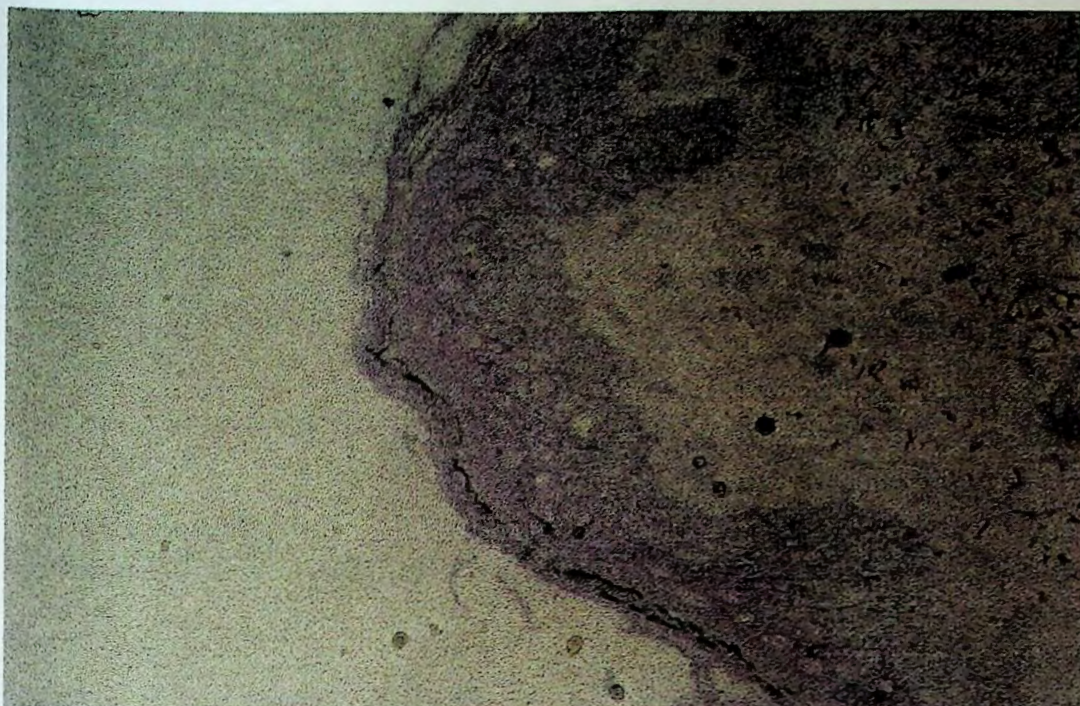


Na **figura 75**, foto A, visualizamos a primeira camada de queratina se desprende do estrato córneo. Na foto B, observamos, em detalhe o citoesqueleto, formado por microfilamentos. Na foto C, é possível verificar uma massa de desmossomos ou corneodesmossomos, sendo desprendidos. Esta figura corresponde ao tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v). É interessante notar que o material da matriz bilipídica, localizado entre os corneócitos, permanece intocado, mesmo com todas as alterações decorrentes do tratamento com papaína (**foto A**).

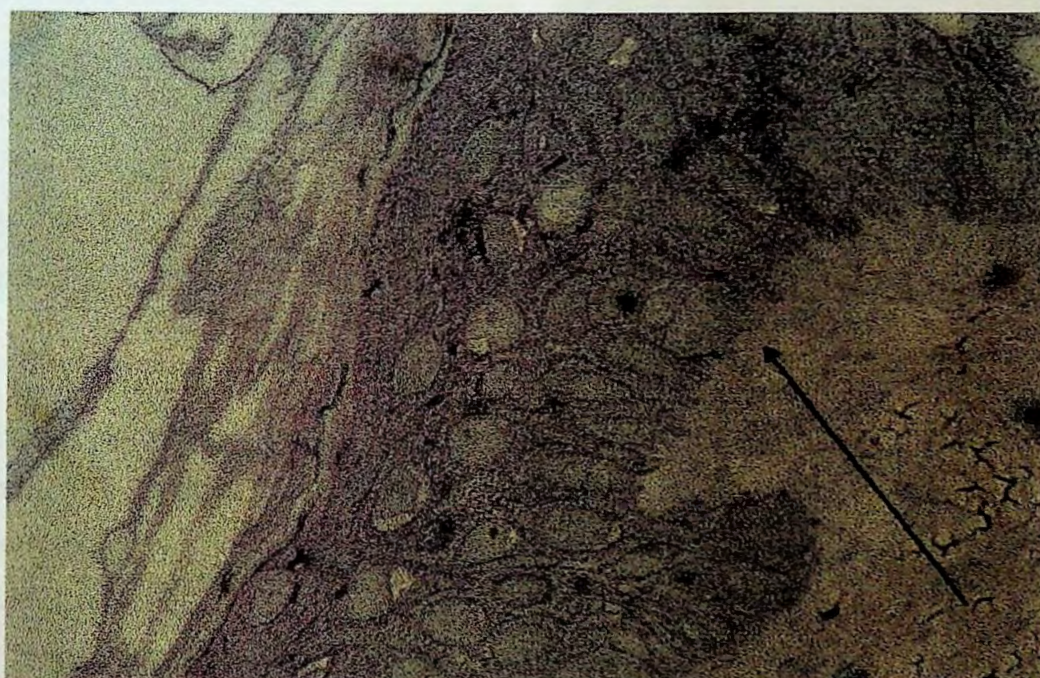


**Figura 75.** Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia eletrônica de transmissão, A = x 15000, última camada; B = x 40000, citoesqueleto; C = x 50000, concentração de desmossomos; D = x 75000, citoesqueleto.



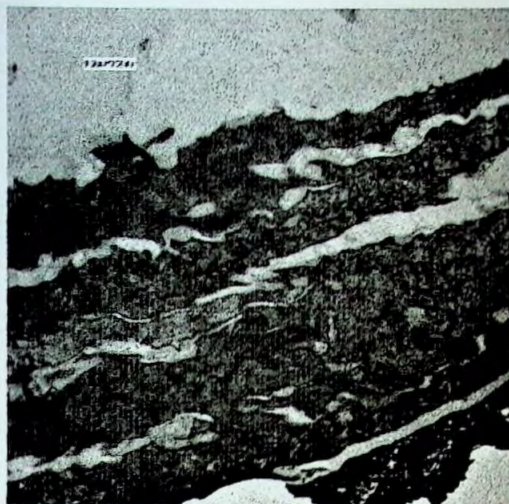


**Figura 76.** Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v) e período de recuperação de 24 horas. Microscopia óptica, aumento x 40.

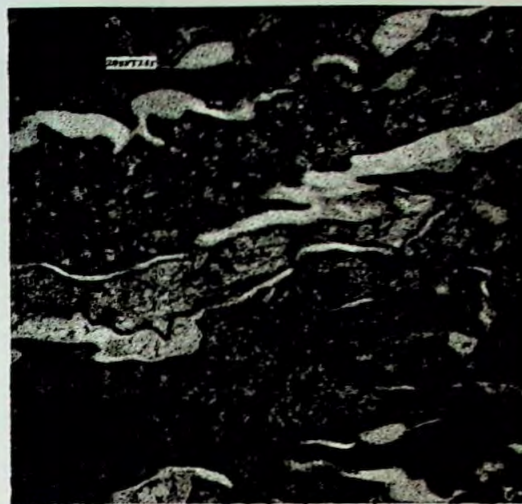


**Figura 77.** Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v) e período de recuperação de 24 horas. Microscopia óptica, aumento x 100.





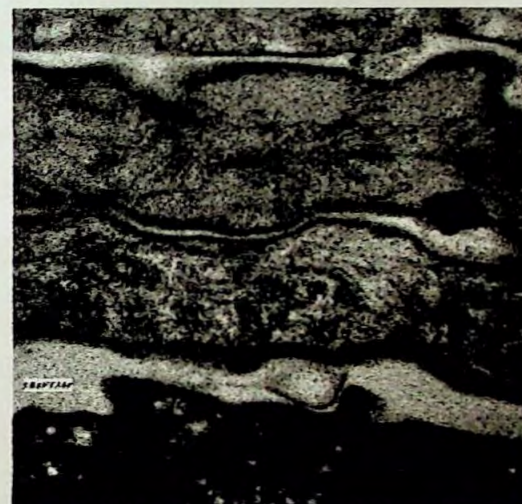
A



B



C



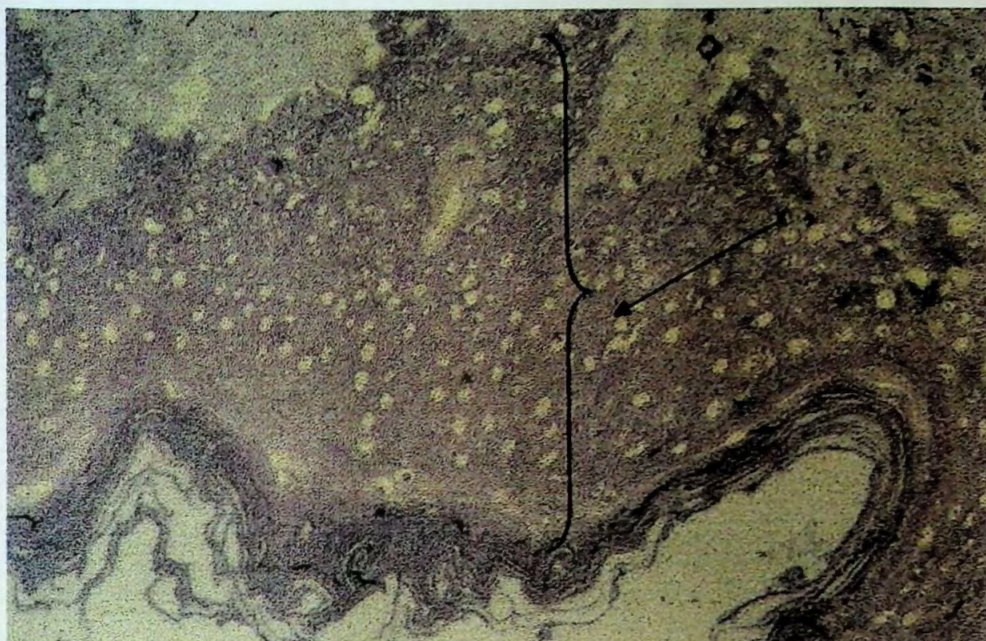
D

**Figura 78.** Micrografia da epiderme humana após tratamento por 24 horas com papaína 0,2% (p/v) e período de recuperação de 24 horas. Microscopia eletrônica de transmissão, A = x 10000; B = x 20000; C = x 50000; D = x 50000.

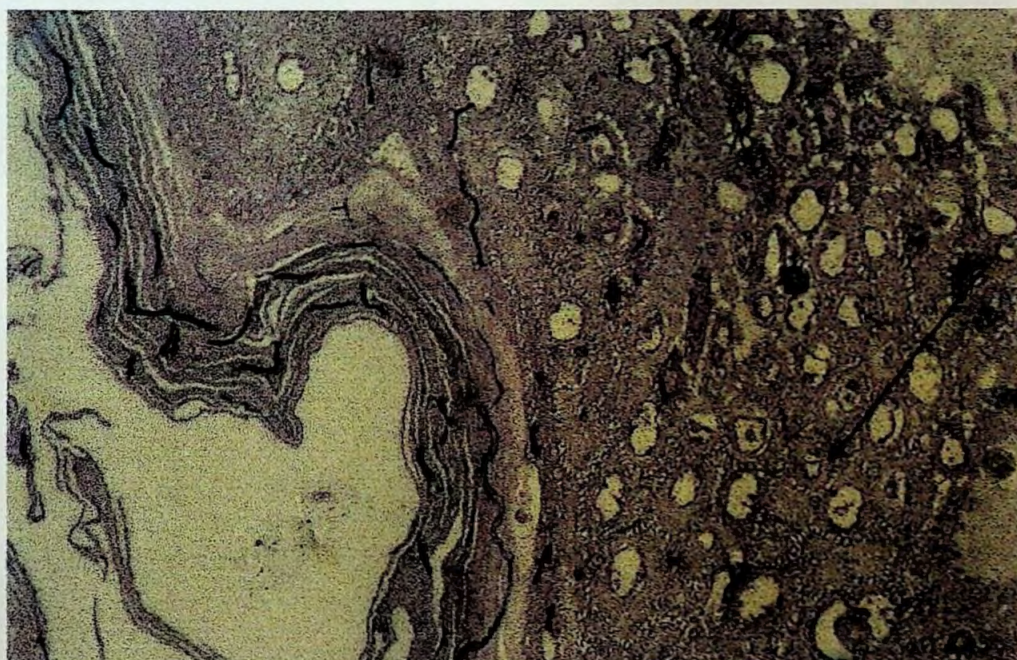
As figuras 76, 77 e 78 mostram o tratamento com papaína após 24 horas de recuperação em meio de cultura. Podemos visualizar que apesar das camadas aparentemente estarem mais coesas, o estrato córneo ainda se apresenta mais solto (figura 77). Na figura 78 não conseguimos localizar



facilmente os corneodesmosomos, podendo indicar que os mesmos não foram recuperados.

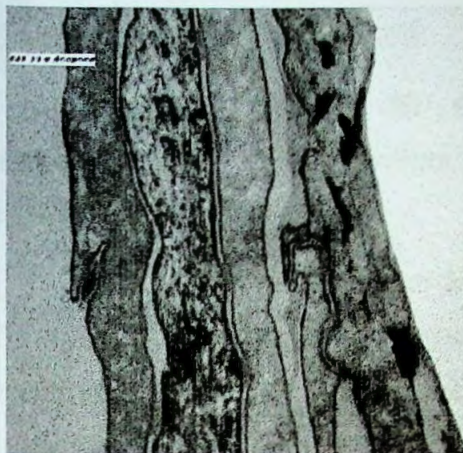


**Figura 79.** Micrografia da epiderme humana após tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia óptica, aumento x 40.



**Figura 80.** Micrografia da epiderme humana após tratamento por 48 horas com papaína 0,2% (p/v). Microscopia óptica, aumento x 100.





**A**



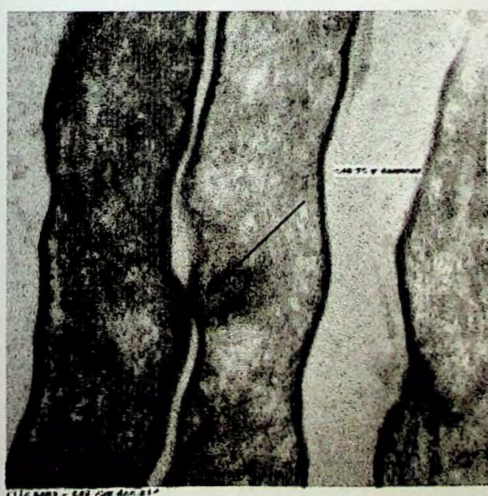
**B**



**C**



**D**



**E**

**Figura 81.** Micrografia da epiderme humana após 48 horas de tratamento com papaína 0,2 % (p/v). Microscopia eletrônica de transmissão, A = x 30.000; B= x 30000, desmosomos; C = x 60000, desmosomos; D= x 60000; E = x 75000



O mesmo não acontece com o estrato córneo tratado por 48 horas, onde conforme podemos observar nas **figuras 79 e 80**, existem maior número de células por camada.

Ainda na **figura 80** é possível verificar a presença das desmoplaquinas, glicoproteínas conhecidas como “colas” do material extracelular.

A microscopia eletrônica de transmissão do estrato córneo tratado por 48 horas (**figura 81**), nos mostra que a primeira camada do estrato córneo permanece intacta, enquanto ocorre o aparecimento do citoesqueleto da queratina apenas na segunda camada (**foto A, B, C e D**). É possível notar também a manutenção dos corneodesmosomos (**foto E**).

Um possível mecanismo de ação da papaína no estrato córneo poderia ser a competição entre a papaína e a transglutaminase (uma enzima dependente de cálcio que catalisa a formação de interproteínas, isto é ligações covalentes entre resíduos de Gln e Lys dos peptídeos), responsável pela formação do envelope cornificado ao redor dos corneócitos. Foram identificadas proteínas S100 nos envelopes cornificados, suspeitas de serem o sítio de ação das transglutaminases e, portanto responsáveis pela manutenção da coesão celular entre os corneócitos. Foram identificados os resíduos ativos e estes são também Gln e Lys.

## **6. CONCLUSÕES**

- A papaína demonstrou não ser citotóxica e segura neste teste já que permitiu a recuperação dos queratinócitos humanos em todos os estágios de cultura celular testados e em todos os intervalos de tempo avaliados, levando a formação de epitélios ao final de 21 dias;
- A eficácia da papaína como promotor de absorção cutâneo foi comprovada através dos métodos biofísicos onde foi observada a desestruturação dos componentes do estrato córneo, o que permite a passagem de substâncias ativas através da pele;



## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\***

---

\*De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

- AKHTAR, W.; EDWARDS, H.G.M.; FARWELL, D.W.; NUTBROWN, M.  
Fourier-transform Raman spectroscopy study of human hair.  
*Spectrochim. Acta, Part A*, Amsterdam, v.53, p.1021-1031, 1997.
- ALBERTI, I.; KALIA, Y.N.; NAIK, A.; BONNY, J.D.; GUY, R.H. In vivo  
assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum  
comeum. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.71, p.319-327, 2001.
- AL-SAIDAN, S.M.; BARRY, B.W.; WILLIAMS, A.C. Differential scanning  
calorimetry of human and animal stratum comeum membranes. *Int. J.*  
*Pharm.*, Amsterdam, v.168, p.17-22, 1998.
- ALTERNATIVE TO ANIMAL TESTING ON THE WEB: REDUCTION,  
REFINEMENT, REPLACEMENT. Disponível em:  
<http://altweb.jhsph.edu/regulations/cosmetic.htm>. Acesso em: 11 set.  
2002.
- ANDREW, J.J.; BROWNE, M.A.; CLARK, I.E.; HANCEWICZ, T.M.;  
MILLICHOPE, A.J. Raman imaging of emulsion systems. *Appl.*  
*Spectrosc.*, Frederick, v.52, p.790-795, 1998.
- ANIGBOGU, A.N.C.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W.; EDWARDS, H.G.M.  
Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the  
penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum comeum. *Int.*  
*J. Pharm.*, Amsterdam, v.125, p.265-282, 1995.
- ARMSTRONG, C.L.; EDWARDS, H.G.M.; FARWELL, D.W.; WILLIAMS, A.C.  
Fourier transform Raman microscopic study of drug distribution in a  
transdermal drug delivery device. *Vib. Spectrosc.*, Amsterdam, v.11,  
p.105-113, 1996.
- ARNON, R. Papain. *Methods Enzymol.*, New York, v.19, p.226-244, 1970.
- AUGUSTIN, C.; COLLOMBEL, C.; DAMOUR, O. Measurements of the  
protective effect of topically applied sunscreens using *in vitro* three-

- dimensional dermal and skin equivalents. *Photochem. Photobiol.*, Lawrence, v.66, p.853-859, 1997.
- AUGUSTIN, C.; FREI, V.; PERRIER, E.; HUC, A.; DAMOUR, O. A skin equivalent model for cosmetological trials: an in vitro efficacy study of a new biopeptide. *Skin Pharmacol.*, Basel, v.10, p.63-70, 1997.
- BAESSO, M.L.; SNOOK, R.D.; ANDREW, J.J. Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy to study the penetration of substances through skin. *J. Phys. IV*, Les Ulis, v.4, n.7, p.449-451, 1994.
- BAESSO, M.L.; LOWE, R.D.; SNOOK, R.D. Photothermal spectrometry for membrane and interfacial region studies. *Analyst*, Letchworth, v.123, p.587-593, 1998.
- BAESSO, M.L.; SHEN, J.; SNOOK, R.D. Laser-induced photoacoustic signal phase study of stratum corneum and epidermis. *Analyst*, Letchworth, v.119, p.561-562, 1994.
- BARRANDON, Y.; GREEN, H. Three clonal types of keratinocytes with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v.84, p.2302-2306, 1987.
- BARRY, B.W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption.** New York: Marcel Dekker, 1983. v.18, cap.1, p.1-48.
- BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.14, p.101-114, 2001.
- BARRY, B.W.; EDWARDS, H.G.M.; WILLIAMS, A.C. Fourier transform raman and infrared vibrational study of human skin: assignment of spectral bands. *J. Raman Spectrosc.*, Bognor Regis, v.23, p.641-645, 1992.



- BENASSI, L.; BERTAZZONI, G.; SEIDENARI, S. In vitro testing of tensides employing monolayer cultures: a comparison with results of patch tests on human volunteers. *Contact Dermatitis*, Copenhagen, v.40, p.38-44, 1999.
- BENTLEY, M.V.L.B.; KEDOR, E.R.M.; VIANNA, R.F.; COLLETT, J.H. The influence of lecithin and urea on the in vitro permeation of hydrocortisone acetate through skin from hairless mouse. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.146, p.255-262, 1997.
- BERGH, B.A.I.V.D.; VROMM, J.; GERRITSEN, H.; JUNGINGER, H.E.; BOUWSTRA, J.A. Interactions of elastic and rigid vesicles with human skin in vitro: electron microscopy and two-photon excitation microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1461, p.155-173, 1999.
- BERNARD, D.; MÉHUL, B.; THOMAS-COLLIGNON, A.; SIMONETTI, L.; REMY, V.; BERNARD M.A.; SCHMIDT, R. Analysis of proteins with caseinolytic activity in a human stratum corneum extract revealed a yet unidentified cysteine protease and identified the so-called "stratum corneum thiol protease" as cathepsin L2. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.120, p.592-600, 2003.
- BERNENGO, J. C.; GASQUEZ, C.; FALSON-RIEG, F. Photoacoustics as a tool for cutaneous permeation studies. *High Temp. – High Pressures*, London, v.30, n.5, p.619-624, 1998.
- 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.
- BOCK, U.; KOLAC, C.; BORCHARD, G.; KOCH, K.; FUCHS, R.; STRICHHAN, P.; LEHR, C.M. Transport of proteolytic enzymes across caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.*, New York, v.15, p.1393-1400, 1998.

- BOWDEN, P.E. Keratins and other epidermal proteins. In: PRISTLEY, G.C. **Molecular aspects of dermatology**. Guildford: Wiley, 1993. cap.2, p.19-34.
- BRAA, S.S.; TRIGLIA, D. Prediction ocular irritation using 3-dimensional human fibroblast cultures. *Cosmet. Toiletries*, Carol Stream, v.106, p.55-60, 1991.
- BRANCALEONE, L.; BAMBERG, M.P.; KOLLIAS, N. Spectral differences between stratum corneum and sebaceous molecular components in the mid-IR. *Appl. Spectrosc.*, Frederick, v.54, n.8, p.1175-1182, 2000.
- BRAUE JR, E.H.; PANNELLA, M.G. Topical protectant evaluation by FT-IR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, Frederick, v. 44, p.1061-1063, 1990.
- BROOKS, G.; SCHOLTZ, D.B.; PARISH, D.; BENNETT, S. Envelhecimento e o futuro das enzimas em cosméticos. *Cosmet. Toiletries, Ed. Port.*, São Paulo, v.11, n.5, p.62-69, 1999.
- BROWN, S.M.; BAESSO, M.L.; SHEN, J.; SNOOK, R.D. Thermal diffusivity of skin measured by two photothermal techniques. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.282, p.711-719, 1993.
- BÜYÜKTIMKIM, S.; BÜYÜKTIMKIM, N.; RYTTING, J.H. Interaction of indomethacin with a new penetration enhancer, dodecyl 2-(N,N – dimethylamino) propionate (DDAIP): its effect on transdermal delivery. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.127, p.245-253, 1996.
- CAREY, P.R. **Biochemical applications of raman and resonance raman spectroscopies**. New York: Academic Press, 1982. 262p.
- CHESNOY, S.; DURAND, D.; DOUCET, J.; COUARRAZE, G. Structural parameters involved in the permeation of propranolol HCl y iontophoresis and enhancers. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.58, p. 163-175, 1999.

- CIURCZAK, E.W. Aplicações da espectroscopia por infravermelho fotoacústica. *Pharm. Technol.*, São Paulo, v.3, n.4, p.11-12, 1999.
- CLANCY, M.J.; CORISH, J.; CORRIGAN, O.I. A comparison of the effects of electrical current and penetration enhancers on the properties of human skin using spectroscopic (FTIR) and calorimetric (DSC) methods. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.105, p.47-56, 1994.
- 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.
- CRITCHLEY, P. Skin lipids. In: PRISTLEY, G.C., ed. **Molecular aspects of dermatology**. Chichester: Wiley, 1993. cap.8, p.147-169.
- CUNNINGHAM, D.D.; HO, T.S. Effects of added proteases on concanavalin A-specific agglutinability and proliferation of quiescent fibroblasts. In: REICH, E.; RIFKIN, D.B.; SHAW, E., eds. **Proteases and biological control**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1975. p.795-806. (Cold Spring Harbor conferences on cell proliferation, v.2).
- DUPUIS, D.; ROUGIER, A.; ROGUET, R.; LOTTE, C.; KALORISSIS, G. In vivo relationship between horny layer reservoir effect and percutaneous absorption in human and rat. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.82, p.353-356, 1984.
- EDWARDS, H.G.M.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Potential applications of FT-Raman spectroscopy for dermatological diagnostics. *J. Mol. Structure*, Amsterdam, v.347, p.379-388, 1995.
- EGELRUD, T. Desquamation in the stratum corneum. *Acta Derm. Venereol., Suppl.*, Oslo, n.208, p.44-45, 2000.
- EGELRUD, T.; LUNDSTROM, A.; SONDELL, B. Stratum corneum cell cohesion and desquamation in maintenance of the skin barrier. In:



- MARZULLI, F.N.; MAIBACH, H.I., eds. **Dermatotoxicology**. 5.ed. Washington: Taylor & Francis, 1996. cap.2, p.19-33.
- EGELRUD, T.; LUNDSTROM, A. A chymotrypsin-like proteinase that may be involved in desquamation in plantar stratum corneum. *Arch. Dermatol. Res.*, Berlin, v.283, p.108-112, 1991.
- EKHOLM, E.; EGELRUD, T. Stratum corneum chymotryptic enzyme in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.*, Berlin, v.291, p.195-200, 1999.
- EKHOLM, I.E.; BRATTSAND, M.; EGELRUD, T. Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.144, p.56-63, 2000.
- EL MAGHRABY, G.M.M.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.196, p.63-74, 2000.
- ELIAS, P.M. Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.80, p.44-49, 1983.
- EUN, H.C.; JUNG, S.Y. Comparison of irritant potential of shampoos using cultured human epidermal keratinocytes model and patch test reaction measured by laser doppler flowmetry. *Contact Dermatitis*, Copenhagen, v.30, p.168-171, 1994.
- FABREGUETTE, A.; ZHI HUA, S.; LASNE, F.; DAMOUR, O. Évaluation de la cytotoxicité des antiseptiques utilisés en pratique courante sur des cultures de fibroblastes et de kératinocytes. *Pathol. Biol.*, Paris, v.42, p.888-892, 1994.
- FARIA, D.L.A.; SANTOS, L.G.C.; GONÇALVES, N.S.. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de Raman. *Química Nova*, v.20, n.3, p.319-23, 1997.

FARIA, D.L.A.; SOUZA, M.A. Raman spectra of human skin and nail excited in the visible region. *J. Raman Spectrosc.*, Bognor Regis, v.30, p.169-171, 1999.

FUND FOR THE REPLACEMENT OF ANIMALS IN MEDICAL EXPERIMENTS. Caminho. Disponível em: <http://www.frame.org.uk/Alternat.htm>. Acesso em: 10 fev. 2003.

FRESHNEY, R.I., ed. **Culture of epithelial cells**. New York: Wiley-Liss, 1992. 232p. (Culture of specialized cells).

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 4.ed. New York: Wiley, 2000. 577p.

GAY, C.L.; GUY, R.H.; GOLDEN, G.M.; MAK, V.H.W.; FRANCOEUR, M. Characterization of low-temperature (i.e., <65°C) lipid transitions in human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.103, p.233-239, 1994.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica. Parte II. *Cerâmica*, São Paulo, v.34, p.163-164, 1988.

GNIADOCKA, M.; WULF, H.C.; NIELSEN O.F.; CHRISTENSEN, D.H.; HERCOGOVA, J. Distinctive molecular abnormalities in benign and malignant skin lesions: studies by raman spectroscopy. *Photochem. Photobiol.*, Lawrence, v.66, p.418-423, 1998.

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.

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

- 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.
- GUZMAN, A.V.; GUZMAN, M.G.S. The enzymatic debridement of  
suppurations necrotic lesions and burns with papain. *J. Int. Coll. Surg.*,  
Chicago, v.20, n.6, p.695-702, 1953.
- GYSLER, A.; LANGE, K.; KORTING, H.C.; SCHÄFER-KORTING, M.  
Prednicarbate biotransformation in human foreskin keratinocytes and  
fibroblasts. *Pharm. Res.*, New York, v.14, n.6, p.793-797, 1997.
- HANH, B.D.; NEUBERT, R.H.H.; WARTEWIG, S.; CHRIST, A.; HENTZSCH,  
C. Drug penetration as studied by noninvasive methods: fourier transform  
infrared-attenuated total reflection, fourier transform infrared, and  
ultraviolet photoacoustic spectroscopy. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.89,  
n.9, p.1106-1113, 2000.
- HANH, B.D.; NEUBERT, R.H.H.; WARTEWIG, S.; LASCH, J. Penetration of  
compounds through human stratum corneum as studied by Fourier  
transform infrared photoacoustic spectroscopy. *J. Controlled Release*,  
Amsterdam, v.70, p.393-398, 2001.
- HARDING, C.R.; WATKINSON, A.; RAWLINGS, A.V.; SCOTT, I.R. Dry skin,  
moisturization and corneodesmolysis. *Int. J. Cosmet. Sci.*, Oxford, v.22,  
p.21-52, 2000.
- 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.
- HIGO, N.; NAIK, A.; BOMMANNAN, D.B.; POTTS, R.O.; GUY, R.H.  
Validation of reflectance infrared spectroscopy as a quantitative method  
to measure percutaneous absorption *in vivo*. *Pharm. Res.*, New York,  
v.10, n.10, p.1500-1506, 1993.



- HERSON, M.R. Estudo da composição *in vitro* de substituto cutâneo dermo-epidérmico constituído por epitélio de queratinócitos cultivados sobre base dérmica alógena. São Paulo, 1999. 141p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo.
- HORIKOSH, T.; IGARASHI, S.; UCHIWA, H.; BRYSK, H.; BRYSK, M.M. Role of endogenous cathepsin D-like and chymotrypsin-like proteolysis in human epidermal desquamation. *Br. J. Dermatol.*, Oxford, v.141, p.453-459, 1999
- HWANG, K.; IVY, A.C. A review of the literature on the potencial therapeutic significance of papain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v.54, p.147-296, 1951.
- JEONG, S.H.; CHO, W.G.; CHOI, J.K.; RYOO, J.P. A systematic approach to cosmetic patch development. *Cosmet. Toiletries.*, Carol Stream, v.116, p.39-46, 2001.
- 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.*, New York, v.13, p.1162-1167, 1996.
- KOLMEL, K.; NICOLAUS, A.; SENNHENN, B.; GIESE, K. Evaluation of drug penetration into the skin by photoacoustic measurement. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v.37, p.375-385, 1986
- KRIWET, K.; PARENTEAU, N.V. *In vitro* skin models: tools for testing topical formulations. *Cosmet. Toiletries*, Carol Stream, v.111, p.93-102. 1996.
- 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.*, New York, v.7, n.7, p.762-766, 1990.

- LAMPE, M.A.; BURLINGAME, A.L.; WHITNEY, J.; WILLIAMS, M.L.; BROWN, B.E.; ROITMAN, E.; ELIAS, P.M. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v.24, p.120-130, 1983.
- LAVKER, R.M.; SUN, T.T. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlation. *Science*, Washington, v.215, p.1239-1241, 1982.
- LAVKER, R.M.; SUN, T.T. Epidermal stem cells. *J. Invest. Dermatol.*, v.81, p.121s-127s, 1983 *apud* MARZULLI, F.N.; MAIBACH, H.I., eds. **Dermatotoxicology**. 5.ed.. Washington: Taylor & Francis, 1996. cap.1, p.3-13.
- LAWSON, E.E.; ANIGBOGU, A.N.C.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W.; EDWARDS, H.G.M. Thermally induced molecular disorder in human stratum corneum lipids compared with a model phospholipid system; FT-raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta, Part A*, Amsterdam, v.54, p.543-558, 1998.
- LAW, S.; WERTZ, P.W.; SWARTZENDRUBER, D.C.; SQUIER, C.A. Regional variation in content composition and organization of porcine epithelial barrier lipids revealed by thin-layer chromatography and transmission electron microscopy. *Arch. Oral Biol.*, Amsterdam, v.40, n.12, p.1085-1091, 1995.
- LAZO, N.D.; DOWNING, D.T. A mixture of  $\alpha$ -helical and  $3_{10}$ -helical conformations for involucrin in the human epidermal corneocyte envelope provides a scaffold for the attachment of both lipids and proteins. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.274, n.52, p.37340-37344, 1999.
- LEE, A.R.C.; TOJO, K. Characterization of skin permeation of vitamin c: theoretical analysis of penetration profiles and differential scanning calorimetry study. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.46, p.174-177, 1998.

- LEGENDRE, J.Y.; RAULT, I.; PETIT, A.; LUIJTEN, W.; DEMUNYNCK, I.; HORVATH, S.; GINOT, Y.M.; CUINE, A. Effects of  $\beta$ - cyclodextrins on the skin: implications for the transdermal delivery of piribedil and a novel cognition enhancing-drug, S-9977. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.3, p.311-322, 1995.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2000. 723p.
- LIN, S.Y.; DUAN, K.J.; LIN, T.C. Microscopic FT-IR / DSC system used to simultaneously investigate the conversion process of protein structure in porcine stratum corneum after pretreatment with skin penetration enhancers. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, Barcelona, v.18, n.3, p.175-181, 1996.
- LOPES, P.S. **Influência da papaína e do óleo de Pequi na penetração percutânea do diclofenaco de sódio**. São Paulo, 1999. 149p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- LUNDSTROM, A.; EGELRUD, T.; Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. *Acta. Derm.-Venereol.*, Basingstoke, v.71, p.471-474, 1991.
- LUNDSTROM, A.; EGELRUD, T. Cell shedding from human plantar skin in vitro: evidence that two different types of protein structures are degraded by a chymotrypsin-like enzyme. *Arch. Dermatol. Res.*, Berlin, v.282, p.234-237, 1990.
- MAJMUDAR, G.; SMITH, M. *In vitro* screening techniques in dermatology. *Cosmet. Toiletries*, Carol Stream, v.113, p.69-76, 1998.
- MAK, V.H.W.; POTTS, R.O.; GUY, R.H. Percutaneous penetration enhancement in vivo measured by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Pharm. Res.*, New York, v. 7, n.8, p. 835-841, 1990.



- MATHOR, M.B. **Estudos da expressão gênica mediante utilização de células transfectadas com o gene do hormônio de crescimento humano. "Possível utilização em terapia gênica"**. São Paulo, 1994. 154p. Tese de Doutorado – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP.
- MERCK index. 12.ed. Whitehouse Station, 1996. p.1205.
- MIZUSHIMA, H.; FUKASAWA, J.I.; SUZUKI, T. Phase behavior of artificial stratum corneum lipids containing a synthetic pseudo-ceramide: a study of the function of cholesterol. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v.37, p.361-367, 1996.
- MOGHIMI, H.R.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids. I. Characterization and comparison with stratum corneum intercellular structure. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.131, p.103-115, 1996.
- MOGHIMI, H.R.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids. II. Effect of geometry of the stratum corneum on permeation of model drugs 5-fluorouracil and oestradiol. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.131, p.117-129, 1996.
- MONTAGU, A. **Tocar: o significado humano da pele**. 7.ed. São Paulo: Summus, 1988. 427p.
- MONTEIRO-RIVIERE, N.A. Anatomical factors affecting barrier function. In: MARZULLI, F.N.; MAIBACH, H.I., eds. **Dermatotoxicology**. 5.ed. Washington: Taylor & Francis, 1996. cap.1, p.3-13.
- MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. *Clinics Dermatol.*, New York, v.19, p.489-501, 2001.
- NORDAL, P.E.; KANSTAD, S.O. Photoacoustic skin lipid spectroscopy. *J. Invest.. Dermatol.*, Malden, v.76, n.5, p.417, 1981.

- OERTEL, R.P. Protein conformational changes induced in human stratum corneum by organic sulfoxides: an infrared spectroscopic investigation. *Biopolymers*, New York, v.16, p.2329-2345, 1977.
- ONGPIPATTANAKUL, B.; BURNETTE, R.R.; POTTS, R.O.; FRANCOEUR, M.L. Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. *Pharm. Res.*, New York, v.8, p.350-354, 1991.
- OSBORNE, R.; PEKKINS, M.A.; ROBERTS, D.A. Development and intralaboratory evaluation of an *in vitro* human cell-based test to aid ocular irritancy assessment. *Fundam. Appl. Toxicol.*, Orlando, v.28, p.139-153, 1995.
- PARK, E.S.; CHANG, S.Y.; HAHN, M.; CHI, S.C. Enhancing effect of polyoxethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.209, p.109-119, 2000.
- PATIL, S.; SINGH, P.; SZOLAR-PLATZER, C.; MAIBACH, H. Epidermal enzymes as penetration enhancers in transdermal drug delivery? *J. Pharm. Sci.*, New York, v.85, n.3, p.249-252, 1996.
- PELLETT, M.A.; WATKINSON, A.C.; HADGRAFT, J.; BRAIN, K.R. Comparison of permeability data from traditional diffusion cells and ATR-FTIR spectroscopy. Part II. Determination of diffusional path lengths in synthetic membranes and human stratum corneum. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.154, p.217-227, 1997.
- PETICOLAS, W.L.; EVERTSZ, E. Conformation of DNA *in vitro* and *in vivo* from laser raman scattering. *Methods Enzymol.*, San Diego, v.211, p.335-352, 1992.
- PEYREFITTE, G. Biologia geral. In: PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.C.; CHIVOT, M. **Estética-cosmética**: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele. São Paulo: Andrei, 1998. pt.2, p.225.

- PFISTER, W.R.; HSIEH, D.S.T. Permeation enhancers compatible with transdermal drug delivery systems. Part II: System design considerations. *Pharm. Technol.*, São Paulo, p.54-60, 1990.
- PHILLIPS, B.J. Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. *Toxicol. in Vitro*, Oxford, v.10, p.69-76, 1996
- PINES, E. A new technique to assess sunscreen effectiveness. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v.29, p.559-564, 1978.
- POULET, P.; CHAMBRON, J. *In vivo* photoacoustic spectroscopy of the skin. *J. Phys.*, Paris, v.44, n.6, p.413-418, 1983.
- POULIOT, R.; GERMAIN, L.; AUGER, F.A.; TREMBLAY, N.; JUHASZ, J. Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro human skin equivalent produced by tissue engineering and its comparison with normal human skin by ATR-FTIR spectroscopy and thermal analysis (DSC). *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1439, p.341-352, 1999.
- PRASH, TH.; SCHLOTSMANN, K.; SCHIMIDT-FONK, K.; FÖRSTER, TH. Investigating the influence of cosmetic products on the stratum corneum by infrared and raman spectroscopy. In: INTERNATIONAL CONGRESS DA IFSCC, 21, Berlin, 2000. **Proceedings**. Sociedade, 2000. p.435-441.
- PRICE, N.C.; STEVENS, L. **Fundamentals of enzymology**. 2.ed. New York: Oxford University Press, 1989. 526p.
- PUCETTI, G.; LEBLANC, R.M. A Sunscreen-tanning compromise: 3D visualization of the actions of titanium dioxide particles and dihydroxyacetone on human epiderm. *Photochem. Photobiol.*, Lawrence, v.71, n.4, p.426-490, 2000.
- PUCETTI, G.; TRANCHANT, J.F.; LEBLANC, R.M. The stability and penetration of epidermal applications visualized by photoacoustic depth profilometry. In: INTERNATIONAL CONGRESS IFSCC, 21, Berlin, 2000. p. 415-421. **Proceedings**



- PUPPELS, G.J.; MUL, F.F.M.; OTTO, C.; GREVE, J.; ROBERT-NICOUD, M.; ARNDT-JOVIN, D.J.; JOVIN, T.M. Studying single living cells and chromosomes by confocal raman microspectroscopy. *Nature*, London, v.347, p.301-303, 1990.
- 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.*, Monticello, v.24, p.685-690, 1998.
- RAJALAKSHMI, N.; SUNDARAM, P.V. Stability of native and covalently modified papain. *Protein Eng.*, Oxford, v.8, n.10, p.1039-1047, 1995.
- REGNIER, M.; CARON, D.; REICHERT, U.; SCHAEFER, H. Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.82, n.4, p.404-407, 1993.
- REHFELD, S.J.; ELIASM, P.M. Mammalian stratum corneum contains physiologic lipid thermal transitions. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.79, p.1-3, 1982.
- RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell*, Cambridge, v.6, p.317-330, 1975a.
- RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, Cambridge, v.6, p.334-344, 1975b.
- RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured epidermal keratinocytes. *Nature*, London, v.265, p.421-427, 1977.
- REMINGTON'S *Pharmaceutical Sciences*. 18.ed. Easton: Mack, 1990. p.1038.

- ROBINSON, N.A.; ECKERT, R.L. Identification of transglutaminase-reactive residues in S100A11. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.273, n.5, p.2721-2728, 1998.
- ROBINSON, N.A.; LAPIC, S.; WELTER J.F.; ECKERT, R.L. S100A11, S100A10, Annexin I, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.272, n.18, p.12035-12046, 1997.
- ROCHAT, A.; KOBAYASHI, K.; BARRANDON, Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell*, Cambridge, v.76, p.1063-1073, 1994.
- SANTOS, E.P. Enzimas em cosmetologia. *Cosmet. Toiletries, Ed. Port.*, São Paulo, v.13, p.66-71, 2001.
- SHAH, V.P.; MAIBACH, H.I. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration.** New York: Plenum, 1993. 453p.
- SCHENDZIELORZ, A.; HANH, B.D.; NEUBERT, R.H.H.; WARTEWIG, S. Penetration studies of clotrimazole from semisolid formulation using step-scan ft-ir photoacoustic spectroscopy. *Pharm. Res.*, New York, v.16, p.42-45, 1999.
- SILBER, P.M. Selection and utilization of in vitro toxicity tests. *Cosmet. Toiletries*, Carol Stream, v.106, p.55-62, apr., 1991.
- SIMONETTI, O.; HOOGSTRAATE, A.J.; BIALIK, W.; KEMPENAAR, J.A.; SCHRIJVERS, A.H.G.J.; BODDÉ, H.E.; PONEC, M. Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in vitro reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy. *Arch. Dermatol. Res.*, Berlin, v.287, p.465-473, 1995.

- SMITH, W.P.; CHRISTENSEN, M.S.; NACHT, S.; GANS, E.H. Effect of Lipids on the Aggregation and Permeability of Human Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.78, p.7-11, 1982.
- SNOOK, R.D.; LOWE, R.D.; BAESSO, M.L. Photothermal spectrometry for membrane and interfacial region studies. *Analyst*, Letchworth, v.123, p.587-593, 1998.
- STARLEY, I.F.; MOHAMMED, P.; SCHNEIDER, G.; BICKLER, S.W. The Treatment of paediatric burns using topical papaya. *Burns*, Guildford, v.25, p.636-639, 1999.
- STEINERT, P.M.; MAREKOV, L.N. Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.272, n.3, p.2021-2030, 1997.
- STOTT, P.W.; WILLIAMS, A.C.; BARRY B.W. Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.50, p.297-308, 1998.
- STUART, B. **Biological applications of infrared spectroscopy**. Chichester: Wiley, 1997. 191p.
- SUHONEN, T.M.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.59, p.149-161, 1999.
- TAKAMOTO, R.; NAMBA, R.; NAKATA, O.; SAWADA, T. *In vitro* percutaneous absorptiometry by simultaneous measurement using the photoacoustic method and absorbance. *Anal. Chem.*, Columbus, v.62, p.674-677, 1990.
- TAKAOKA, T.; KATSUTA, H.; ISHIKI, S.; KONISHI, T. Effects of lysozyme on the proliferation of fibroblasts in tissue culture. *Jpn. J. Exp. Med.*, Tokyo, v.42, n.3, p.221-232, 1972.



- TENJARLA, S.N.; KASINA, R.; PURANAJOTI, P.; OMAR, M.S.; HARRIS, W.T. Synthesis and evaluation of N-acetylprolinate esters: novel skin penetration enhancers. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.192, p.147-158, 1999.
- TOUITOU, E.; MEIDAN, V.M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drugs localized in the skin. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.56, p.7-21, 1998.
- TRAVERSA, E. **Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo papaína e avaliação da sua eficácia depilatória sobre o folículo piloso.** São Paulo, 2003. 160p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- VAN DUZEE, B.F. Thermal analysis of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.65, p.404-408, 1975.
- VELASCO, M.V.R. **Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico.** São Paulo, 1993. 146p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade São Paulo.
- WALSH, A.; CHAPMAN, S.J. Sugars protect desmosome and corneosome glycoproteins from proteolysis. *Arch. Dermatol. Res.*, Berlin, v.283, p.174-179, 1991
- WARTEWIG, S.; NEUBERT, R.; RETTIG, W.; HESSE, K. Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. IV. Mixtures of ceramides and oleic acid. *Chem. Phys. Lipids*, Amsterdam, v.91, p.145-152, 1998.
- WEGENER, M.; NEUBERT, R.; RETTIG, W.; WARTEWIG, S. Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. I. ceramides. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.128, p.203-213, 1996.

- WEGENER, M.; NEUBERT, R.; RETTIG, W.; WARTEWIG, S. Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. III. Mixtures of ceramides and cholesterol. *Chem. Phys. Lipids*, Amsterdam, v.88, p.73-82, 1997.
- WELDON, M.K.; MORRIS, M.D.; HARRIS, A.B.; STOLL, J.K. Surface enhanced Raman spectroscopic monitor of *P. acnes* lipid hydrolysis in vitro. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v.39, p.1896-1899, 1998.
- WERTZ, P.W.; DOWNING, D.T. Glycolipids in mammalian epidermis: structure and function in the water barrier. *Science*, Washington, v.217, p.1261-1262, 1982.
- 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.
- WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Comparison of Fourier transform Raman spectra of mammalian and reptilian skin. *Analyst*, Letchworth, v.119, p.563-566, 1994.
- WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W.; EDWARDS, H.G.M.; FARWELL, D.W. A critical comparison of some Raman spectroscopic techniques for studies of human stratum corneum. *Pharm. Res.*, New York, v.10, p.1642-1647, 1993.
- WILLIAMS, A.C.; EDWARDS, H.G.M.; BARRY, B.W. Fourier transform Raman spectroscopy: a novel application for examining human stratum corneum. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.81, p.11-14, 1992.
- YARDLEY, H.S.; SUMMERLY, R. Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. *Pharmacol. Ther.*, v.13, p.357-383, 1981 *apud* MARZULLI, F.N.; MAIBACH, H.I., eds. **Dermatotoxicology**. 5.ed. Washington: Taylor & Francis, 1996. cap.1, p.3-13.

- YOKOMIZO, Y.; SAGITANI, H. Effects of phospholipids on the *in vitro* percutaneous penetration of prednisolone and analysis of mechanism by using attenuated total reflectance: fourier transform infrared spectroscopy. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.85, p.1220-1226, 1996.
- YOUSEF, G.M.; SCORILAS, A.; MAGKLARA, A.; SOOSAIPILLAI, A.; DIAMANDIS, E. P. The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family: genomic characterization, mapping, tissue expression and hormonal regulation. *Gene*, Amsterdam, v.254, p.119-128, 2000.
- ZELLMER, S.; PFEIL, W.; LASCH, J. Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v.1237, p.176-182, 1995.
- ZHUANG, P.; BUTTERFIELD, D.A. Denaturation studies of active-site labeled papain using electron paramagnetic resonance and fluorescence spectroscopy. *Biophys. J.*, Bethesda, v.60, p.623-628, 1991.